МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Государственное учреждение «Республиканский
научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Сборник научных трудов

выпуск 4

Минск
2011

УДК 616.9(045)
ББК 55.14
С 56

Сборник нучных трудов
Основан в 2008 г.

Редакционная коллегия:
Т.В. Амвросьева, В.Г. Гудков, В.Ф. Ерёмин, Н.П. Мишаева, А.С. Петкевич, Н.Н Полещук, Т.И. Самойлова, Е.О. Самойлович, Л.П. Титов (Беларусь), Д. Феби (Великобритания), М. Муровска (Латвия), А.Н. Алексеев (Россия)

Рецензенты:
д-р мед. наук, профессор *Н.Д. Коломиец*
д-р мед. наук *Е.И. Бореко*

Главный редактор:
д-р мед. наук, профессор *Г.М. Игнатьев*

С 56 **Современные проблемы инфекционной патологии человека:** сб. науч. тр. Вып. 4 / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, ГУ «Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии»; редкол.: Г.М. Игнатьев (гл. ред.) [и др.]. — Минск: ГУ «Республиканская научная медицинская библиотека», 2011. — 312 с.: ил., табл.

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(045)
ББК 55.14

ISBN 978-985-6846-89-5

© Составление. ГУ РНПЦЭМ, 2011
© Оформление. ГУ «Республиканская научная медицинская библиотека», 2011

ИТОГИ ВЫПОЛНЕНИЯ ГОСУДАРСТВЕННОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ПРОГРАММЫ «ИНФЕКЦИОННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ»

Титов Л.П., Игнатьев Г.М., Петкевич А.С., Павлова Н.И., Лапушкина Т.Н., Кукареко Т.М.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларус

Государственная научно-техническая программа «Инфекционные заболевания и микробиологические биотехнологии» на 2006–2010 гг. направлена на создание биотехнологических средств специфической профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекционных заболеваний и обеспечение ими практического здравоохранения Республики Беларусь. Приведены результаты выполнения заданий указанной программы, дана общая характеристика научных разработок, выполненных ведущими специалистами Республики Беларусь по данной проблеме.

ГНТП «Инфекционные заболевания и микробиологические биотехнологии»; средства диагностики, методы профилактики, методы лечения, инфекционные заболевания

Инфекционные заболевания человека — одна из серьезнейших социально-экономических проблем в мире. Это связано с существованием множества возбудителей инфекционных заболеваний, варьированием их по устойчивости во внешней среде и вирулентности, путям распространения, отличиями по спектру хозяев и переносчиков. Инфекционные заболевания в настоящее время характеризуются следующими особенностями: наряду с резким снижением или ликвидацией детских инфекций, контролируемых средствами иммунопрофилактики (корь, дифтерия, коклюш, эпидемический паротит, полиомиелит, натуральная оспа) появились инфекции, приобретшие черты глобального распространения в виде эпидемий и пандемий (вирусные гепатиты В и С, ВИЧ); возникли новые возбудители (новые варианты вируса гриппа, новые коронавирусы, вирусы геморрагических лихорадок — Ласса, Эбола, Марбург, всего более 30 новых возбудителей); наблюдается возврат к эпидемическому распространению и более тяжелому течению известных ранее инфекций (туберкулез, дифтерия, грипп и др.). Нестабильность эпидемической ситуации в глобальном и региональном аспектах требует проведения постоянного обширного мониторинга.

Установлена роль инфекционных агентов в патогенезе заболеваний, которые ранее не считались инфекционными — онкологические (до 70%), аутоиммунные, аллергические, неврологические, психические и ряд других. Все это существенно расширяет представление об их значимости в формировании патологии человека. Выяснение механизмов патогенеза распространенных заболеваний на молекулярном и субмолекулярном уровне позволит предложить обществу новые персонифицированные подходы в диагностике и предупреждении формирования тяжелых клинических проявлений.

Решение каждой из этих проблем требует от человеческого общества новых и новых экономических затрат, масштабы которых весьма впечатляющи. Так, по оценкам специалистов, каждый случай «простого» гриппа обходится государству в сумму более 100 долларов. Вместе с тем являясь высоконаукоемкой и затратной областью народного хозяйства, современная медицина при комплексном подходе способна дать быструю и эффективную отдачу. Существенная роль в реализации такого подхода принадлежит государственным научно-техническим программам, которые разрабатываются для решения наиболее значимых для республики народнохозяйственных, экологических, социальных и других проблем.

Государственная научно-техническая программа «Инфекционные заболевания и микробиологические биотехнологии» на 2006–2010 гг. утверждена Советом Министров Республики Беларусь и Приказом Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь от 19.04.2006 № 72. Государственным заказчиком Программы является Министерство здравоохранения Республики Беларусь (МЗ РБ), головной организацией-исполнителем — государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», научным руководителем — член-корреспондент НАН Беларуси, профессор Л.П. Титов. Целью программы являлось создание импортозамещающих и валютосберегающих биотехнологических средств специфической профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекционных заболеваний и обеспечение на их основе функционирования государственной системы эпидемиологического надзора в Республике Беларусь, а также обеспечение до 70% потребности лечебно-профилактических учреждений республики в отечественных диагностических препаратах.

В выполнении программы приняли участие 9 учреждений Министерства здравоохранения: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии — 46 заданий; РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии — 3 задания; РНПЦ детской онкологии и гематологии — 2; РНПЦ гематологии и трансфузиологии — 1; Белорусская медицинская академия последипломного образования — 3; Белорусский государственный медицинский университет — 2; Витебский государственный медицинский университет — 6; Гродненский государственный медицинский университет — 2; Гомельский государственный медицинский университет — 1. Всего выполнено 66 заданий. За период 2006–2010 гг. на выполнение Программы из республиканского бюджета выделено 17,2 млрд. руб.

Научные исследования в рамках Программы выполнялись в следующих направлениях: система эпиднадзора за распространенными инфекционными заболеваниями (18 заданий); средства для диагностики вирусных, бактериальных, иммунных заболеваний с использованием новых перспективных биотехнологий (27 заданий); средства профилактики и лечения вирусных, бактериальных, иммунных и аллергических заболеваний (15 заданий); разработка эффективных средств контроля особо опасных инфекционных заболеваний (5 заданий).

Всего в Программе ведущими учеными Беларуси выполнено более 90 научно-технических разработок.

Раздел 01. Система эпиднадзора за распространенными инфекционными заболеваниями

Грипп и другие ОРВИ. Осуществлялся молекулярно-генетический контроль циркуляции вирусов гриппа и негриппозных респираторных вирусов на территории страны. Ежегодно составлялись заключения по прошедшей эпидемии и прогнозы на предстоящий эпидемический сезон. Выделены и типированы циркулирующие вирусы гриппа, изучены их биологические свойства, определены маркеры устойчивости к противогриппозным препаратам. Разработан препарат для экспресс-диагностики гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций, инструкция по диагностике вирусов гриппа с использованием метода генетического анализа, усовершенствован протокол ведения больных с острой респираторной патологией.

Вакциноуправляемые инфекции — полиомиелит, корь, краснуха, коклюш, дифтерия. Проведено вирусологическое обследование детей с синдромом острого вялого паралича, серологическая идентификация полио- и неполиоэнтеровирусов, изолированных из различных источников в регионах страны, молекулярный и генетический анализ. Разработана программа эпидемиологического надзора за полиовирусной инфекцией в постсертификационный период. Выявлен вакцинно-родственный полиовирус с высоким уровнем дивергенции генома, представляющий эпидемическую опасность для населения. Разработан и внедрен в практику метод RFLP-анализа генома полиовирусов. Разработан «Национальный план мероприятий по поддержанию статуса страны, свободной от полиомиелита» (утвержден приказом МЗ РБ от 05.05.2006 № 912 «О совершенствовании эпидемиологического надзора за полиовирусной инфекцией в постсертификационном периоде в Республике Беларусь»). Результаты работы позволят обеспечить выполнение программы эрадикации полиомиелита и поддержания статуса страны, свободной от полиомиелита.

С целью выполнения программы элиминации кори и краснухи на территории страны проводился молекулярно-эпидемиологический мониторинг циркуляции вирусов кори, краснухи. Для установления их происхождения определялись генотипы вирусов.

С целью ранней диагностики коклюша разработан высокочувствительный метод ПЦР для выявления возбудителя, который позволит дифференцировать коклюш от инфекций со сходной клинической картиной. Проведен мониторинг возбудителя дифтерии. Установлена циркуляция 3 биотипов *C. diphtheriae*, с преобладанием штамма «mitis». Разработана диагностическая тест-система для выявления дифтерийного токсина методом иммунодот-анализа «Дот коринетокс». Использование разработки в практике здравоохранения позволит сократить время проведения исследования с 18–24 до 5 часов и избежать получения ложноположительных результатов.

Парвовирусная инфекция. Впервые в республике проведены исследования с целью установления эпидемиологической значимости парвовирусной инфекции, в частности парвовируса В19, как возбудителя острых экзантемных инфекций. Предложена технология дифференциальной диагностики этой инфекции.

Энтеровирусные инфекции. Проведена индикация неполиомиелитных энтеровирусов в человеческой популяции и объектах окружающей среды, установлены их филогенетические

связи, изучены генотипические свойства. Разработана методология проведения молекулярно-эпидемиологического мониторинга энтеровирусной инфекции. Изучен уровень контаминации кишечными вирусами расфасованных вод отечественного производства, готовой молочной продукции. Разработана инструкция по санитарно-вирусологическому контролю пищевых продуктов. Определены критические точки риска вирусного загрязнения продуктов в процессе изготовления и технологической обработки. Создан диагностический набор для экстракции и концентрирования вирусов из пищевых продуктов.

Разработана схема санитарно-вирусологического контроля воды плавательных бассейнов. Установлен спектр вирусов-контаминантов, их роль в формировании эпидемической заболеваемости. Полученные данные будут способствовать повышению эффективности производственного контроля и санитарно-эпидемиологического надзора за данными социально-значимыми водными объектами.

Проведены комплексные исследования этиологических аспектов вирусных гастроэнтеритов в Республике Беларусь. Получены приоритетные данные о спектре возбудителей данной группы инфекций и их этиологической структуре. Представлена комплексная схема дифференциальной диагностики острых вирусных гастроэнтеритов.

Проблема ротавирусной инфекции в республике обусловила необходимость разработки современной системы эпидемиологического надзора за этой инфекцией на основе молекулярно-эпидемиологического и серологического мониторинга. Внедрение данной разработки в практику санитарно-эпидемиологической службы позволит прогнозировать уровень заболеваемости, расшифровать вспышки инфекции, а также использовать адекватные противовирусные иммунобиологические препараты для профилактики и лечения инфекции.

Арбовирусные инфекции. Проведен молекулярно-генетический мониторинг мультизараженности иксодовых клещей эрлихиями, анаплазмами, боррелиями и вирусом клещевого энцефалита. Разработан метод диагностики, способный выявить в организме клеща возбудителей разных инфекций, что позволит проводить избирательную экстренную профилактику клещевого энцефалита, боррелиоза и анаплазмоза.

Папилломавирусная инфекция. Впервые в рамках программы проведены исследования, направленные на изучение папилломавирусов. Изучение эпидемиологических и молекулярно-генетических особенностей инфекции, вызванной вирусами папилломы высокого онкогенного риска, позволило разработать и внедрить в клиническую практику метод раннего выявления пациентов с высоким риском развития вирусассоциированного канцерогенеза.

Менингококковая инфекция. Проведен молекулярно-генетический мониторинг маркеров резистентности и патогенности *Neisseria meningitidis*. Исследованы спектр и частота мутаций в генах-маркерах резистентности и патогенности. На основании полученных данных разработан метод ПЦР-диагностики резистентных к антибиотикам менингококков, который позволит быстро и достоверно идентифицировать резистентные к антибиотикам менингококки и своевременно назначить адекватное лечение.

Всего в рамках раздела выполнены следующие разработки:

1. Набор реагентов для лабораторной диагностики гриппа и других ОРВИ методом прямой иммунофлуоресценции, регистрационное удостоверение № ИМ-7.96163 от 27.01.2010;

2. Инструкция по применению «Комплексная лабораторная диагностика гриппа», утверждена 18.01.2011 № 121-1210;

3. Протокол ведения больных с острой респираторной патологией* ;

4. Инструкция по применению «Рестрикционный анализ структурной и неструктурной областей генома полиовирусов для внутритиповой дифференциации и выявления рекомбинантных штаммов», утверждена 13.11.2008 № 077-0708;

5. Национальный план мероприятий по элиминации кори и краснухи на 2008–2010 гг., утвержден Приказом МЗ РБ от 03.04.2008 № 259;

6. Инструкция по применению «Ускоренное выявление и идентификация полиовирусов»*;

7. Инструкция по применению «Комплексная клинико-лабораторная дифференциальная диагностика парвовирусной инфекции*;

---

* *на стадии рассмотрения / регистрации (здесь и далее по тексту)*

8. Инструкция по применению «Лабораторные исследования при коклюше и паракоклюше», утверждена 19.03.2010 № 084-03-0310;

9. Инструкция по применению «Генодиагностика менингококкового менингита методом мультилокусного секвенирования-типирования», утверждена 15.03.2009 № 118-03-1207;

10. Инструкция по применению «Метод ПЦР-определения резистентных к антибиотикам менингококков», утверждена 11.04.2011 № 115-1210;

11. Инструкция по применению «Молекулярно-эпидемиологический мониторинг энтеровирусной инфекции», утверждена 11.06.2009 № 165-1208;

12. Инструкция по применению «Санитарно-вирусологический контроль воды плавательных бассейнов», утверждена 24.12.2010 № 112-1210;

13. Инструкция по применению «Эпидемиологический надзор за ротавирусной инфекцией»*;

14. Инструкция по применению «Алгоритм бактериологической диагностики туберкулеза и определения лекарственной чувствительности микобактерий к препаратам основного и резервного ряда с использованием автоматизированных систем», утверждена 27.04.2007 № 045/0506;

15. Санитарные нормы, правила и гигиенические нормативы «Гигиенические требования к устройству, оборудованию и содержанию организаций здравоохранения и к проведению санитарно-гигиенических и противоэпидемических мероприятий по профилактике внутрибольничных инфекций», утверждены Постановлением МЗ РБ от 19.09.2010 № 109;

16. Санитарные нормы, правила и гигиенические нормативы «Санитарно-гигиенические требования к устройству, оборудованию и содержаниию прививочных кабинетов и санитарно-гигиенические и противоэпидемические требования к проведению профилактических прививок», утверждены Постановлением МЗ РБ от 06.01.2010 № 3;

17. Инструкция по применению «О порядке организации оказания медицинской помощи лицам, инфицированным вирусом гепатита»*.

Раздел 02. Средства диагностики вирусных, бактериальных, иммунных заболеваний с использованием новых перспективных биотехнологий

За период выполнения программы разработан ряд средств диагностики бактериальных, вирусных, иммунных заболеваний. Это тест-системы на основе иммунофлуоресценции, иммуноферментного анализа, иммунного блоттинга, полимеразной цепной реакции; селективные среды, панели стандартных сывороток и пр. Получены разрешения на серийный выпуск ряда препаратов, в настоящее время завершается освоение их производства. Препараты, разработка которых завершена в 2010 году, представлены для государственной регистрации. Всего в рамках раздела выполнена 41 разработка:

1. Набор для выявления антиэритроцитарных антител при иммунопатологических состояниях, регистрационное удостоверение ИМ-7.94858 от 28.11.2008;

2. Тест-система для прижизненной диагностики бешенства, регистрационное удостоверение ИМ-7.95948 от 27.11.2009;

3. Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М и G к вирусу клещевого энцефалита*;

4. Иммуноферментная тест-система для выявления антител класса М и G к вирусу Западного Нила*;

5. Тест-система иммуноферментная для выявления антигена вируса клещевого энцефалита в переносчиках и клиническом материале*;

6. Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса G к возбудителю лептоспироза *Leptospira interrogans* в сыворотке и плазме крови человека «Лепто-ИФА-IgG», регистрационное удостоверение ИМ-7.97183 от 30.11.2010;

7. Тест-система иммуноферментная для выявления антигена возбудителя болезни Лайма в иксодовых клещах*;

8. Тест-система для выявления аномального протеазоустойчивого белка PrP 27-30 в аутопсийных образцах мозга человека методом иммунного блоттинга «Прион-Блот», регистрационное удостоверение ИМ-7.97320 от 04.01.2011;

9. Набор для экстракции и концентрирования кишечных вирусов из пищевых продуктов, регистрационное удостоверение ИМ-7.94.523 от 28.08.2008;

10. Тест-система для автоматической идентификации энтеробактерий, регистрационное удостоверение ИМ-7.2986/0708 от 31.08.2007;

11. Тест-система для автоматической идентификации стафилококков, регистрационное удостоверение ИМ-7.2985/0708 от 31.08.2007;

12. Тест-система для автоматической идентификации грамотрицательных микроорганизмов, регистрационное удостоверение ИМ-7.2987/0708 от 31.08.2007;

13. Тест-система «АБ-ГРАМ(–)» для определения чувствительности грамотрицательных микроорганизмов к антибиотикам», регистрационное удостоверение ИМ-7.95758 от 15.09.2009;

14. Тест-система для определения чувствительности к антибиотикам анаэробных микроорганизмов*;

15. Тест-система для автоматической идентификации анаэробных бактерий*;

16. Тест-система для иммунодиагностики бактериальных и паразитарных инфекций*;

17. Тест-системы для определения устойчивости бактерий к дезинфектантам, регистрационное удостоверение ИМ-7.96870 от 30.08.2010;

18. Тест-система для молекулярной идентификации генов, ассоциированных с устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, регистрационное удостоверение ИМ-7.97674 от 04.04.2011;

19. Препарат антигена аденовирусного*;

20. Тест-система иммуноферментная для диагностики аденовирусной инфекции*;

21. Набор для обнаружения возбудителей кишечных паразитарных болезней, регистрационное удостоверение ИМ-7.96955 от 30.09.2010;

22. Тест-система диагностическая для подтверждения ВИЧ-инфицирования методом иммунного блоттинга*;

23. Панель стандартных сывороток крови, содержащих антитела к различным субтипам вируса гепатита С*;

24. Тест-система диагностическая для выявления энтерогеморрагических кишечных палочек, регистрационное удостоверение ИМ-7.95066 от 29.12.2008;

25. Тест-система диагностическая для выявления дифтерийного токсина методом иммунодот-анализа «Дот коринетокс», регистрационное удостоверение ИМ-7.95188/0911 от 03.03.2009;

26. Тест-система диагностическая для выявления аутоантител к белкам ядра клеток при аутоиммунных и инфекционных заболеваниях «ANA-HEP-2-РИФ-ТЕСТ», регистрационное удостоверение ИМ-7.95603 от 31.07.2009;

27. Тест-система диагностическая иммуноблот для выявления иммуноглобулинов G к *Borrelia burgdoferis* в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости человека «Лайм-блот IgG», регистрационное удостоверение ИМ-7.96240 от 15.02.2010;

28. Сухая селективная среда для выделения кампилобактерий*;

29. Тест-система для биохимической идентификации кампилобактерий*;

30. Тест-система иммунофлюоресцентная для выявления антинейтрофильных цитоплазматических аутоантител при хронических инфекциях, аутоиммунных и гематологических заболеваниях*;

31. Тест-система для определения и количественной оценки бета-лактамазной активности биологических субстратов*;

32. Набор диагностический для типирования вирусов гриппа методом РТГА;

33. Инструкция по применению «Алгоритм назначения иммуномодулирующей терапии больным HCV-инфекцией на основании комплекса клинико-лабораторного обследования», утверждена 13.12.2007, № 171-1206;

34. Инструкция по применению «Использование корнеального теста для прижизненной диагностики бешенства у человека и животных», утверждена 06.03.2008, № 050-8807;

35. Инструкция по применению «Сбор, доставка, хранение и методы исследования инфекционного материала для лабораторной диагностики бешенства», утверждена 06.06.2008, № 035-0408;

36. Инструкция по применению «Методы контроля качества пищевых продуктов по вирусологическим показателям», утверждена 11.06.2009 № 166-1208;

37. Инструкция по применению «Лабораторная диагностика острых кишечных инфекций», утверждена 24.12.2010, № 111-1210;

38. Инструкция по применению «Определение сенсибилизации лимфоцитов к антигенам и аллергенам для диагностики заболеваний», утверждена 06.03.2008 № 081-0907;

39. Инструкция по применению «Метод комплексной иммунодиагностики токсокароза» утверждена 18.12.2009, № 046-0508;

40. Инструкция по применению «Сорбционный метод обнаружения яиц гельминтов и цист простейших в копроматериале», утверждена 24.10.2010 № 117-1210;

41. Инструкция по применению «Приготовление и использование культуры моноцитарных дендритных клеток человека для выделения вируса иммунодефицита человека и изучения его биологических свойств»*.

Раздел 03. Средства профилактики и лечения вирусных, бактериальных, иммунных и аллергических заболеваний

Изучены особенности выявления септических осложнений грибковой этиологии у иммунокомпрометированных детей. Разработан и внедрен алгоритм диагностики и лечения. Исследованы также особенности формирования госпитальной микрофлоры у иммуносупрессивных детей. Разработан протокол ранней диагностики и профилактики внутрибольничной инфекции на основе рационального применения антибиотиков.

Изучена экспрессия генов интерферонов у больных хроническим Лайм-боррелиозом. Исследован полиморфизм генов интерферонов в группе больных хроническим нейроборрелиозом. Разработан метод оценки влияния лекарственных препаратов на активность системы интерферонов на молекулярном уровне.

Изучена частота распределения и взаимосвязь серотипов хламидий с клиническими проявлениями хламидиоза. Разработаны методы оценки активности инфекционного процесса и прогнозирования эффективности лечения при атипичных формах. Разработаны протоколы диагностики и лечения типичных и атипичных форм хламидиоза.

Проведен анализ эпидемиологической ситуации по гименолепидозам, тениидозам, дифиллоботриозам и цестодозам в отдельных регионах республики, дана оценка состояния генома хозяина при экспериментальных инвазиях. Разработаны способы комбинированного лечения этих инвазий человека. Дано обоснование способов профилактики цестодозов человека. На основе ДНК-технологий изучены особенности патогенеза нематодозов (аскаридоза и токсокароза), что позволило разработать новые способы лечения, способствующие снижению генетического груза в популяции человека.

Выполнены исследования, связанные с разработкой схемы вирусологической диагностики и способа комплексной терапии рассеянного склероза, ассоциированного с герпесвирусами. Впервые проведены системные исследования, направленные на выявление вирусных факторов риска у больных рассеянным склерозом. Получены новые научные знания о роли герпеса в этиопатогенезе рассеянного склероза, а также роли вируса в развитии демиелинизирующих процессов в ЦНС. С учетом выявленных факторов риска разработан способ комплексной терапии больных.

Разработан новый способ эффективной этиопатогенетической терапии герпесвирусных нейроинфекций с использованием доступных медикаментозных препаратов ацикловира и метронидазола. Установлен выраженный синергический эффект при совместном использовании этих препаратов. Накоплен опыт клинического применения схемы.

Разработан способ иммунотерапии хронических герпетических энцефаломиелитов. Доказано, что курс внутривенного лазерного облучения крови приводит к достоверному увеличению относительного числа В-лимфоцитов и Т-хелперов, повышению иммунорегуляторного индекса. Применение диасплена повышает уровень IgA в сыворотке. Метод рекомендован к внедрению в практику неврологических стационаров.

Разработаны молекулярно-диагностические критерии и методы оценки тяжести и прогноза хеликобактериоза. Показано, что диагностика антибиотикорезистентности штаммов *Helicobacter pylori*, выявление генов вирулентности, определение генотипов бактерий и местных иммунных реакций позволяет своевременно разработать тактику лечения больного и дать рекомендации по дальнейшему наблюдению за течением заболевания, поможет лечащему врачу выявить группы риска.

Проведено обследование пациентов с острыми и хроническими формами хламидиозов, дана молекулярно-биологическая характеристика инфекционного агента. Изучена чувствительность возбудителя к лекарственным средствам, разработаны критерии рациональной антибиотикотерапии. Применение разработки в практике здравоохранения повысит эффективность лечения, снизит длительность использования препаратов, обеспечит сокращение периода восстановления трудоспособности.

Разработан новый метод лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью с использованием аутологичной трансплантации мезенхимиальных стволовых клеток (АТ МСК), направленный на усиление регенеративной активности легочной ткани. Внедрение метода АТ МСК в практику фтизиатрии позволит повысить эффективность лечения больных, уменьшить количество и тяжесть токсических побочных эффектов противотуберкулезных препаратов, сократить сроки лечения.

Изучены молекулярно-генетические особенности ВИЧ и ВГС у пациентов с коинфекцией. Разработаны патоиммунологические критерии активности инфекционного процесса и обоснована схема стартовой этиотропной терапии.

Изучена динамика формирования гуморального и клеточного постинфекционного иммунного ответа. Разработан алгоритм оценки постинфекционного противогриппозного иммунитета.

Разработана пермиссивная система для культивирования вируса гепатита А. Полученный антиген используется для производства отечественных диагностических препаратов.

В рамках раздела выполнены следующие разработки:

1. Инструкция по применению «Метод определения устойчивости к антибиотикам *Chlamydia trachomatis*», утверждена 11.04.2011 № 001-0111;

2. Инструкция по применению «Алгоритм диагностики и лечения септических осложнений грибковой этиологии у иммунокомпрометированных детей», утверждена 13.01.2009 № 192-1208;

3. Протокол ранней диагностики септических осложнений и профилактики внутрибольничных инфекций у иммуносупрессивных детей*;

4. Инструкция по применению «Оценка активности системы интерферонов по экспрессии генов методом ПЦР в режиме реального времени», утверждена 10.04.2009 № 009-0209;

5. Инструкция по применению «Определение клинически значимых генотипов возбудителя у пациентов с хеликобактериозом», утверждена 11.04.2011 № 113-1210;

6. Инструкция по применению «Молекулярный метод определения лекарственной устойчивости штаммов *Helicobacter pylori*», утверждена 24.12.2010 № 096-0710;

7. Инструкция по применению «Оптимизация схемы иммунизации против гриппа» (разработка завершится в 2012 г.);

8. Инструкция по применению «Молекулярно-биологическая диагностика хламидиоза: требования по качеству и ошибки диагностики», утверждена 18.09.2007 № 168-1206;

9. Инструкция по применению «Способ лечения осложненных форм хронической хламидийной инфекции», утверждена 03.11.2008 № 081-0808;

10. Инструкция по применению «Метод молекулярно-генетического мониторинга вируса гепатита С на территории Республики Беларусь», утверждена 26.05.2010 № 034-0310;

11. Инструкция по применению «Метод стартовой терапии ВИЧ/ВГС», утверждена 26.05.2011 № 237-1210;

12. Инструкция по применению «Способ лечения гименолепидоза, включающий специфическую, патогенетическую и антиоксидантную терапию», утверждена 24.11.2007 № 011-0307;

13. Инструкция по применению «Способ лечения тениидозов, включающий специфическую, патогенетическую и антиоксидантную терапию», утверждена 23.05.2008 № 103-1107;

14. Инструкция по применению «Профилактика цестодозов человека», утверждена 13.11.2008 № 099-1008;

15. Инструкция по применению «Комбинированный способ лечения дифиллоботриоза», утверждена 13.11.2008 № 096-1008;

16. Протокол обследования и лечения аскаридоза*;

17. Инструкция по применению «Способ лечения аскаридоза»*;

18. Протокол обследования и лечения токсокароза*;

19. Инструкция по применению «Способ лечения токсокароза»*;

20. Инструкция по применению «Методика отбора биологического материала для диагностики папилломавирусной инфекции методом полимеразной цепной реакции», утверждена 05.11.2010 № 037-0410;

21. Инструкция по применению «Алгоритмы диагностики и мониторинга генитальной папилломавирусной инфекции с применением метода полимеразной цепной реакции», утверждена 27.12.2010 № 126-1110;

22. Инструкция по применению «Схема вирусологической диагностики и способ комплексной терапии рассеянного склероза»*;

23. Инструкция по применению «Определение инфицированности иксодовых клещей основными возбудителями заболеваний человека методом ПЦР», утверждена 11.04.2011 № 118-1210;

24. Инструкция по применению «Метод лечения пациентов с множественно лекарственно устойчивым туберкулезом с использованием аутологичной трансплантации мезенхимиальных стволовых клеток», утверждена 23.12.201 № 133-1110;

25. Инструкция по применению «Алгоритм лечения мультирезистентных форм туберкулеза легких»*;

26. Антиген вируса гепатита А, регистрационное удостоверение № ИМ-7.95940 от 27.22.2009;

27. Инструкция по применению «Комплексная этиопатогенетическая терапия герпетического энцефалита с применением ацикловира и метронидазола», утверждена 29.11.2007, № 170-1206;

28. Инструкция по применению «Лечение хронических герпетических энцефаломиелитов с использованием низкоинтенсивного лазерного излучения», утверждена 29.11.2007 №170-1206.

Раздел 04. Разработка эффективных средств контроля особо опасных инфекционных заболеваний

Разработаны молекулярно-биологические способы диагностики особо опасных вирусных геморрагических лихорадок. На основе сконструированных плазмид получены рекомбинантные полипептиды вирусов конго-крымской лихорадки, геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), лимфохориоменингита (ЛХМ), Ласса, Марбург, Эбола и созданы иммуноферментные тест-системы для их идентификации. Разработан диагностический препарат для идентификации антител класса М к вирусу ГЛПС, который позволит проводить раннюю диагностику инфекции, и рекомбинантная иммуноферментная тест-система для выявления суммарных антител (IgM и G) к вирусу ЛХМ.

Создан банк референс-сывороток к возбудителям особо опасных вирусных инфекций — геморрагических лихорадок Ласса, Эбола и гриппа птиц. На основе стандартных образцов сывороток разработан набор для идентификации возбудителей особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола иммунофлуоресцентным методом. На основании результатов изучения антивирусных свойств ряда официнальных препаратов различных фармакологических групп даны рекомендации для их практического применения в экстренных ситуациях.

Таким образом, в рамках раздела создана следующая научно-техническая продукция:

1. Тест-система рекомбинантная для выявления антител класса М к вирусу геморрагической лихорадки с почечным синдромом методом иммуноферментного анализа «Белар-ГЛПС-АТ/IgM», регистрационное удостоверение № ИМ-7.97720 от 01.06.2011;

2. Тест-система рекомбинантная для выявления суммарных антител (IgM и IgG) к вирусу лимфоцитарного хорименингита методом иммуноферментного анализа «Белар-ЛХМ-АТ»*;

3. Тест-система диагностическая унифицированная рекомбинантная для выявления антител к вирусам Ласса, Марбург, Эбола методом ТФИФА*;

4. Тест-система рекомбинантная для дифференциальной диагностики природно-очаговых вирусов ГЛПС, ЛХМ и ККГЛ методом дот-блот иммуноанализа*;

5. Набор для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции*;

6. Инструкция по применению «Экстренная профилактика и лечение птичьего гриппа *in vivo*»*;

7. Инструкция по применению «Экстренная профилактика и лечение лихорадки Ласса»*;

8. Инструкция по применению «Лабораторная диагностика геморрагической лихорадки с почечным синдромом», утверждена 24.12.2010 № 116-1210.

В целом, в результате выполнения ГНТП «Инфекционные заболевания и микробиологические биотехнологии» разработано: диагностических тест-систем и диагностических сред — 52; производственных штаммов — 2; новых методов диагностики — 35; новых методов профилактики и лечения — 12; протоколов диагностики и лечения — 3; санитарных правил, норм и гигиенических нормативов — 3.

Научные разработки, выполненные в рамках ГНТП «Инфекционные заболевания и микробиологические биотехнологии», имеют для нашей страны большое социально-экономическое значение. Их применение в практике здравоохранения способствует повышению эффективности диагностики, профилактики и лечения заболеваний, снижению заболеваемости и смертности населения от основных инфекций, расширяет возможности прогнозирования и предупреждения вспышек и эпидемий. Экономический эффект выражается в снижении затрат и потерь государства от инфекционных заболеваний, что благоприятно отразится на поддержании стабильного санитарно-эпидемиологического благополучия страны. За 2006–2010 гг.достигнута стабилизация или снижение заболеваемости по 40 нозологическим формам инфекций, отсутствовали случаи заболеваний по 18, не допущено случаев завоза особо опасных инфекций, реализуются меры по снижению ущерба от эпидемий и пандемии гриппа, поддерживается эффективная система по предотвращению распространения «завозных» случаев заболеваний (полиомиелит, корь, краснуха).

Таким образом, экономическая эффективность Программы складывается из прямого экономического эффекта (импортозамещение и реализация диагностических препаратов) и косвенного социально-экономического эффекта (предотвращение экономического ущерба за счет снижения заболеваемости и смертности от инфекционных заболеваний, улучшение качества диагностики и лечения, уменьшение экономических потерь от временной нетрудоспособности, смертности, инвалидизации и пр.). По предварительным расчетам, ежегодная экономическая эффективность ГНТП «Инфекционные заболевания и микробиологические биотехнологии» составит 28 млрд. руб. в год при условии использования всех разработок в практике здравоохранения.

В 2011 г. завершится этап освоения производства диагностических препаратов, разработанных в 2008 г. Планируемый результат данного этапа — возможность обеспечения потребности лечебно-профилактических учреждений республики в отечественных диагностических препаратах в среднем до 70%, а по некоторым позициям — до 100% и, соответственно, замещение импорта аналогичных видов продукции.

В настоящее время поставляется в клиники набор диагностический для выявления антиэритроцитарных антител при иммунопатологических состояниях (головная организация-исполнитель — РНПЦ гематологии и трансфузиологии). В 2008 г. антиглобулиновая сыворотка — один из компонентов набора — поставлен в 30 клиник Беларуси (всего 70 наборов на сумму 20 млн. руб.). За 2009–2010 гг. лечебными учреждениями республики использовано более 60 наборов.

По разработанной в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии технологии получен антиген вируса гепатита А, на основе которого производятся отечественные диагностические тест-системы. С 2008 г. с использованием антигена изготовлено около 1000 наборов. При этом объем импортозамещения за три года составил более 60 000,0 долларов США.

Набор для экстракции и концентрирования кишечных вирусов из пищевых продуктов ежегодно поставляется в областные центры гигиены и эпидемиологии республики (на сумму 10,2 млн. руб.). Используется в практике набор для обнаружения возбудителей кишечных паразитарных болезней. Данным видом продукции РНПЦ эпидемиологии и микробиологии планирует полностью обеспечить потребность учреждений здравоохранения страны.

В РНПЦ эпидемиологии и микробиологии налажено экспериментальное производство диагностических препаратов, разработанных ранее в рамках государственных научно-технических программ. За период 2006–2010 гг. лабораториям практического здравоохранения поставлено продукции на сумму 5,7 млрд. руб. Продано за пределы республики (Россия, Украина, Казахстан, Грузия) диагностических препаратов на сумму 17,1 млн. руб.

По результатам выполнения ГНТП «Инфекционные заболевания и микробиологические биотехнологии», опубликовано более 500 научных статей, представлено 4 монографии, подано 18 за-

явок на изобретение, получено 9 патентов. Основные публикации научных результатов, полученных при выполнении заданий Программы, представлены в специализированных выпусках журнала «Здравоохранение» [1–4], монографиях [5–7] и тематических сборниках [8–10]. Ряд статей опубликован в материалах международных научных конференций и зарубежных периодических изданиях.

Литература

1. Здравоохранение. — 2007. — № 10. — С. 13–16; № 11. — С. 4–38.

2. Здравоохранение. — 2008. — № 9. — С. 19–20, 61–64; № 12. — С. 4–57.

3. Здравоохранение. — 2009. — № 10. — С. 20–70; № 11. — С. 20–33.

4. Здравоохранение. — 2010. — № 10. — С. 5–80; № 11. — С. 19–33; № 12. — С. 15–51.

5. Протас, И.И. Хронический герпетический энцефалит (клиника, морфология, этиопатогенез): руководство для врачей / И.И. Протас, М.К. Недзьведь, М.Е. Хмара // Минск: МЕТ, 2009. — 176 с.

6. ВИЧ-инфекция у взрослых и детей. Оппортунистические инфекции и заболевания / Н.В. Матиевская, В.М. Цыркунов, Е.Л. Красавцев, В.Ф. Еремин. — Минск: ГрГМУ, 2011. — 399 с.

7. Новиков, П.Д. Иммуноаллергодиагностика / П.Д. Новиков. — Витебск: ВГМУ, 2007. — 260 с.

8. Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / НИИ эпидемиологии и микробиологии. — Минск, 2008. — Вып. 1. — 360 с.

9. Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. — Минск, 2009. — Вып. 2. — 551 с.

10. Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. — Минск, 2010. — Вып. 3. — 688 с.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ РАЗВИТИЯ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Амвросьева Т.В.[1], Игнатьев Г.М.[1], Амвросьев П.А.[2]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;
[2]Минский городской центр гигиены и эпидемиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Представлен краткий анализ современной ситуации в области лабораторного контроля за вирусными инфекциями в Республике Беларусь. Проанализированы кадровый и технический потенциал отечественной лабораторной службы, а также сложившаяся система планирования научных исследований, освоения и внедрения результатов научно-исследовательских работ с точки зрения взаимодействия науки и практики. Предложен перечень первоочередных мероприятий по повышению эффективности научного и лабораторного обеспечения надзора за актуальными вирусными инфекциями в стране.

Ключевые слова: вирусные инфекции, лабораторный контроль, научное сопровождение, вирусологическое обеспечение надзора.

Введение. В современных условиях развития мировой экономики и международного сообщения проблемы распространения вирусных инфекций имеют поистине глобальный характер. Вирусные агенты являются причиной возникновения широкого перечня инфекционных заболеваний — от острых респираторных до онкологических, которые ежегодно приносят существенный экономический ущерб обществу. Кроме того, вирусы могут являться причиной тяжелых осложнений в развитии многих соматических заболеваний, в том числе оказывать негативное влияние на результаты успешно проведенных операций в таком активно развивающемся направлении отечественного здравоохранения, как трансплантология.

Это определяет необходимость развития и внедрения в практику комплекса аналитических исследований и организационных мероприятий по проведению динамического мониторинга за возбудителями вирусных инфекций, циркулирующими в человеческой популяции и объектах окружающей среды.

Целью настоящей публикации является обоснование мероприятий по повышению эффективности вирусологического обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и системы здравоохранения в целом.

Анализ ситуации в области организации и проведения вирусологических исследований в учреждениях здравоохранения позволяет дать ей следующую оценку.

1. В области кадрового обеспечения

Подготовка кадров в медицинских вузах, особенно по вирусологии и лабораторному делу, не вполне соответствует современному уровню. Медицинские университеты не выпускают специалистов по молекулярной медицине, молекулярной биологии и молекулярной эпидемиологии. В связи с этим в Государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» (РНПЦЭМ) значительную часть молодых специалистов составляют биологи. Эти кадры имеют хорошую молекулярно-биологическую подготовку, но, к сожалению, не владеют необходимыми медицинскими знаниями.

Как известно, научное обеспечение госсаннадзора по вирусологии осуществляется силами РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, кафедрами микробиологии, эпидемиологии медицинских университетов и Белорусской медицинской академии последипломного образования. В связи с существенной педагогической нагрузкой и особенностями специализации роль преподавателей кафедр невелика. Большая часть ведущих научных сотрудников РНПЦЭМ относятся к старшей возрастной группе, однако имеются и молодые кадры, получившие фундаментальную научную подготовку и владеющие иностранными языками, а также современными информационными технологиями. Однако и этот научный потенциал используется не в полной мере. Круг специалистов, привлекаемых к подготовке и реализации программных и концептуальных документов санитарно-эпидемиологической службы, зачастую ограничен узким перечнем должностных лиц.

В вирусологических подразделениях учреждений санитарно-эпидемиологической службы очевиден недостаток компетентных и высокопрофессиональных врачей-лаборантов. Подготовка вирусологов ЦГЭ в рамках повышения их квалификации не вполне соответствует современному уровню развития науки и практики и требует совершенствования.

К сожалению, несмотря на возрастающую актуальность вирусной патологии, имеет место тенденция к сворачиванию (сокращению) вирусологических подразделений и соответствующих исследований на уровне областных центров гигиены и эпидемиологии.

2. В области технического оснащения и снабжения

Техническая оснащенность региональных вирусологических отделений, за некоторым исключением, не соответствует требованиям к современным вирусологическим лабораториям. Централизованно закупаемые диагностические и санитарно-вирусологические препараты, культуральные среды и другие расходуемые реагенты из-за несовершенства системы закупок поставляются в ЦГЭ нерегулярно (в конце или начале года), что нередко превращает лабораторные исследования в стихийный процесс с весьма низкой результативностью.

3. В области планирования научных исследований, освоения и внедрения результатов научно-исследовательских работ в практику здравоохранения

Проведение научно-исследовательских работ в интересах обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения осуществляется в основном в рамках государственных научно-технических программ. Возможности проведения исследований в рамках социальных заказов Министерства здравоохранения весьма ограничены. Вместе с тем созданные на базе РНПЦЭМ национальные центры и референс-лаборатории регулярно выполняют большой объем работ для практической лабораторной службы (клиническая диагностика, санитарно-вирусологические исследования, расшифровка вспышек и т.д.). Как правило, они осуществляются за счет средств РНПЦЭМ (непосредственно за счет денег конкретной лаборатории), что не соответствует принципам потемно-целевого финансирования научных исследований. Координация действий на этапе планирования НИР с участием практических специалистов, в том числе по их запросу, практически отсутствует. Внедрение результатов в практику (тиражирование разработанных инструктивных документов и их рассылка, продвижение на рынок созданных препаратов и новых технологий, включение их в тендерные закупки и т.д.), как правило, осуществляют сами научные работники, которые не всегда способны делать это профессионально и эффективно.

4. В области взаимодействия науки и практики

Взаимодействие научных работников и специалистов практики недостаточно и осуществляется в ряде случаев формально. Практики не имеют непосредственной заинтересованности в оперативном освоении и внедрении вновь разработанных методов и технологий. В свою очередь научные структуры не имеют реальных рычагов для влияния на эту заинтересованность. Практики, за редким исключением, не выходят с запросами (заказами) на проведение научных исследований по проблемным для санэпидслужбы вопросам (и ученые, и практики руководствуются проверенным правилом «инициатива наказуема исполнением»). Взаимообмен информацией недостаточен. Значительная масса полученных в регионах данных практически не анализируется и, кроме отдельных отчетов в виде сухих цифр, не доступна для специалистов РНПЦЭМ.

Вышеизложенное определяет необходимость реализации следующих задач по развитию и совершенствованию научного сопровождения вирусологического обеспечения деятельности санитарно-эпидемиологической службы:

- совершенствование научных и методологических основ контроля за вирусными инфекциями на основе широкого внедрения молекулярной эпидемиологии;

- разработка и внедрение в практику современных алгоритмов эффективного мониторинга за актуальными вирусными инфекциями, включающего оценку риска обострения эпидситуации и разработку профилактических мероприятий, направленных на поддержание благоприятной эпидобстановки;

- дальнейшее развитие исследований по разработке высокочувствительных методов и средств обнаружения и идентификации вирусных агентов в окружающей и производственной среде, пищевых продуктах, товарах для детей, парфюмерно-косметических средствах и другой эпидемически значимой продукции;

- анализ и разработка нормативной и методической документации (санитарных норм и правил, инструкций, методических указаний и т.п.) на основе современных достижений науки и гармонизации санитарного законодательства с действующими международными требованиями, стандартами и нормами, в том числе в рамках таможенного союза;

- изучение современных международных научных практик в области эффективного контроля за вирусными инфекциями в целях их внедрения в здравоохранение Беларуси;

- систематизация и развитие взаимодействия с профессиональными международными организациями и объединениями в области вирусологических исследований, в том числе расширение партнерства и осуществление совместных работ с зарубежными научными центрами, повышение результативности от участия в международных конференциях, симпозиумах, совещаниях;

- развитие потенциала по обучению зарубежных специалистов на базе научно-практических центров республики.

В качестве первоочередных действий по выполнению указанных задач представляется целесообразным осуществление следующих мероприятий:

1. Провести уже созданными профильными Советами (экспертным, лабораторным и др.) ресурсный анализ сил и средств учреждений санэпидслужбы, в т.ч. РНПЦЭМ (кадры, оборудование, нормативная и методическая база и т.д.), дать им оценку, сформулировать имеющиеся конкретные проблемы, разработать пути и механизмы их устранения.

2. Подготовить перечень первоочередных актуальных для практической службы тем НИР, требующих разработки и реализации в течение 2012–2015 гг., в том числе в рамках социальных заказов Минздрава.

3. Восстановить систему главных внештатных специалистов по бактериологии, вирусологии, паразитологии. Наделить их определенными полномочиями, в том числе правом оценки деятельности ЦГЭ по курируемым направлениям при проведении плановых ведомственных проверок ЦГЭ. Обязать главных специалистов ежегодно формировать перечень проблемных вопросов, требующих оперативного решения, в том числе научного сопровождения, в интересах отечественного здравоохранения.

4. Проработать юридические, экономические, правовые и другие аспекты для получения базового финансирования национальных центров и референс-лабораторий по микробиологии, функционирующих на базе РНПЦЭМ.

5. Разработать механизмы и форму оперативного внедрения научных результатов в практику, используя наработанный в советские времена опыт такой деятельности в виде научно-исследовательских работ в санитарно-эпидемиологической службе.

6. Повысить техническую оснащенность практических лабораторий, референс- и исследовательских лабораторий в соответствии с 4-уровневой организацией лабораторной службы на основе разработанного типового положения.

7. Усовершенствовать систему централизованных закупок препаратов для регионов, в том числе процедуру формирования заявок, проведения тендеров с привлечением в качестве экспертов квалифицированных специалистов из научных учреждений.

8. Разработать и внедрить стандарты лабораторных вирусологических исследований (по типу клинических протоколов), а также алгоритмы действий специалистов санитарно-эпидемиологической службы в условиях чрезвычайных ситуаций (вспышки вирусных инфекций и т.д.).

9. Усовершенствовать систему подготовки кадров в медицинских вузах, а также повышения квалификации специалистов высшего и среднего звена практического здравоохранения по современным проблемам инфекционных болезней, лабораторного дела, микробиологии, вирусологии и паразитологии.

Поступила 08.08.2011

CURRENT ISSUES OF IMPROVEMENT AND FURTHER DEVELOPMENT OF VIROLOGICAL RESEARCH IN THE FRAMEWORK OF SANITARY AND EPIDEMIOLOGICAL SERVICE OF PUBLIC HEALTH IN BELARUS

Amvrosieva T.V.[1], Ignatyev G.M.[1], Amvrosiev P.A.[2]

[1]Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Minsk Municipal Center for Hygiene & Epidemiology, Minsk, Belarus

The article presents a brief analysis of the current situation in the field of laboratory control of viral infections in the Republic of Belarus. Human and technical resources of Belarusian laboratory service are

analyzed, as well as the existing system of research planning and practical implementation of its results. Listed is a series of top-priority improvements as far as prevalent in Belarus viral infections scientific and laboratory surveillance is concerned.

Keywords: virus infections, laboratory control, scientific and virological surveillance.

ДИНАМИКА ЭВОЛЮЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕНА НЕЙРАМИНИДАЗЫ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ГРИППА А (H1N1) НА ПРОТЯЖЕНИИ 2009 ГОДА

Синюк К.В.[1], Титов Л.П.[2], Павлов К.И.[1], Грибкова Н.В.[2], Шмелёва Н.П.[2]

[1]Белорусский государственный медицинский университет;
[2]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Впервые проведен анализ динамики нуклеотидного полиморфизма последовательностей гена нейраминидазы штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1), выделенных в период с апреля по декабрь 2009 г. Определена степень синонимичности происходящих нуклеотидных замен. Установлена связь распределения нуклеотидного полиморфизма и показателей синонимичных и несинонимичных замен с функциональным значением и структурой кодируемой последовательности.

Ключевые слова: эволюция, нейраминидаза, пандемический грипп.

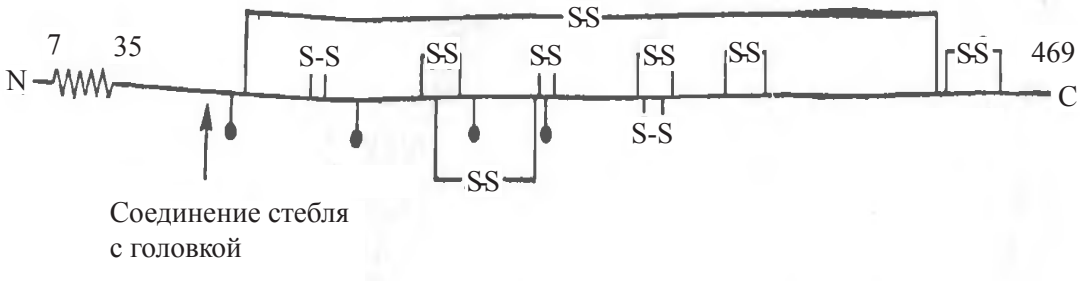
Введение. Актуальность проблемы изучения эволюции и эпидемиологии пандемического вируса гриппа А (H1N1) обусловлена отсутствием иммунной к антигенам возбудителя прослойки населения, что привело к быстрому распространению возбудителя в популяции человека. Так, за 4 месяца и 20 дней от первых случаев заболевания в 60 странах было зарегистрировано 182 166 пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом «мексиканского» гриппа А (H1N1) [1].Средний скрытый период и средний период заразности пандемического варианта соответственно составили 2,62 и 3,68 дня и не отличаются от таковых для сезонного гриппа [2]. Среднее число новых случаев заболевания, вызванных первичным случаем болезни, равно 1,31 для США и Мексики [2].

Малое время репликации, измеряемое часами, постоянное возникновение новых штаммов и их селекция, быстрый рост и снижение популяции в фазах эпидемического и резервационного преобразований обуславливают тесную связь молекулярной эволюции вирусов гриппа с их эпидемиологией и экологией [3, 4]. Происходящие в гемагглютинине и нейраминидазе мутации способствуют ускользанию вируса из-под иммунного пресса хозяина с образованием новых антигенных или лекарственно-устойчивых вариантов либо, при нарушении структуры и функции данных белков, снижают фитнес своих носителей и приводят их к исчезновению. Существует достаточное количество работ, посвященных антигенной изменчивости и филогении гемагглютинина, в то время как основным направлением изучения нейраминидазы является поиск новых ингибиторов активности данного фермента, что приводит к игнорированию ее эволюционных изменений.

Нейраминидаза представляет собой тетрамер, состоящий из 4 гомологичных субъединиц, основной функцией которого является специфическое отщепление остатка сиаловой (N-ацетилнейраминовой) кислоты от полисахаридов (как правило, галактозы) мембраны клетки, приводящее к разрушению рецепторов к вирусу на клетках организма-хозяина (рисунок 1). Биологическими функциями фермента считаются: 1) разжижение секретов слизистых оболочек, богатых сиаловой кислотой, для облегчения проникновения к эпителиоцитам; 2) препятствие агрегации гемагглютинина образованных вирусных частиц с остатками сиаловой кислоты на мембране клетки хозяина при выходе вирионов из клетки.

Изучение пространственной структуры нейраминидазы позволило установить, что функционально значимые аминокислоты расположены в недоступных для антител участках фермента либо доступны лишь в комплексе с аминокислотами, не влияющими на активность фермента [5]. Антигенные детерминанты нейраминидазы формируют практически непрерывную поверхность, расположенную на вершинах субъединиц и окружающую каталитический сайт. В нейраминидазе отдельных штаммов вируса гриппа А (H1N1) была зарегистрирована замена гистидина на тирозин в 275 положении, которая приводит к возникновению устойчивости к осельтамивиру с сохранением

ингибирования каталического сайта занамивиром [6]. Изучение изменений, произошедших на нуклеотидном и аминокислотном уровнях нейраминидазы пандемического варианта, позволит разработать модель эволюции вируса, попавшего в восприимчивую популяцию хозяина, и сравнить ее с изменениями, характерными для циркулирующих сезонных вариантов гриппа.



Зубчатая линия — домен, пронизывающий вирусную оболочку

Рисунок 1 — Схематическое изображение первичной структуры нейраминидазы вируса гриппа

Цель исследования: изучить характер и определяющие факторы динамики эволюционных изменений гена нейраминидазы изолятов пандемического вируса гриппа А (H1N1), выделенных в 2009 г.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования были использованы 1086 полных (длиной 1410 нуклеотидов) последовательностей гена нейраминидазы штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1), взятых из базы данных NCBI Nucleotide Database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore). Данные штаммы были изолированы у пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом из стран различных частей света (за исключением Африки) с апреля по декабрь 2009 г.

Для анализа нуклеотидного полиморфизма в программе DnaSP v5 рассчитывали число нуклеотидных замен на один сайт. Данный показатель также рассчитывался для отдельных участков последовательностей методом «скользящего окна» [7] с длиной окна в 99 нуклеотидов и длиной шага в 24 нуклеотида. Также определялось отношение аллелей к секвенированным последовательностям, показывающее процент уникальных аллелей от общего числа секвенированных. Анализ числа синонимичных и несинонимичных нуклеотидных замен, синонимичных и несинонимичных сайтов производился программой MEGA 5 [8] на основе метода Нея-Годжобори. Число синонимичных и несинонимичных замен рассчитывалось для отдельных участков последовательностей методом «скользящего окна» с аналогичными вышеуказанным параметрами.

Полученные данные были обработаны методами описательной статистики, корреляция показателей определялась по коэффициенту Пирсона, определение достоверности коэффициента корреляции и достоверности разницы показателей производилось по критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Вычисленное число нуклеотидных замен на один сайт в изучаемых последовательностях гена нейраминидазы возрастает в 3 раза ($p<0,01$) к последнему месяцу по сравнению с первым (рисунок 2). Полученная тенденция характеризуется высоким коэффициентом регрессии ($R^2 = 0,72$) и объясняется увеличением размеров популяции вируса и, соответственно, увеличением генетического материала, в котором происходят мутации. Различаются и показатели полиморфизма в различных регионах Земли. Так, за изучаемые месяцы показатель числа нуклеотидных замен на один сайт для стран Северной Америки равен 0,002, для стран Азии — 0,0023. Аналогичный показатель для Европы отличается ($p<0,01$) от таковых для стран Северной Америки, Азии и составляет 0,0034. Такое различие в полученных значениях может объясняться неравномерным распределением секвенированных последовательностей во времени. Так, большая часть последовательностей, относящихся к странам Северной Америки, была получена в первые два месяца пандемии, в странах Европы основная масса последовательностей была секвенирована в июне и июле, октябре и ноябре, что привело к накоплению более филогенетически далеких вариантов гена нейраминидазы, чем в Америке.

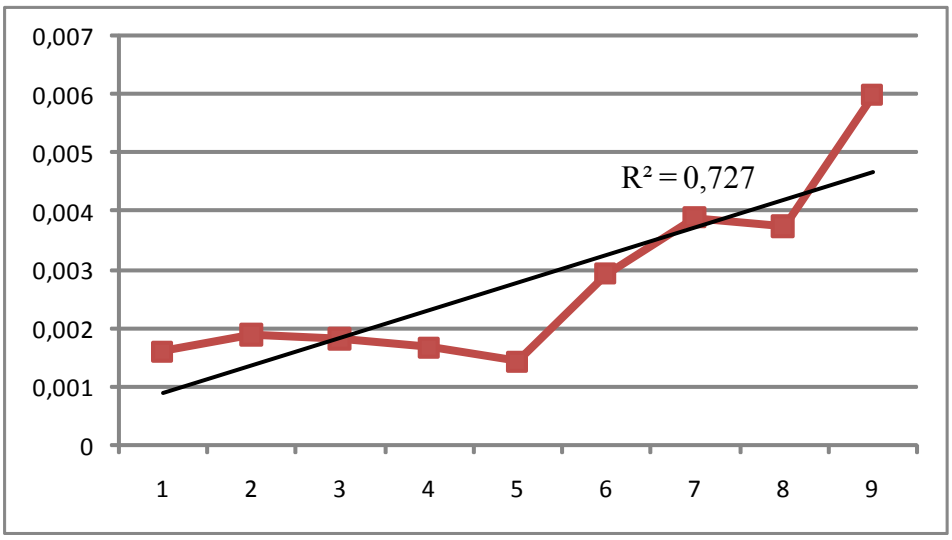


Рисунок 2 — Динамика числа нуклеотидных замен на один сайт в изучаемых последовательностях

На значительное разнообразие гена нейраминидазы указывает отношение аллелей к секвенированным последовательностям, минимальное значение которого равно 82,9% (август), максимальное — 99,1% (декабрь). В течение периода сентябрь–декабрь данный показатель превышает 97,0%, что ниже аналогичных значений для предыдущих месяцев, кроме мая (91,8%), которые находятся в интервале от 82,9 до 88,9%. Данное увеличение аллельного разнообразия соответствует увеличению числа нуклеотидных замен на один сайт с сентября по декабрь. Сильная положительная корреляционная связь ($r = 0,85 \pm 0,2$; $p < 0,001$) между числом нуклеотидных замен на один сайт и отношением аллелей к секвенированным последовательностям, а также возрастание обоих показателей в течение времени указывают на увеличение разнообразия гена нейраминидазы в период пандемического распространения вируса гриппа А (H1N1).

Одной из важных характеристик эволюционного процесса является определение силы и направления селекции, происходящей в нуклеотидной последовательности. Консервативные последовательности, находятся, как правило, под действием стабилизирующего отбора, который характеризуется преобладанием синонимичных замен над несинонимичными. Данное преобладание способствует сохранению неизменности вторичной структуры и, соответственно, активности фермента, так как синонимичные замены не приводят к смене кодируемой аминокислоты. Полученные средние значения (таблица) синонимичных и несинонимичных сайтов для изучаемых последовательностей гена нейраминидазы не имеют тенденции к увеличению или уменьшению на протяжении времени.

Таблица — Динамика средних значений синонимичных и несиноничных сайтов, синонимичных и несинонимичных замен, dS и dN в изучаемых последовательностях гена нейраминидазы

	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь	Декабрь
Синонимичные сайты	311,6	311,5	309,5	310,0	311,3	311,3	311,3	311,3	311,2
Несинонимичные сайты	1095,4	1095,4	1008,4	1088,0	1095,6	1095,6	1095,6	1095,6	1095,7
Синонимичные замены	0,832	1,076	1,42	1,536	1,456	2,829	3,406	3,71	4,896
Несинонимичные замены	1,443	1,618	1,007	0,784	0,551	1,317	2,083	1,533	3,555
dS[1]	0,0027	0,0035	0,0046	0,0050	0,0047	0,0091	0,0109	0,0119	0,0157
dN[2]	0,0013	0,0015	0,0010	0,0007	0,0005	0,0012	0,0019	0,0014	0,0032

Примечание:
1. [1] — соотношения числа синонимичных замен к синонимичным сайтам.
2. [2] — соотношение числа несинонимичных замен к несинонимичным сайтам

Динамика средних показателей синонимичных замен имеет достоверную ($p < 0,001$) тенденцию к возрастанию (рисунок 3): с высоким значением коэффициента регрессионного анализа ($R^2 = 0,905$). Сильная положительная связь ($r = 0,98 \pm 0,097$; $p < 0,001$) между числом нуклеотидных замен на сайт и средними значениями синонимичных замен совместно с описанной тенденцией позволяет утверждать, что большинство накапливающихся замен имеют синонимичный характер.

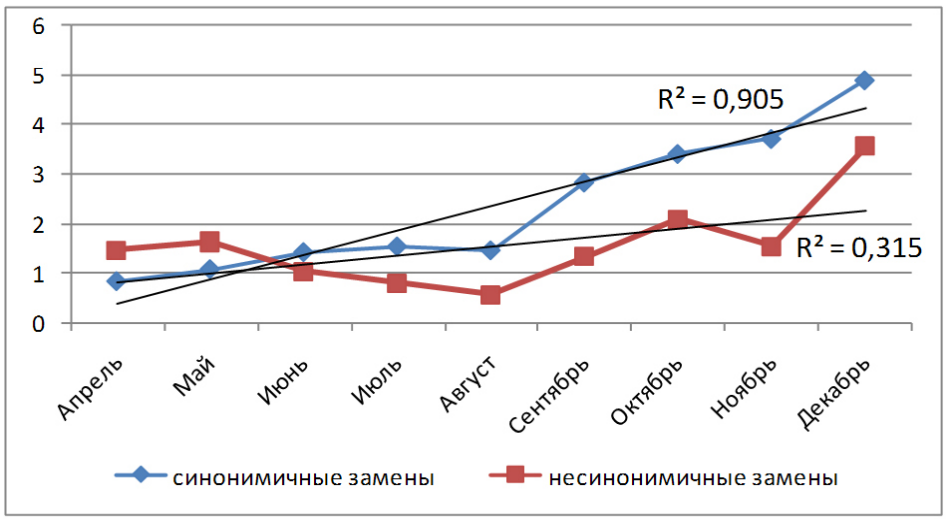


Рисунок 3 — Тенденции изменения средних значений синонимичных и несинонимичных замен в изучаемых последовательностях гена нейраминидазы

Динамика средних значений несинонимичных замен также характеризуется склонностью к возрастанию с достоверным ($p < 0,05$) различием между начальным и конечным уровнем, но с более слабовыраженной зависимостью ($R^2 = 0,315$). Существующая сильная положительная корреляционная связь ($r = 0,90 \pm 0,16$; $p < 0,001$) между значением нуклеотидных замен на один сайт и полученным показателем несинонимичных замен указывает на накопление мутаций, изменяющих аминокислотную последовательность, и, вероятно, структуру, нейраминидазы.

Для определения участков гена и молекулы нейраминидазы, в разной степени подверженных очищающей селекции, был проведен анализ распределения показателей нуклеотидного полиморфизма (рисунок 4), разницы соотношения синонимичных замен к синонимичным сайтам (dS) и соотношения несинонимичных замен к несинонимичным сайтам (dN) на протяжении изучаемых последовательностей (рисунок 5).

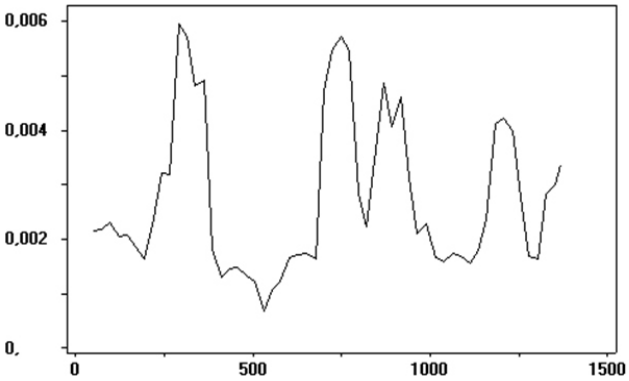


Рисунок 4 — Распределение нуклеотидной разницы на сайт на протяжении гена нейраминидазы в изучаемых последовательностях

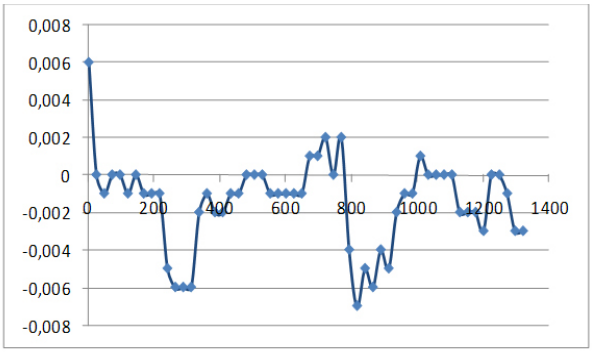
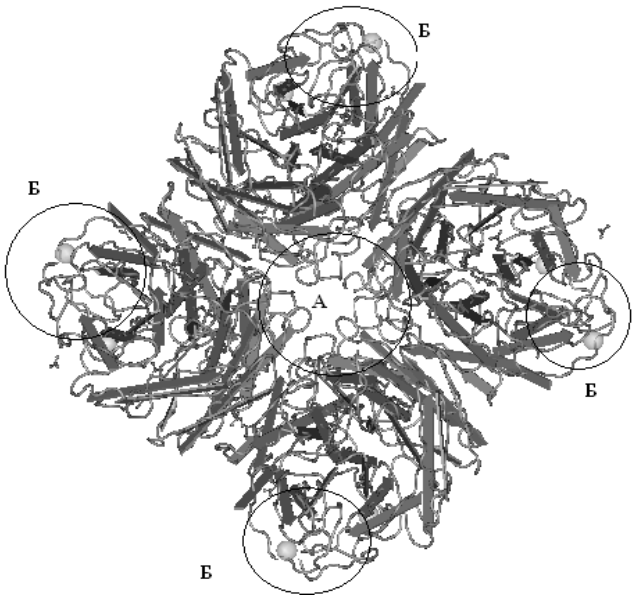


Рисунок 5 — Распределение разницы (dS–dN) на протяжении гена нейраминидазы в изучаемых последовательностях

Первый от начала гена участок, расположенный в интервале от 240 до 360 нуклеотидов, характеризуется значительным повышением уровня нуклеотидных замещений на сайт и выраженны-

ми отрицательными значениями разницы (dS – dN), что указывает на сочетание высокой мутабельности данного участка последовательности с закреплением несинонимичных замен, влияющих на структуру фермента. Этот участок гена кодирует регион белка, пространственно близкий к каталитическому сайту и описанный ранее как антигенный эпитоп (рисунок 6, А) [5]. Таким образом, наблюдаемая изменчивость обусловлена выработкой антител к данному региону белка, и направлена на ускользание из-под иммунного пресса хозяина. Преобладание dS над dN в начале последовательности гена (1–99 нуклеотидов) объясняется тем, что данный участок кодирует трансмембранную гидрофобную часть нейраминидазы и стебель, на котором располагается функциональный домен фермента. Изменение аминокислотного состава в данных регионах, особенно смена гидрофобной аминокислоты на гидрофильную, приведет к ухудшению связывания нейраминидазы с мембраной и нарушению ее пространственной ориентации.



Стрелками обозначены участки β-структуры, окружностями выделены участки, для которых установлено наличие действия движущего отбора

Рисунок 6 — Вторичная структура нейраминидазы пандемического вируса гриппа А (H1N1)

Второе значительное повышение полиморфизма разделено на два пика, первый из которых (696–768 нуклеотидов) характеризуется преобладанием соотношения синонимичных нуклеотидных замен и соответствующих сайтов над несинонимичными. Данный участок гена кодирует область фермента без определенной функциональной активности, расположенную на латеральной стороне субъединиц. Общим для данной области с описанным выше антигенным эпитопом является наличие α-спиральных структур. Второму пику возрастания полиморфизма в области 798–960 нуклеотидов соответствует увеличение dN по сравнению с dS, что указывает на возможную антигенность данного эпитопа (рисунок 6, Б). Вторичная структура области молекулы, кодируемой данным участком гена, представляет собой чередования α-спиралей и β-структур. Увеличение dN по сравнению с dS, а также увеличение нуклеотидных замен на один сайт характерно также для концевого участка гена. Ранее было описано прямое соответствие между вариантами нейраминидазы N9 по аминокислотным заменам и серовариантами, которые были определены на основе связывания фермента с моноклональными антителами [9]. Данная область молекулы также представляет собой чередование α- и β-структур, которые, вероятно, формируют уникальную пространственную конфигурацию с антигенными свойствами. Наличие α-спиралей в перечисленных структурах также обусловлено гидрофильностью образующих их аминокислот, которая определяет расположение спиралей на поверхности глобулы и доступность для антител.

Выводы:

1. Результаты изучения полиморфизма последовательностей гена нейраминидазы пандемического гриппа А (H1N1) свидетельствуют о достоверно выраженной тенденции к его росту на протяжении 2009 года.

2. Аллельное разнообразие нейраминидазы также увеличивается к последним месяцам 2009 г. и ассоциировано с численностью произошедших нуклеотидных замен. Возникавшие и накапливающиеся нуклеотидные замещения носили преимущественно синонимичный характер.

3. Участки гена нейраминидазы с преобладанием несинонимичных замен над синонимичными и более высоким показателем нуклеотидных замен на сайт кодируют антигенные эпитопы молекулы нейраминидазы или поверхностно расположенные участки ассоциированные с α-спиральной структурой.

Литература

1. Pandemic (H1N1) 2009 — update 62 (revised 21 August 2009) [Electronic resource] / WHO: Global Alert and Response (GAR). — Geneva, 2009. — Mode of access: http://www.who.int/csr/don/2009_08_21/en/index.html. — Data of access: 01.08.2011.

2. Estimated epidemiologic parameters and morbidity associated with pandemic H1N1 influenza / A.R. Tuite [et al.] // Can. Med. Assoc. J. — 2010. — Vol. 182. — P. 131–136.

3. Титов, Л.П. Геномико-протеомические основы эволюции и молекулярной эпидемиологии вирусов / Л.П. Титов, В.И. Вотяков // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2011. — № 1. — С. 109–124.

4. Титов, Л.П. Вирусы, вироиды, прионы: эволюция, строение, таксономия и номенклатура / Л.П. Титов, В.И. Вотяков // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2008. — № 4. — С. 26–37.

5. Colman, P.M. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase / P.M. Colman, J.N. Varghese, W.G. Laver // Nature. — 1983. — Vol. 303. — P. 41–44.

6. Emergence of oseltamivir-resistant pandemic H1N1 virus during prophylaxis / M. Baz [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2009. — Vol. 361 — P. 2296–2297.

7. Титов, Л.П. Компьютерная иммунология: сравнительный анализ замен нуклеотидных последовательностей CDR и FR фрагментов VH генов иммуноглобулинов больных гепатитом С, криоглобулинемией и лимфомами / Л.П. Титов, Е.А. Столярова, Т.А. Столярова // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2010. — № 3. — С. 10–18.

8. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. — 2011. — Vol. 28, N 10. — P. 2731–2739.

9. Antigenic structure and variation in an influenza virus N9 neuraminidase / R.G. Webster [et al.] // J. Virol. — 1987. — Vol. 61, N 9. — P. 2910–2916.

Поступила 02.08.2011

DYNAMICS OF EVOLUTIONARY CHANGES OF PANDEMIC INFLUENZA GENE NEURAMINIDASE IN 2009

Siniuk K.V.[1], Titov L.P.[2], Pavlov K.I.[1], Gribkova N.V.[2], Shmeleva N.P.[2]

[1]Belarusian State Medical University;
[2]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

Here we present nucleotide polymorphism analysis of neuraminidase genes, collected from strains of pandemic influenza (2009 H1N1) isolated in 2009. Synonymy of occurring nucleotide substitutions was inferred. Correlation between nucleotide polymorphism and level of synonymous substitutions distribution and structure with its functional value was defined.

Keywords: evolution, neuraminidase, pandemic influenza.

ВАРИАЦИОННОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И МУТАЦИОННОЕ ДАВЛЕНИЕ ГЕНА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА A/CALIFORNIA/04/2009(H1N1)

Павлов К.И., Титов Л.П., Синюк К.В., Грибкова Н.В., Шмелёва Н.П.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

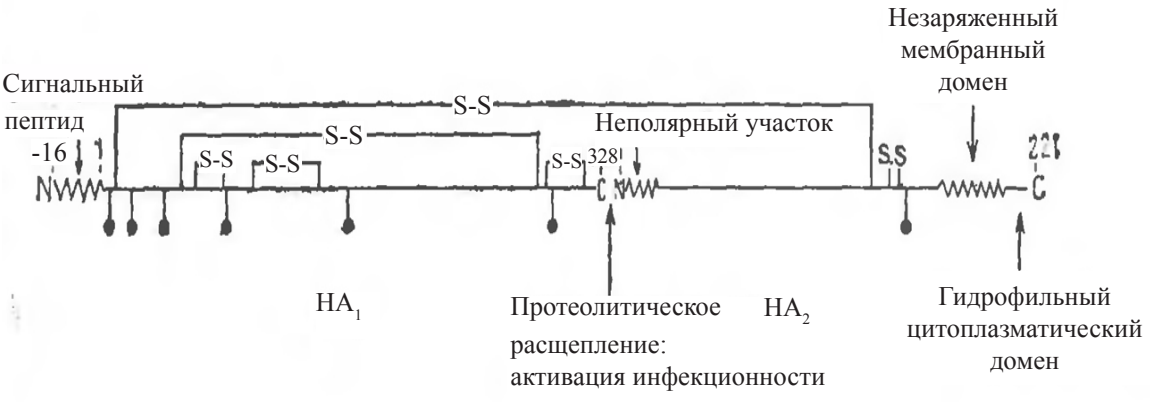
Резюме. После пандемии H1N1 2009 было собрано большое количество полных нуклеотидных последовательностей гена гемагглютинина — ключевой антигенной детерминанты, что позволило сформировать объективную выборку и изучить нуклеотидный полиморфизм и филогенетическое разнообразие. Было выявлено, что за период с 01.04.2009 по 31.12.2009 отмечалось накопление

как синонимичных, так и несинонимичных нуклеотидных замен с формированием филогенетического разнообразия и множества квазивидов. Наиболее вариабельным оказался участок, кодирующий Ca-эпитоп, при относительной интактности Sa-и Sb-эпитопов. Большинство произошедших аминокислотных замен полипептида были консервативны по физико-химическим свойствам и показателю разности гидрофобностей. Выраженное колебание GC-содержания нуклеотидных последовательностей не наблюдалось.

Ключевые слова: вирус гриппа, пандемия, гемагглютинин, эволюция.

Введение. Пандемическое распространение нового генетического варианта вируса гриппа A H1N1/California 2009 создало серьезную угрозу для популяции человека. Предварительные итоги и уроки пандемии свидетельствуют о достаточно выраженном эпидемическом потенциале данного вируса, быстром распространении, большом числе тяжелых случаев инфекции, повсеместном возникновении кластеров инфекции (групповых вспышек) и повышенной летальности. Характер динамики распространения данного инфекционного агента, вероятно, обусловлен как высокой прослойкой восприимчивого населения на разных континентах, интенсивными миграционными процессами людей, так и молекулярно-биологическими особенностями и фитнесом возникшего вируса. Геномические и иммунобиологические характеристики вируса, вызвавшего пандемию, и его потенциал изучены недостаточно.

Генетическая информация вируса гриппа А зашифрована в 8 сегментах одноцепочечной РНК. Они кодируют 7 белков — PB1, PB2, PA, HA, NA, NP и M1. Ключевая роль в антигенной изменчивости вирусов гриппа принадлежит поверхностному гликопротеину гемагглютинину (HA) [1–4], который зафиксирован в перикапсиде в виде гомотримера и отвечает за взаимодействие с сиалорецепторами эпителия дыхательного тракта хозяина. Гемагглютинин состоит из двух фрагментов HA1 и HA2 (рисунок 1). HA1 содержит сигнальный пептид, стебель и глобулу, HA2-фрагмент характеризуется конформационным изменением молекулы, влияя на слияние перикапсида с мембраной клетки. В глобуле локализуется 4 антигенных сайта (эпитопа). Sa- и Sb-эпитопы расположены возле рецепторного кармана, а Ca (состоящий из 5 фрагментов) и Cb расположены в областях, где аминокислотная цепь образует петли, выступающие из поверхности глобулы. Возникающие в этих сайтах мутации по типу антигенного дрейфа определяют сезонную вариабельность популяций вирусов гриппа, интенсивность эпидемического процесса, стимуляцию определенных клонов B- и T-лимфоцитов. Антитела, вырабатываемые к этим фрагментам в ходе иммунного ответа на инфекцию, соответственно, и определяют выраженность протективного иммунитета [4].



-S-S- — дисульфидные мостики; вертикальные черточки с черным кружком — сайты присоединения углеводов

Рисунок 1 — Схематическое изображение первичной структуры HA-белка вируса гриппа

После получения первых просеквенированных последовательностей (Porter, Barber, Carey, 1979) вирус гриппа стал одним из основных объектов в исследованиях молекулярной эволюции и эпидемиологии (Bush, 1999; Holmes, 2005; Zhou, 2005; Kryazhimskiy, 2008). Однако скорость накопления фактических первичных данных (изоляты, нуклеотидные последовательности, данные классической эпидемиологии) по-прежнему преобладают над их глубоким анализом и интерпретацией.

В ряде работ последних лет анализировалась как вся совокупность доступных последовательностей (Plotkin, Dushoff, 2002; Wang, Smith, 2010), так и выборка определенных штаммов, зачастую именно пандемических (Both, 1983; Jhang-Wei, 2011; Huang, 2009). Наиболее оптимальны для таких исследований полные и равные по длине последовательности, которых, к тому же, имеется еще и достаточное количество. При изучении неполных последовательностей или фрагментов возможно, конечно, выравнивание и анализ только совпадающих участков, как, в частности, было сделано для HA-молекулы H3N2-вируса [3]. Однако такой фрагмент не большой и не дает представления о функциональной изменчивости молекулы, а также невозможен для проекции 3D-структуры. Полные по длине последовательности гена гемагглютинина длиной 1701 нуклеотидов (как и в H1N1 2009) проанализированы Igarashi с реконструированного A/South Carolina/1/1918 до A/Brisbane/59/2007 с построением 3D-структуры (сравнивался и пандемический штамм 2009 года) [5], но подобная выборка содержит иногда по 1 штамму на 10 лет, что не дает полного представления о картине мутагенеза.

В динамике развития пандемии гриппа А 2009 г. в разных странах мира вирусологическими лабораториями в режиме реального времени от пациентов с пандемическим гриппом выявляли генетический материал вируса гриппа А, осуществлялось как полногеномное, так и сегментарное секвенирование генома, накоплено огромное количество полных сиквенсов, что является первичным и удобным материалом для проведения филогенетического анализа, оценки популяционного разнообразия и трансформации пандемического штамма в сезонный, оценки тенденций молекулярной эволюции патогена.

Цель настоящей работы — изучение темпов дивергенции, характера нуклеотидных замен в последовательностях гена гемагглютинина пандемического вируса A/California 2009 и оценка мутационного давления за период интродукции вируса в популяцию человека.

Материалы и методы. Источник нуклеотидных последовательностей — Influenza Research Database и Influenza virus resource, NCBI. В данной работе были использованы только *полные* нуклеотидные последовательности гена HA пандемических штаммов длинной 1701 нуклеотидов, изолятов из 35 стран мира. Сроки выделения штаммов: 01.04.2009–31.12.2009 — течение пандемии. При изучении *мутационного давления* [6, 7] в выборку были включены также вирусы, аналогические пандемическим, выделенные от животных в данный период, содержащие информацию о месяце выделения (расширенная выборка составила 1370 сиквенсов). Для исследования были отобраны *все* сиквенсы, подходящие по обозначенным критериям, содержащиеся в базе данных NIH (NIAID) на 01.05.2011. Соответственно, при составлении выборки последовательностей гена HA в название была добавлена *дата выделения штамма*. За первые 6 недель вирус распространился в 213 странах мира по глобальным коммуникациям. Пик заболеваемости гриппом для большинства регионов мира приходится на ноябрь 2009 г. В 2009 г. имеют место два пика сбора образцов и секвенирования — апрель и ноябрь. При изучении полиморфизма нуклеотидных последовательностей и филогении использованы только штаммы, выделенные от людей с указанием дня и месяца выделения вируса (всего 1170).

Анализ нуклеотидных последовательностей осуществлялся с помощью пакета программ MEGA 5. Полиморфизм нуклеотидных последовательностей оценивался при помощи программы DnaSP 5.10.01. Подсчеет GC-показателей произведен в пакете программ MEGA 5, а также алгоритмами VVK34 и VVK Consensus. Исследовался коэффициент корреляции между общим GC-содержанием и GC-содержанием в каждой позиции кодонов. Для подтверждения полученных результатов было рассчитано среднее 1GC, 2GC, 3GC, GC, отдельно G- и C-показатели содержания для каждого месяца (исходя из количества собранных за этот месяц последовательностей), для объективизации результатов расчет велся в абсолютных числах нуклеотидов, тенденция оценивалась по направлению линейного тренда и значениям стандартного отклонения и доверительного интервала. Оценка характера аминокислотных замен проводилась по критериям Снита, Волькенштейна и Бачинского [8]. Метод Снита появился в 1966 г. и базируется на оценке всех изученных к тому моменту физико-химических свойств аминокислот (наличие/отсутствие –OH-групп, растворимость L-изомеров, наличие бензольного кольца, свободные электроны и т.д.) на положение в белковой макромолекуле. При этом все эти признаки априори приняты как равнозначные. Если коэффициент Снита больше 0,416, то замена одной аминокислоты на другую считается консервативной, если меньше — то радикальной [8]. Волькинштейн предложил использовать

разность гидрофобностей в качестве показателя взаимозаменяемости аминокислот. Для этого пользуются шкалой гидрофобностей аминокислот, установленной Танфордом. Замена считается консервативной при разности гидрофобностей менее 1,28 ккал/моль для замен в целом и 1,22 ккал/моль для одношаговых замен. Бачинский в 1976 г. предложил «показатель функциональной близости аминокислот» при их заменах. Показатель этот получен при анализе аминокислотных замен в изофункциональных белках. Матрицы изофункциональных замен построены с использованием 28 семейств белков. Замена одной АК на другую считается консервативной при ФБА больше 12,4 для одношаговых замен. При этом за анцестральный штамм был взят Influenza A virus (A/Mexico/3955/2009(H1N1). Филогенетический анализ осуществлялся с использованием метода связывания ближайших соседей (Neighbour-joining). Эволюционные дистанции измерялись при помощи метода Maximum Composite Likelihood. Визуализация филогенетических деревьев осуществлялась с помощью программы FigTree v.1.3.1.

Полученные данные были обработаны методами описательной статистики, для оценки корреляции использовался коэффициент регрессии.

Результаты. При изучении полиморфизма нуклеотидных последовательностей заметно возрастание количества вариабельных сайтов, причем как синглетонных, так и парсимоничных с течением пандемии (рисунок 2). Установлено, что при попадании вируса в новую для себя популяцию хозяина, происходило вовлечение все большего числа сайтов в мутационный процесс по мере распространения среди восприимчивой части населения. Среднее число нуклеотидных замен на последовательность *(k)* также поступательно повышается (от 3,442 в апреле до 8,756 в декабре), что говорит о накоплении в популяции происходящих по вариабельным сайтам мутаций.

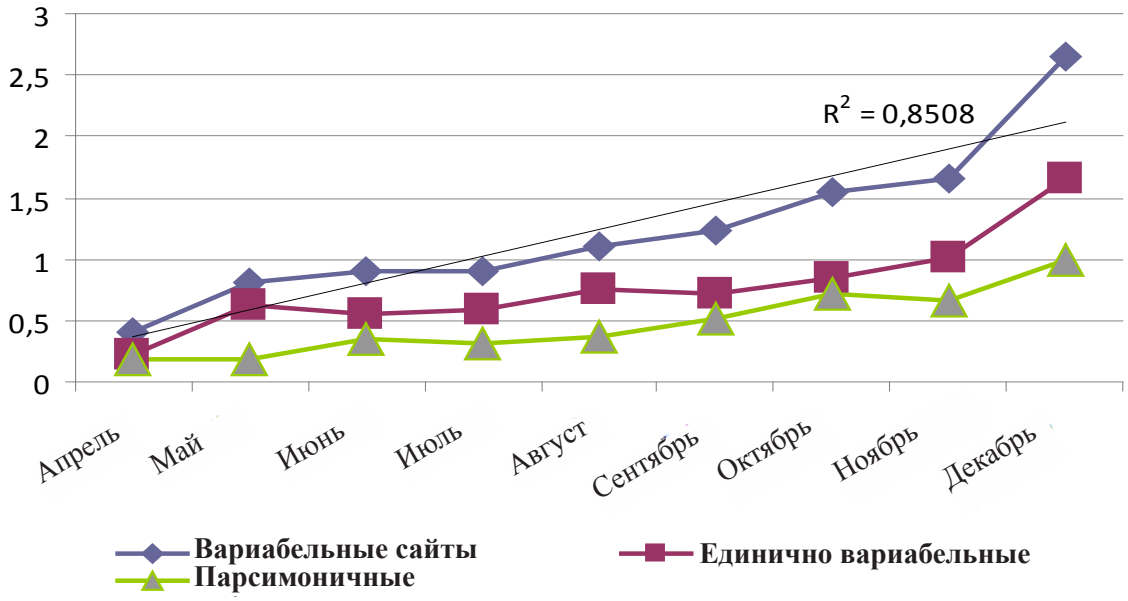


Рисунок 2 — Динамика нарастания количества вариабельных сайтов

Показатели вариабельности существенно изменяются в зависимости от количества сиквенсов, приходящихся на определенный месяц. Поэтому показатели полиморфизма дополнительно делились на число имеющихся за данный месяц последовательностей (рисунок 2).

Значительный интерес представляет внутримолекулярная вариабельность гемагглютинина [6, 7], особенно его иммунодоминантных эпитопов. При определении наиболее вариабельных участков нуклеотидной последовательности резко превалирует один из эпитопов — Ca, показатель нуклеотидных замен на сайт в котором почти в три раза выше, чем во всей остальной последовательности (рисунок 3). Такая закономерность сохраняется как при использовании всей выборки, так и при составлении равного количества нуклеотидных последовательностей за каждый месяц (1370 и 90 сиквенсов соответственно). Относительно всей молекулы высок также уровень нуклеотидных замен на сайт в сигнальном участке. Интактными выглядят Sa- и Sb-эпитопы, расположенные в области рецепторсвязывающего кармана. Любопытна также меньшая активность в участках, кодирующих

глобулу, сравнительно с фрагментами, кодирующими стебель, трансмембранный домен и конформационно перестраивающийся HA2-участок молекулы.

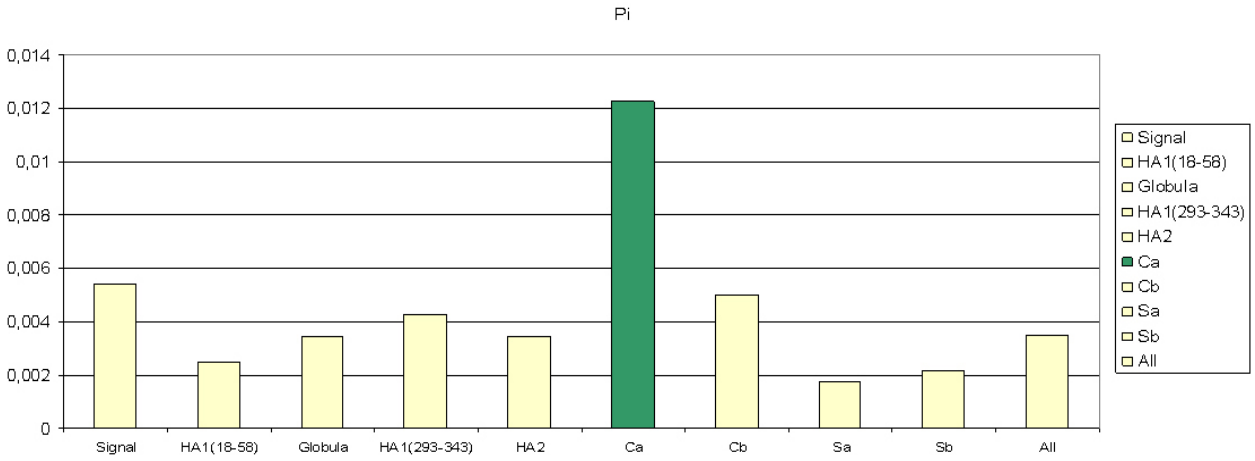


Рисунок 3 — Число нуклеотидных замен на сайт внутри молекулы гена гемагглютинина

При оценке синонимичных и несинонимичных нуклеотидных замен данный эпитоп также резко выделяется на фоне всей молекулы (рисунок 4). Разность средних значений показателей синонимичных и несинонимичных аминокислотных замен (dS – dN) является отрицательным числом, т.е. несинонимичные нуклеотидные замены значительно преобладают. Следовательно, преобладают аминокислотные замены. Число нуклеотидных замен на сайт для Sa- и Sb- эпитопов ниже, чем в целом по молекуле. Глобула, рассматриваемая как основной накопитель мутаций, не преобладает над фрагментами стебля.

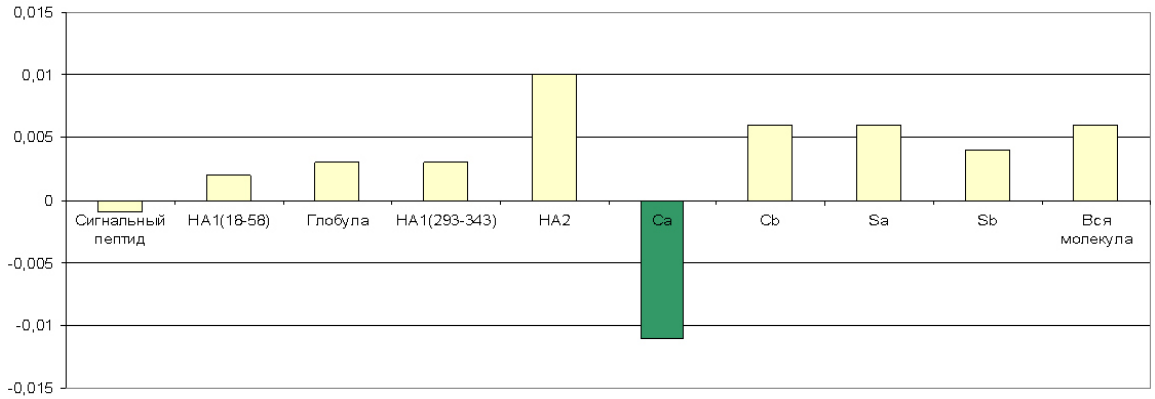


Рисунок 4 — Разность между уровнями синонимичных и несинонимичных нуклеотидных замен в молекуле гена гемагглютинина

Корреляция между динамикой Pi и аминокислотных замен (R^2 = 0,910) говорит о высоком уровне несинонимичности замен и накоплении аминокислотных изменений в молекуле HA за данный период. Оценка характера аминокислотных замен проводилась после филогенетического анализа с каждым верхним и нижним сиквенсом выявленных трех больших клайдов со штаммом A/Mexico/3955/2009(H1N1). В 97,43% случаев аминокислотные замены были консервативны по своим физико-химическим свойствам (критерии Снита и Бачинского) и показателю разности гидрофобностей (критерий Волькенштейна), что говорит о значительной функциональной консервативности структуры молекулы гемагглютинина и стабилизирующем отборе.

Мутационное давление — важный фактор молекулярной эволюции — характеризуется увеличением или снижением GC-содержания всего генома и отдельных позиций кодонов. Для оценки этого фактора исследовалась корреляция колебания GC-содержания генома в целом и каждой позиции кодонов (рисунок 5).

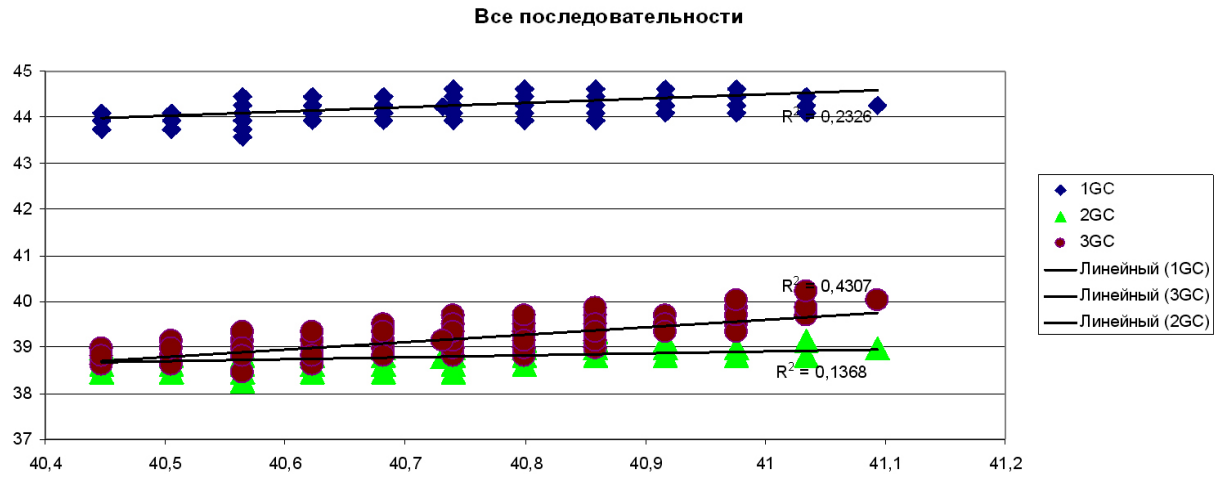


Рисунок 5 — Корреляция GC трех позиций кодонов и общего GC-содержания

Значительной корреляции с общим GC-содержанием не наблюдается ни для одной позиции кодонов: для первой позиции кодонов $R^2 = 0,231$, для второй — $R^2 = 0,1362$, для третьей — $R^2 = 0,4307$. Таким образом, только для третьей позиции кодонов прослеживается некоторая корреляция. При изучении средних GC-показателей, рассчитанных в абсолютных числах нуклеотидов, отмечается рост 3GC-уровня (с 221,4 GC-нуклеотидов в апреле до 222,3 GC-нуклеотидов в декабре) на 0,9 нуклеотида. Общие GC- и 2GC-показатели остаются практически неизменными. 1GC-уровень снижается (с 251,4 GC-нуклеотидов в апреле до 250,8 GC-нуклеотидов в декабре) на 0,6 нуклеотида. Однако на данные расчеты значительное влияние оказывает имеющееся за месяц число последовательностей (что выражается в больших значениях доверительного интервала). Тем не менее вариабельность 1GC-показателя говорит о несинонимичности нуклеотидных замен [7].

Филогенетический анализ всей выборки выявил широкую дивергенцию образованием большого количества жизнеспособных субклайдов (рисунок 6, А). При изучении филогении для отдельных эпитопов также наблюдается дивергенция с появлением закрепившихся в популяции мутантов, причем для Са-эпитопа эта дивергенция гораздо шире, чем в других эпитопах (рисунок 6, Б, В). Отмечается значительное расширение многообразия популяции пандемического вируса, образование многочисленных жизнеспособных субклайдов, содержащих свободно циркулирующие в популяции квазивиды.

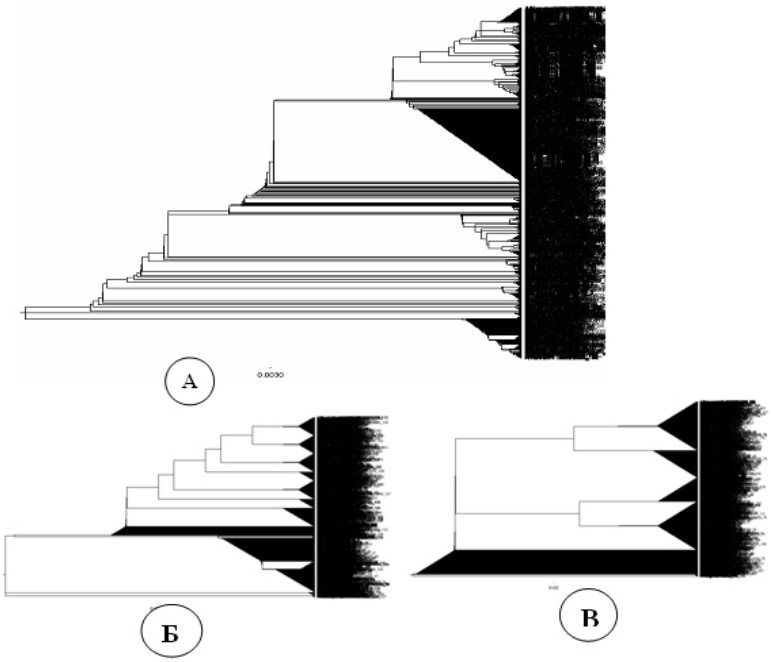


Рисунок 6 — Сравнение филогенетического разнообразия в Са (А) и Cb (Б) эпитопах и всей молекуле (В)

Обсуждение. Полученные данные о высоких темпах как синонимичных, так и несинонимичных нуклеотидных замен последовательностей гена гемагглютинина для пандемических вирусов H1N1 2009 совпадают с имеющимися данными анализа всей совокупности предыдущих сиквенсов [3]. Отбор для H3N2-пандемии с 1968 по 1990 и особенно с 1990 по 2007 гг. шел в направлении сохранения одной доминирующей линии, без явления совместной циркуляции разнообразных изолятов [1, 4]. Поэтому, можно предположить дальнейшее урезание полученной ветвистой дендрограммы (рисунок 6, А) и элиминацию большинства возникших квазивидов. Отмеченная взаимозаменяемость аминокислотных замен (критерии Снита, Волькенштейна, Бачинского) рассчитана только в крайних последовательностях кластеров дендрограмм и не учитывает все мутации тем не менее указывает на структурно-функциональную консервативность молекулы гемагглютинина.

Участки, кодирующие иммунодоминантные эпитопы, подвергаются более сильному селекционному давлению, чем остальная часть молекулы (рисунок 7). Известно, что для птичьих вирусов антигенный дрейф не характерен — за год–два популяция полностью меняется и иммунологический пресс фактически отсутствует. В популяциях свиней дрейф идет гораздо медленнее, чем среди людей. В свете этого любопытна сравнительная интактность Sb- и Sa-эпитопов (рисунок 3), выявленная в ходе данной работы. Аналогичная картина наблюдалась в ранних известных потомках H1N1 1918 — A/Puerto Rico/8/1934 и A/Bellamy/1942 [5]. Причем уже в штаммах 50-х гг. содержатся значительные аминокислотные замены, как если изменения в Sa и Sb произошли в конце сороковых годов, более чем через 20 лет после пандемии 1918 г. [5].

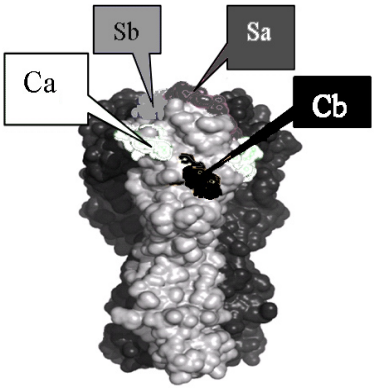


Рисунок 7 — Пространственная топография иммунодоминантных эпитопов гемагглютинина

В Ca-эпитопе, состоящем из 5 фрагментов (6+5+3+2+3 аминокислот), уровень нуклеотидных замен на сайт был довольно высоким (около 0,012). Возникает вопрос, чем можно объяснить такой высокий показатель мутаций, учитывая иммунологическую наивность популяции к штамму A/California/04/2009, и предположительно полное отсутствие иммунной прослойки в популяции? Как для выборки пандемических штаммов гена гемагглютинина 01.04.2209–31.12.2009, так и для аналогичной выборки последовательностей гена нейраминидазы не было отмечено значительной корреляции между общим GC-содержанием и GC в каждой позиции кодонов. Известно, что для вирусов гриппа (в отличие, например, от вирусов герпеса) колебания AT- и GC-содержания геномов не носят выраженный, тенденциозный характер и варьируются скорее в пределах неких усредненных показателей с незначительными подъемами и спадами.

Значительный интерес представляет дальнейшая филодинамика пандемического штамма при его трансформации в сезонный возбудитель эпидемий — как долго будет сохраняться возникшее генетическое разнообразие, какие субклайды окажутся наиболее жизнеспособными? В следующие несколько лет станет понятно, будет ли «мексиканский» вирус интенсивно мутировать или сохранит подобие анцестральному. Образовавшийся теперь иммунный пресс окажет определенное влияние на антигенный дрейф, в свете чего любопытно, сохранится ли и в дальнейшем мутационная интактность Sa- и Sb-эпитопов.

Заключение. Биоинформатический анализ выборки полных нуклеотидных последовательностей гена гемегглютинина пандемических штаммов H1N1 2009, собранных за период 01.04.2009–31.12.2009, выявил следующие закономерности:

1. Возникновение и накопление как синонимичных, так и несинонимичных нуклеотидных замен ассоциируется с повышением филогенетического разнообразия и формированием множества квазивидов вируса.

2. Большинство произошедших аминокислотных замен полипептида были консервативны по физико-химическим свойствам и показателю разности гидрофобностей.

3. Показатель нуклеотидных замен на сайт в участке, кодирующем Ca-эпитоп почти в три раза выше в сравнении с таковым для других фрагментов. Большинство этих замен несинонимичны, а наиболее мутационно-инертными оказались Sa- и Sb-эпитопы.

4. За период пандемии не отмечалось значительного колебания ни общего GC-содержания, ни GC-содержания трех позиций кодонов.

Литература

1. Antigenic drift in influenza virus-H3 hemagglutinin from 1968 to 1980 — multiple evolutionary pathways and sequential amino-acid changes at key antigenic sites / G.W. Both [et al.] / *J. Virol.* — 1983. — Vol. 48, N 1. — P. 52–60.

2. Predicting the evolution of human influenza A / R.M. Bush [et al.] / Science. — 1999. — Vol. 286, N 5446. — P. 1921–1925. doi: 10.1126/science.286.5446.1921.

3. Directionality in the evolution of Influenza A haemagglutinin / S. Kryazhimskiy [et al.] // Proc. R. Soc. B. — 2008. — Vol. 275. — P. 2455–2464.

4. Huang, J.W. Changed epitopes drive the antigenic drift for influenza A (H3N2) viruses / J.W. Huang, J.M. Yang // BMC Bioinformatics. — 2011. — Vol. 12, suppl. 1.— S31.

5. Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin / M. Igarashi [et al.]. — PLoS ONE. — 2010. — Vol. 5, N 1. — e8553. doi:10.1371/journal.pone.0008553

6. Титов, Л.П. Геномическо-протеомические основы молекулярной эволюции и молекулярной эпидемиологии вирусов / Л.П. Титов, В.И. Вотяков // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2011. — № 1. — С. 109–124.

7. Титов, Л.П. Вирусы, вироиды, прионы: эволюция, строение, таксономия и номенклатура / Л.П. Титов, В.И. Вотяков // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2008. — № 4. — С. 26–37.

8. Sneath, P.H. Relations between chemical structure and biological activity in peptides / P.H. Sneath // J. Theor. Biol. — 1966. — Vol. 12, N 2. — P. 157–195.

Поступила 02.08.2011

VARIATIONAL DIVERSITY AND MUTATION PRESSURE IN PANDEMIC STRAINS INFLUENZA VIRUS A/CALIFORNIA/04/2009(H1N1)

Pavlov K., Titov L., Sinuk K., Gribkova N., Shmeleva N.

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

After 2009 pandemic, there are a great number of complete influenza virus sequences stored at NCBI, including sequences with the same nucleotide length. So we formed HA gene complete sequences group from 01.04.2009 to 31.12.2009 for polymorphism estimation and phylogenetic analysis. We relived significant synonymous and nonsynonimous rate for nucleotide substitutions especially in Ca antigenic epitop, controversy to Sa and Sb epitops. Amino acid substitutions were mostly conserved in their physical and chemical features and hydrophoby. We relived small role for GC mutation pressure in HA gene evolution for this period.

Keywords: influenza virus, pandemic, hemagglutinin, evolution.

АССОЦИАЦИЯ РЕСПИРАТОРНОЙ ПАТОЛОГИИ ДЕТЕЙ С БОКАВИРУСОМ ЧЕЛОВЕКА

Сивец Н.В.[1], Шмелёва Н.П.[1], Сергиенко Е.Н.[2], Германенко И.Г.[2], Грибкова Н.В.[1]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;

[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Резюме. В результате исследований, проведенных в период с сентября 2010 г. по май 2011 г., была выявлена циркуляция бокавируса на территории Республики Беларусь. Методом ПЦР на наличие бокавируса человека было проанализировано 306 назофарингеальных мазков от госпитализи-

рованных детей. ДНК бокавируса была обнаружена в 25 образцах, полученных от детей в возрасте 1–4 лет (11 образцов в виде моноинфекции и 14 — как сочетанная инфекция). Заболевания, ассоциированные с бокавирусом, проявлялись разнообразием клинических симптомов и протекали в виде обструктивного бронхита, ларинготрахеита, ринофарингита, пневмонии.

Ключевые слова: бокавирус человека, диагностика, острые респираторные инфекции.

Введение. Острые респираторные инфекции (ОРИ) относятся к числу ведущих причин инфекционной патологии детей в возрасте до 5 лет. Ежегодно ОРИ становятся причиной смерти около 1,9 миллиона человек в мире [1]. Чаще всего респираторные заболевания у детей вызывают вирусы гриппа А и В, парагриппа, аденовирусы, рино- и респираторно-синцитиальный вирусы (RSV). В последние годы с использованием современных технологий у пациентов с респираторными инфекциями были обнаружены новые вирусы: метапневмо-, бока- и коронавирусы (NL63, SARS, HKU1) [2].

Бокавирус человека (human *Bocavirus*, HBoV) был выявлен в 2005 г. в Швеции у детей с острой респираторной инфекцией [2]. В результате анализа организации генома вновь идентифицированный вирус был отнесен к семейству *Parvoviridae*, подсемейству *Parvovirina*e, роду *Bocavirus*. Род *Bocavirus* объединяет 2 вируса: бычий парвовирус (bovine parvovirus, BPV) и минутный вирус собак (minute virus of canines, MVC). Название рода получено в результате комбинации первых двух букв «bo» из слова «bovine» и «ca» из слова «canine» [3]. Кроме HBoV, патогенным для человека также является парвовирус В19, который вызывает у человека хроническую гемолитическую анемию [4].

Геном бокавируса представлен односпиральной линейной молекулой ДНК. В настоящее время известно, что существует 4 генотипа бокавируса человека (HBoV1, HBoV2, HBoV3, HBoV4). HBoV1 выявляется в респираторных мазках у детей с острыми респираторными заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей. HBoV2–4 обнаруживается в фекальных образцах больных с симптомами острого гастроэнтерита [5]. Бокавирус человека циркулирует во всем мире, частота выявления у больных детей раннего возраста колеблется от 1,5 до 19% [6, 7]. Также описаны случаи выявления вируса у 1% здоровых лиц [7].

По данным литературных источников, бокавирусная инфекция характерна для детей первых трех лет жизни. Наиболее частыми клиническими симптомами, регистрируемыми у больных с бокавирусной инфекцией, являются кашель, ринорея, лихорадка, затрудненное дыхание. HBoV может вызывать поражения верхних и нижних дыхательных путей и протекать в виде ринита, острого среднего отита, тонзиллита, фарингита, ларинготрахеита, пневмонии, бронхиолита, острого или обструктивного бронхита [2, 7]. У взрослых острая бокавирусная инфекция наблюдается редко и была зарегистрирована только у лиц с иммунодефицитными состояниями [7].

Практически все вирусные заболевания респираторного тракта у детей имеют сходную клиническую симптоматику, поэтому использование современных методов диагностики играет решающую роль в подтверждении диагноза. Одним из таких перспективных методов исследований является полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая обладает высокой чувствительностью и позволяет в достаточно короткие сроки получить информацию о возбудителе заболевания. В настоящее время ПЦР является основным диагностическим методом для выявления бокавируса, поскольку пока не найдены лабораторная модель и культура клеток, на которых возможно дальнейшее изучение вируса.

Целью данного исследования явилось выявления циркуляции бокавируса на территории Республики Беларусь и определение возрастной структуры детей с бокавирусной инфекцией в период подъема респираторной заболеваемости в эпидемический сезон по гриппу 2010–2011 гг.

Материалы и методы. Исследования выполнены в лаборатории гриппа и гриппоподобных заболеваний РНПЦ эпидемиологии и микробиологии в период с сентября 2010 по май 2011 гг. Материалом для исследования служили носоглоточные мазки от детей с симптомами острого респираторного заболевания, полученные в первые дни после госпитализации в детскую инфекционную больницу г. Минска. Забор материала производили в стерильные пробирки, содержащие 2 мл транспортной среды. Затем образец замораживали и хранили при температуре –20 °С. Доставка образцов осуществлялась с соблюдением холодовой цепи в соответствии с инструкцией № 121-1210 от 18.01.2011 [8]. Каждый образец сопровождался направлением, содержащим паспортные данные больного, даты заболевания и забора материала, клинический диагноз. Возрастные группы детей сформированы согласно СанПиН № 132 от 12 октября 2010 г. [9].

Полученный материал исследовали методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Исследования проводили с использованием диагностических наборов «АмплиСенс» (Россия) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Детекцию продуктов амплификации проводили на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett research, Австралия).

Результаты и обсуждение. В результате проведенного исследования выявлена циркуляция бокавируса на территории Республики Беларусь. За анализируемый период было исследовано 306 носоглоточных мазков от детей, госпитализированных в стационар детской инфекционной больницы г. Минска с симптомами ОРИ. ДНК бокавируса была выявлена в 25 (8,2%) образцах. У детей, положительных на HBoV, наблюдалось инфицирование вирусом как в виде моноинфекции (11 случаев), так и в сочетании с другими возбудителями острых респираторных инфекций (14 случаев). Наиболее часто (7 случаев) диагностировалась сочетанная инфекция бока- и риновируса, затем бока- и метапневмовируса (3 случая), далее — бокавируса и вируса парагриппа 2 типа (2 случая), бока- и аденовируса (1 случай). Кроме того, был выявлен 1 случай инфицирования четырьмя возбудителями одновременно (бока-, адено-, риновирусами и вирусом парагриппа 4 типа). Частота выявления бокавируса в период с сентября 2010 по май 2011 гг. представлена в таблице 1.

Таблица 1 — Частота выявления бокавируса в период с сентября 2010 по май 2011 гг.

Месяц	Количество образцов	Количество положительных образцов, абс. знач.			Частота выявления, %
		HBoV-моноинфекция	HBoV-микстинфекция	Всего	
Сентябрь	28	1	2	3	11
Октябрь	46	4	8	12	26
Ноябрь	30	2	2	4	13
Декабрь	39	3	1	4	10
Январь	41	0	0	0	0
Февраль	55	0	0	0	0
Март	29	0	0	0	0
Апрель	27	1	1	2	7
Май	11	0	0	0	0
Итого	306	11	14	25	8,2

Как видно из приведенных в таблице 1 данных, максимальная частота выявления HBoV была отмечена осенью, а именно в октябре 2010 г. и составила 26%. В мазках, забранных в период с января по март 2011 г., генетический материал бокавируса не обнаружен. Обычно в это время в Республике Беларусь регистрируется эпидемия гриппа, и преимущественно наблюдается циркуляция вирусов гриппа [10]. В весенний период HBoV выявлялся в виде спорадических случаев.

Анализ возрастной структуры детей с HBoV, показал что наиболее частому инфицированию подвержены дети возрастной категории от 1 года до 4 лет. Из 25 детей, у которых был выявлен бокавирус, 23 ребенка относились к возрастной категории от 1 года до 4 лет. Также отмечено выявление ДНК бокавируса в виде спорадических случаев в назофарингеальных мазках, полученных от детей первого года жизни, тогда как в возрастных группах 5–14 и 15–17 лет случаев инфицирования бокавирусом не установлено (таблица 2).

Таблица 2 — Сравнительный анализ выявления бокавирусной инфекции у детей различных возрастных групп

Возрастная группа	Число обследованных детей	Число положительных образцов, абс. знач (%)
0–12 мес.	80	2 (2,5%)
1–4 лет	171	23 (13,5)
5–14 лет	46	0
15–17 лет	9	0
Всего:	306	25 (8,2%)

Известно, что бокавирус может вызывать респираторные заболевания верхних и нижних дыхательных путей с различными клиническими проявлениями у детей первых лет жизни [2]. В результате анализа клинических симптомов инфекции у детей с лабораторно подтвержденной бокавирусной инфекцией было выявлено, что у 13 детей заболевание протекало в виде обструктивного бронхита, у 6 детей — в виде ларинготрахеита, с ринофарингитом были госпитализированы 4 ребенка, с пневмонией — 2 ребенка. Таким образом, у большинства инфицированных детей наблюдалось поражение нижних отделов дыхательных путей. В основном заболевания протекали в легкой и средней степени тяжести, однако 3 ребенка, у которых был выявлен бокавирус, нуждались в лечении в отделении интенсивной терапии и реанимации.

Выводы. Результаты проведенного исследования указывают на циркуляцию бокавируса на территории Республики Беларусь. Максимальная частота выявления HBoV за анализируемый период была отмечена в октябре 2010 г. и составила 26%.

Сравнительный анализ распространения HboV среди детей различных возрастных категорий показал, что наиболее восприимчивыми к инфекции являются дети возрастной группы 1–4 лет, у детей старше 5 лет инфицирование HboV не выявлено.

Бокавирусная инфекция может иметь разнообразные клинические проявления с преимущественным поражением нижних дыхательных путей и протекать как в легкой, так и тяжелой форме.

Продолжение дальнейших исследований и проведение регулярного мониторинга циркуляции HboV на территории Республики Беларусь позволит получить более полную картину об эпидемиологических особенностях вируса и оценить его вклад в общую структуру возбудителей ОРВИ.

Литература

1. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections / B.G. Williams [et al.] // Lancet Infect. Dis. — 2002. — Vol. 2. — P. 25–32.

2. Human bocavirus and acute wheezing in children / T. Allander [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2007. — Vol. 44. — P. 904–910.

3. Schildgen, O. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? / O. Schildgen // J. Clin. Microbiol. — 2008. — Vol. 21. — P. 291–304.

4. Young, N.S. Parvovirus B19 / N.S. Young, K.E. Brown // N. Engl. J. Med. — 2004. — Vol. 350. — P. 586–597.

5. Real-time quantitative PCR detection of four human bocaviruses / K. Kantola [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2010. — Vol. 48. — P. 4044–4050.

6. Human bocavirus, a real respiratory tract pathogen / B. Zhenqiang [et al.] // Afr. J. Microbiol. Res. — 2007. — Vol. 1. — P. 51–56.

7. The human bocavirus role in acute respiratory tract infections of pediatric patients as defined by viral load quantification / G. Gerna1 [et al.] // New microbiologica. — 2007. — Vol. 30. — P. 383–392.

8. Комплексная диагностика гриппа: инструкция по применению: утв. Постановлением Главного гос. санитар. врача Респ. Беларусь 18.01.2011 № 121-1210.

9. Требования к проведению эпидемического надзора за острыми респираторными инфекциями в Республике Беларусь: санитарные нормы, правила и гигиенические нормативы: утв. Постановлением Мин-ва здравоохр. Респ. Беларусь 12.10.2010 № 132.

10. Шмелёва, Н.П. Чувствительность к арбидолу и ремантадину вирусов гриппа, циркулировавших на территории Республики Беларусь / Н.П. Шмелёва, Н.В. Грибкова // Здравоохранение. — 2008. — № 11. — С. 69–81.

Поступила 12.08.2011

ASSOCIATION OF CHILDREN RESPIRATORY PATHOLOGY WITH HUMAN BOKAVIRUS

Sivets N.V.[1], Shmialiova N.P.[1], Serhiyenka K.N.[2], Germanenka I.G.[2], Gribkova N.V.[1]

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2] Belarusian State Medical University, Minsk Belarus

Bocavirus circulation was detected in Republic of Belarus. The total 306 samples were analyzed for the period from September 2010 to May 2011. All respiratory samples from children were examined by PCR for human bocavirus. The bocavirus DNA was detected in 25 samples (11 samples were detected as a single infection and 14 as a co-infection). Bocavirus was detected only in children aged 1–4 years and showed a variety of clinical symptoms of diseases.

Keywords: human *Bocavirus,* diagnostics, acute respiratory infection.

РОЛЬ *PNEUMOCYSTIS JIROVECI* В ЭТИОЛОГИИ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ОСЛОЖНЕННЫМ ТЕЧЕНИЕМ В УСЛОВИЯХ СМЕШАННОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ У ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ

Корниенко М.Н., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Феклисова Л.В., Савицкая Н.А.

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России; Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

Резюме. Было обследовано 156 детей с ОРЗ в возрасте от 2 месяцев до 13 лет. Показано, что чаще всего (46,8%) выявлялась пневмоцистная инфекция. Установлено, что наиболее частым ассоциантом пневмоцисты является вирус Эпштейна — Барр. Подтверждена возможность возникновения семейного очага, где источником инфекции может быть любой член семьи.

Ключевые слова: оппортунистические инфекции, смешанные инфекции, ОРЗ, дети.

Введение. В настоящее время среди инфекционных заболеваний человека все чаще регистрируются смешанные инфекции, для которых характерен полиморфизм клинической картины, затрудняющий диагностику и оказание адекватной терапевтической помощи [1, 2]. Сложность диагностики смешанных инфекций связана с особой формой взаимоотношений возбудителей различного происхождения, обуславливающих их длительное сохранение и сопряженное развитие в инфицированном организме [3]. При смешанных инфекциях возбудители могут существенно изменять как свои свойства, так и свойства своих партенеров по инфекционному процессу, что особенно ярко проявляется при различных иммунодефицитных состояниях [4, 5]. Течение инфекционного процесса у таких больных значительно тяжелее и протекает с большим полиморфизмом клинической симптоматики.

Целью настоящего исследования стало изучение роли *Pneumocystis jiroveci* (*P. jiroveci*) и других возбудителей, а также их ассоциаций, в этиологии острых пневмоний и определение удельного веса пневмоцистной инфекции у детей.

Материалы и методы исследования. Обследовалось 156 детей больных острыми респираторными заболеваниями (ОРЗ) в возрасте от 2 месяцев до 13 лет, находившихся на стационарном лечении в отделении респираторной патологии Детской клинической больницы Св. Владимира. Среди клинических проявлений у детей преобладало затруднение дыхания. От каждого ребенка были получены сыворотка крови и мокрота.

Сыворотки крови детей исследовались методом ИФА на наличие специфических антител класса IgM и IgG к пневмоцисте, класса IgM VCA, IgG EA и IgG NA к вирусу Эпштейна — Барр (ВЭБ), класса IgM и IgG к цитомегаловирусу (ЦМВ), класса IgA, IgM и IgG к микоплазме (*M. pneumoniae*) и класса IgG к респираторно-синцитиальному вирусу (РСВ).

Образцы мокроты исследовались методами НРИФ и РИФ для определения антигена. Дополнительным методом для диагностики вирусных инфекций был метод культуры клеток для выявления ранних антигенов возбудителя (ЦМВ) и начала репродукции вируса (ВЭБ).

Результаты и их обсуждение. Примененный комплекс методов позволил нам выявить, что наиболее часто — почти у половины детей с ОРЗ (46,8%) — встречалась пневмоцистная инфекция. Следующими по частоте выявления инфекциями были микоплазменная — она диагностировалась у 34,0% обследуемых, и РС-инфекция — у 20,0%. ВЭБИ выявлялась реже — у 6,4%, и только у 3,8% была выявлена ЦМВИ (рисунок 1).

Из 46,8% детей имевших маркеры к *P. jiroveci* у 24,4% диагностировали анамнестические титры антител класса IgG, что говорит лишь о встрече с возбудителем в прошлом и у 22,4% были выявлены маркеры острой инфекции (рисунок 2).

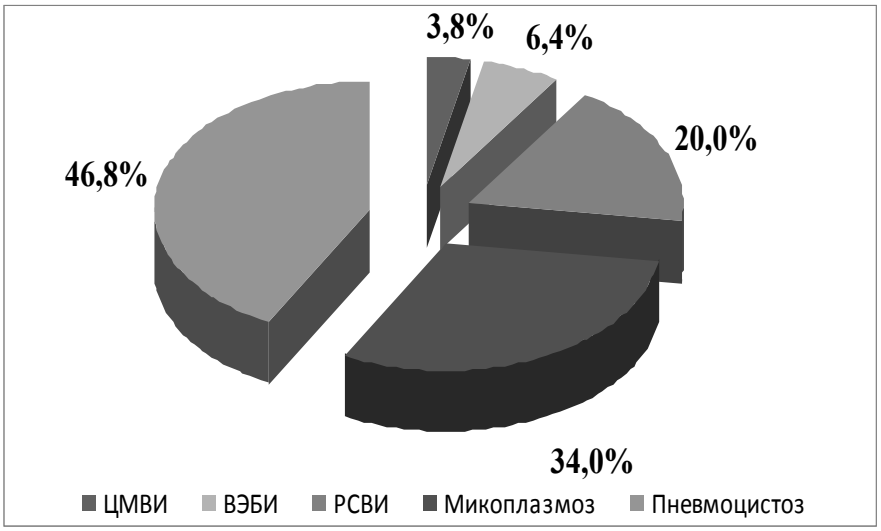


Рисунок 1 — Частота обнаружения маркеров оппортунистических инфекций (n = 156)

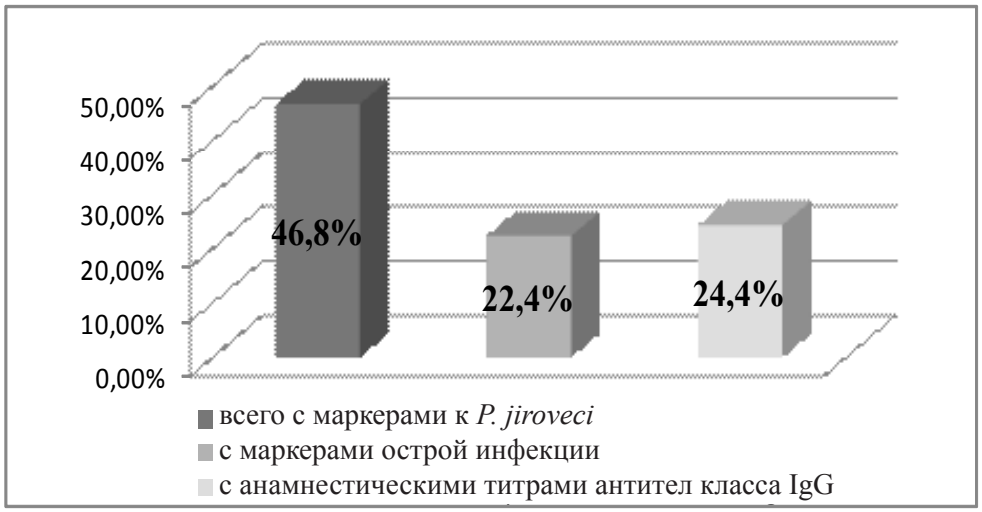


Рисунок 2 — Распределение маркеров пневмоцистной инфекции у больных ОРЗ

На следующем этапе работы мы определили распределение маркеров острой пневмоцистной инфекции. Из 35 детей антитела класса IgM определялись у 27 детей (77,1%), антитела класса IgG в диагностическом титре — у 3 человек (8,6%). У 5 человек (14,3%) были выявлены антитела класса IgM и IgG. Пневмоцисты в мокроте были обнаружены у 17 больных (10,9%). При этом у 6 пациентов (3,8%) одновременно с антигеном были найдены антитела класса IgM и IgG, что говорит об острой первичной инфекции или о реактивации персистирующей инфекции. Выявление антигена в мокроте без серологических сдвигов нами трактовалось как носительство. Необходимо отметить, что эти дети являются источником пневмоцистоза и представляют угрозу развития внутрибольничной инфекции.

Анализ возрастной структуры больных пневмоцистозом показал, что детей первого года жизни было 4 человека (11,4%), от года до 3 лет — 10 (28,6%), 3–7 лет — 12 (34,3%), старше 7 лет — 9 пациентов (25,7%). Наибольшее число заболеваний приходится на возрастную группу 3–7 лет. Это можно объяснить тем, что именно в этом возрасте ребята начинают посещать детские дошкольные учреждения, где и происходит инфицирование пневмоцистами за счет реализации воздушно-капельного и воздушно-пылевого путей передачи.

Поскольку была выявлена частая встречаемость смешанного инфицирования несколькими возбудителями, предстояло определить, как протекала пневмоцистная инфекция. Установлено, что

ее сочетания были разнообразными: у подавляющего большинства пациентов (28 детей — 80%) пневмоцистоз протекал как моноинфекция, но у каждого пятого ребенка (7 детей — 20%) были обнаружены микст-инфекции с другими возбудителями. У 2 детей смешанное инфицирование с ЦМВ и ВЭБ, у 2 — с РСВ, у 2 — с ВЭБ и РСВ и у одного — с ВЭБ. Наиболее частым ассоциантом пневмоцисты является ВЭБ, он был выделен у 5 детей.

Анализ особенностей смешанной инфекции показал, что для ее диагностики недостаточно опираться только на клиническую картину. Нами показана необходимость и важность исследований, включающих комплекс современных лабораторных методов для дифференциальной диагностики этих инфекций, и назначения специфического лечения, т.к. не у всех пациентов можно получить биологический материал для использования его в РИФ, НРИФ, а также не у всех иммунокомпроментированных лиц вырабатываются специфические противопневмоцистные антитела, диагностируемые методом ИФА.

В то же время использование комплекса методов позволяет выявлять различные стадии заболевания. Основываясь на выявлении разнообразных маркеров можно констатировать встречу с возбудителем в прошлом, первичную острую инфекцию, стадию реконвалесценции, латентную инфекцию, носительство или реактивацию инфекции.

В ходе исследования были проанализированы 15 историй болезней детей с лабораторно подтвержденной пневмоцистной инфекцией. При анализе эпидемиологических карт был выявлен внутрисемейный очаг пневмоцистной инфекции. Представляется целесообразным привести клинический пример рецидивирующего заболевания.

Клинический пример. Александр Н., 5 лет 9 мес. Диагноз: ОРВИ, круп I ст.

Из анамнеза жизни известно, что ребенок часто болеет ОРЗ, кашель — около года, обструктивный бронхит 4–5 раз за год, круп — 1 раз, в прошлом году был диагностирован пневмоцистоз.

При поступлении в стационар состояние средней тяжести, присутствуют симптомы интоксикации (вялость, сниженный аппетит). На фоне повышенной температуры ринит, сухой лающий кашель.

Кожа бледная, чистая. Поражения ротоглотки характеризовалось гиперемией зева, налетов нет. Лимфатические узлы мелкие во всех группах. В легких — шумное дыхание. Живот мягкий, печень, селезенка не увеличены.

Общий анализ крови: гемоглобин — 120 г/л, эритроциты — $4{,}6\times10^{12}$/л, тромбоциты — 343×10^{9}/л, лейкоциты — $7{,}4\times10^{9}$/л, палочкоядерные нейтрофилы —1%, сегментоядерные нейтрофилы — 37%, эозинофилы — 12%, лимфоциты — 46%, моноциты — 4%, СОЭ — 13 мм/час.

Общий анализ мочи: Л — 5–7 в п/зр., белок — следы.

В бактериологическом исследовании фекалий отмечено повышение кишечной палочки со слабо выраженными ферментативными свойствами до 100%.

Исследование микрофлоры ротоглотки: *Neisseria spp*. — 5×10^{5} (при норме 10^{2}–10^{4}), и *Staphylococcus aureus* — 10^{5}.

Методом ИФА в сыворотке крови обнаружены антитела к *P. jiroveci* класса IgM (1:890) и IgG (1:900), в мокроте методами РИФ и НРИФ были обнаружены пневмоцисты (более 10 в поле зрения), свидетельствующие об острой пневмоцистной инфекции. Антитела к микоплазме, ЦМВ, ВЭБ не обнаружены.

После назначения специфической терапии (бисептол) на 4-й день стационарного лечения отмечалась положительная динамика: кашель стал редким, продуктивным, в легких везикулярное дыхание без хрипов. Ребенок стал активнее, температура нормализовалась, появился аппетит.

Мальчик выписан на пятые сутки в удовлетворительном состоянии. Контроль проведенного лечения, проведенный через 4 недели, показал отсутствие пневмоцист в мокроте, отсутствие антител к *P. jiroveci* класса IgM и уменьшение титра антител класса IgG до 1:235.

Но через две недели ребенок был снова госпитализирован с диагнозом обструктивный бронхит. Лабораторно был вновь диагностирован пневмоцистоз (IgM — 1:360, IgG — 1:1340). Было рекомендовано провести обследование всех членов семьи на наличие пневмоцистной инфекции. В результате у отца и дедушки мальчика также была диагностирована пневмоцистная инфекция (отец: IgM — 1:980, IgG — 1:960; дедушка: IgM — отр, IgG — 1:1900, в мокроте обнаружены пневмоцисты). Мать и бабушка оказались не вовлечены в эпидемический процесс. Анализ выявленных маркеров показывает наличие свежей инфекции у мальчика и его отца и длительно текущей — у дедушки.

Проведенное после лечения обследование показало положительную динамику. У мальчика еще продолжали сохраняться антитела класса IgM, но пневмоцисты в мокроте не определяли. У папы 4-кратное снижение антител класса IgM и 2-кратное — IgG. У дедушки 5-кратное снижение антител класса IgG.

Вероятнее всего, источником пневмоцистной инфекции в семье является дедушка, у которого на фоне бронхита курильщика был кашель с отхождением мокроты. Из чего можно сделать вывод о нахождении внутрисемейного очага пневмоцистной инфекции. Остается неясным, являлся ли дедушка здоровым носителем, либо пневмоцистная инфекция у него протекала без выраженных клинических признаков.

Заключение. Среди детей, больных ОРЗ, наиболее распространена пневмоцистная инфекция (46,8%). Из них у 22,4% была диагностирована острая пневмоцистная инфекция. Наибольшее число заболеваний пневмоцистозом приходится на возрастную группу 3–7 лет. Наиболее частым ассоциантом пневмоцисты является ВЭБ.

На конкретном примере нами подтверждена возможность возникновения семейного очага, где источником инфекции может оказаться любой член семьи. Дано описание очага, выявлен источник и путь заражения.

Литература

1. Быковский, А.Ф. Смешанные инфекции / А.Ф. Быковский // Актуальные вопросы проблемы смешанных инфекций: сб. науч. тр. / НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. — М., 1986. — С. 3–7.

2. Каражас, Н.В. Эпидемиологическая характеристика цитомегаловирусной инфекции и пневмоцистоза как оппортунистических инфекций: дис. …д-ра биол. наук / Н.В. Каражас. — М., 2002. — 187 с.

3. Обнаружение коронавируса при экспериментальной пневмоцистной инфекции / Л.В. Диденко [и др.] // Мед. паразитол. и паразитар. болезни. — 2008. — № 2. — С. 8–11.

4. Этиологическая диагностика и этиотропная терапия острых пневмоний / В.И. Покровский [и др.]. — М.: Медицина, 1995. — 272 с.

5. Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients / G. Nevez [et al.] // AIDS. — 1999. — Vol. 13, N 4. — P. 535–536.

Поступила 02.08.2011

ROLE OF *PNEUMOCYSTIS JIROVECI* IN ETIOLOGY OF ACUTE RESPIRATORY DISEASES WITH COMPLICATED COURSE IN CONCURRENT INFECTION IN FREQUENTLY ILL CHILDREN

Kornienko M.N., Karazhas N.V., Rybalkina T.N., Feklisova L.V., Savitskaya N.A.

N.F. Gamaleya Research Institute for Epidemiology & Microbiology;
M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

It was examined 156 children with acute respiratory disease, aged 2 months to 13 years. It was shown that pneumocystis infection was revealed the most frequently (46.8%). It was found that the most frequent pnevmocystic associants was Epstein-Barr virus. It was shown the possibility of emerging of a family focus where the source of infection could be any family member.

Keywords: opportunistic infections, concurrent infections, acute respiratory diseases, children.

РОЛЬ *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* И *CHLAMYDOPHILA (CHLAMYDIA) PNEUMONIAE* В РАЗВИТИИ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ СРЕДИ ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Горбич О.А., Чистенко Г.Н.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Резюме. В настоящем исследовании были рассмотрены вопросы, касающиеся этиологии и эпидемиологии внебольничных пневмоний среди детей и подростков, проходивших лечение в двух

больничных организациях здравоохранения г. Минска. Особое внимание уделено роли атипичных возбудителей среди различных возрастных групп. По данным авторов, полученные результаты представляют интерес для специалистов педиатрического и профилактического профиля.

Ключевые слова: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae*, внебольничная пневмония, дети, эпидемиология.

Введение. Пневмонии — группа различных по этиологии, патогенезу, морфологической характеристике острых инфекционных (преимущественно бактериальных) заболеваний, характеризующихся очаговым поражением респираторных отделов легких с обязательным наличием внутриальвеолярной экссудации, выявляемой при физическом и рентгенологическом исследованиях, а также с лихорадочной реакцией и интоксикацией [1]. Несмотря на достижения современной педиатрии, пневмония попрежнему является важнейшей отдельно взятой причиной смертности детей во всем мире (более 2 миллионов детей младше 5 лет умирает от пневмонии, т.е. 1 ребенок каждые 15 секунд) [1–3]. Ежегодно регистрируется около 156 миллионов случаев заболевания [1]. Чаще пневмонией болеют дети до 3 лет (20–40 на 1000 детей в год), с возрастом заболеваемость пневмонией снижается в 3–4 раза. Ежегодная заболеваемость пневмонией в Европе и Северной Америке составляет 34–40 случаев на 1000 детей младше 5 лет в год и уменьшается до 11–16 случаев на 1000 детей в возрасте от 5 до 14 лет. В Российской Федерации заболеваемость детей пневмонией составляет 10–30 случаев на 1000 [4]. Заболеваемость пневмонией среди детского населения в Республике Беларусь увеличилась с 18 626 случаев в 2005 г. до 23 939 случаев в 2009 г. (показатели составили 944, 9 и 1348,9 на 100 000).

Среди возбудителей внебольничной пневмонии (ВП) самым частым во всех возрастных группах выступает *Streptococcus pneumoniae* (в 30–50% случаев заболевания) [5, 6]. Однако все большее значение среди этиологических факторов ВП в последние годы придается атипичным микроорганизмам. Пневмонии, вызванные *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae*, часто встречаются у лиц молодого и среднего возраста (20–30% и более) [3, 5, 6]. На долю атипичных микроорганизмов, вызывающих внебольничную пневмонию, в общей популяции приходится от 8 до 25% случаев заболевания [2].

Целью нашей работы была оценка эпидемиологических и клинических особенностей течения внебольничных пневмоний хламидийной и микоплазменной этиологии у детей и подростков, госпитализированных в учреждения здравоохранения «Городская детская клиническая инфекционная больница» (ГДИКБ) и «3-я городская детская клиническая больница» (3 ГДКБ) г. Минска.

Материалы и методы исследования. Нами был проведен ретроспективный анализ историй болезни 64 детей в возрасте от 9 месяцев до 17 лет с основным клиническим диагнозом «внебольничная пневмония». У всех пациентов при лучевом исследовании отмечалась пневмоническая инфильтрация. Лабораторным подтверждением диагноза микоплазменной пневмонии служило выявление IgM, IgG в сыворотке крови при использовании тест-системы «SERION ELISA classic *Mycoplasma pneumoniae* IgG/IgM/IgA». Для установления диагноза хламидийной пневмонии применялся метод иммуноферментного анализа тест-системами «Хлами-Бест-IgM-стрип» и «Хлами-Бест-IgG-стрип» (IgM, IgG в сыворотке крови).

Обработка данных и анализ результатов исследования были проведены с использованием программы Microsoft Excel (Microsoft, США) и Statistica 6.0 (StatSoft, США).

Результаты исследования и обсуждение. Согласно полученным нами в ходе анализа данным, с атипичными пневмониями в больничные организации здравоохранения г. Минска (ГДИКБ, 3 ГДКБ) поступило 64 ребенка (из них — 32 мальчика) от 9 месяцев до 17 лет. Для установления и подтверждения основного клинического диагноза всем пациентам проводилось лучевое исследование легких и серологическое исследование крови.

В клиническом течении заболевания 84,38% приходилось на пневмонии средней степени тяжести, доля тяжелых воспалительных поражений легочной ткани составила 15,62%, пневмонии легкой степени тяжести не регистрировались у госпитализированных, что обусловлено амбулаторным лечением таких лиц. Вероятно, степень тяжести клинических проявлений ВП объясняет более позднее для большинства пациентов обращение за медицинской помощью и последующую госпитализацию. Так, 54,69% детей и подростков поступили спустя 4–14 дней от даты заболевания.

Многочисленные исследования показали, что клинически здоровые дети в 10–20% случаев при обследовании оказываются транзиторными носителями пневмококков, в 3–7% — гемофиль-

ной палочки или микоплазмы, хламидии пневмонии, в 20–45% — различных стафилококков. При острой респираторной вирусной инфекции, охлаждении или действии других стрессорных факторов эта флора может «активироваться», приводя к развитию пневмонии [7].

В этиологической структуре преобладающим возбудителем внебольничных пневмоний были микоплазмы, составившие соответственно 62% от всех выделенных агентов. У некоторых пациентов выявлена ассоциация *Mycoplasma pneumoniae* с другими возбудителями (14 и 5%) (рисунок 1).

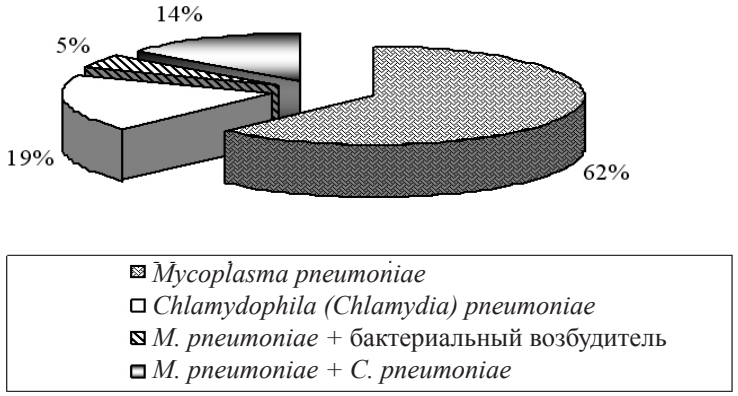


Рисунок 1 — Этиологическая структура атипичных внебольничных пневмоний среди детей и подростков в г. Минске

Известно, что заражение тем или иным возбудителем зависит от возраста. Нами был проведен анализ наличия атипичного возбудителя (*Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae*) в различных возрастных группах. Все госпитализированные пациенты были разделены на 3 группы (9 месяцев–5 лет; 6–11 лет; 12–17 лет) (рисунок 2).

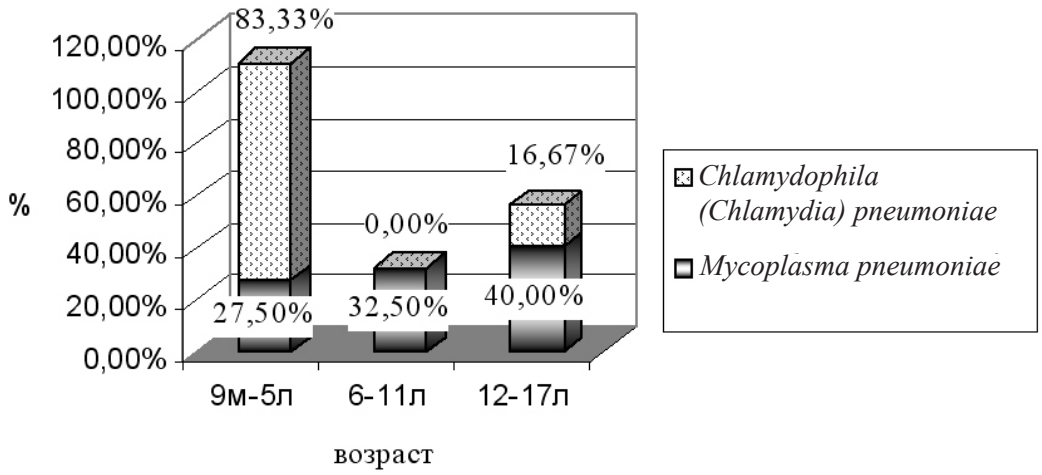


Рисунок 2 — Распределение пациентов с атипичной внебольничной пневмонией по возрастам

Статистически достоверно было установлено, что у детей от 9 месяцев до 5 лет чаще регистрируются внебольничные пневмонии, вызванные *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* — 83,3% случаев, в то время как *Mycoplasma pneumoniae* — 27,5% случаев (критерий $z = 3{,}120$; $p = 0{,}002$; $\beta > 0{,}8$). В других группах (6–11 лет; 12–17 лет) статистически достоверно выявить связь между преобладающим патологическим агентом и возрастом пациента не удалось (*M. pneumoniae* — 32,5% и отсутствие *C. pneumoniae*; *M. pneumoniae* — 40,0% и *C. pneumoniae* — 16,7%).

Итальянскими специалистами была выявлена роль *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae* в развитии внебольничной пневмонии у детей от 2 до 14 лет. Так, микоплазменная инфекция была диагностирована у 21% детей в возрасте 2–4 лет, у 41% — 5–7 лет и у 60% детей старше 7 лет. Хламидийная пневмония была диагностирована у 10% детей в возрасте 2–4 лет, у 19% — 5–7 лет и у 21% детей старше 7 лет [8]. Из 145 исследованных детей (средний возраст —

2,5 года) в Турции доля микоплазменных пневмоний составила 27%, а хламидийных — 5% [9]. Samransamruajkit R et. al. демонстрируют лидирующую роль хламидий и микоплазм в развитии «атипичных» пневмоний у детей в Таиланде (из 58 пациентов в 25% случаев наблюдалась микоплазменная пневмония, в 15% случаев — хламидийная пневмония) [10].

Заключение. В ходе настоящего исследования было установлено, что в этиологической структуре внебольничных пневмоний среди госпитализированных в 2 больничные организации здравоохранения г. Минска детей и подростков преобладали *Mycoplasma pneumoniae*. У детей до 5 лет достоверно чаще пневмонии вызываются *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae*.

Литература

1. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике: пособие для врачей / А.Г. Чучалин [и др.]. — Смоленск: МАКМАХ, 2010. — 80 с.

2. Мищенко, Н. 2010 год в пульмонологии: события, новости, результаты ключевых исследований / Н. Мищенко // Здоров'я України. — 2011. — № 5. — С. 38–41.

3. Lee, K.-Y. Pediatric respiratory infections by Mycoplasma pneumoniae / K.-Y. Lee // Expert Rev. Anti Infect. Ther. — 2008. — Vol. 6, № 4. — P. 509–521.

4. Козлов, Р.С. Пневмококки: уроки прошлого — взгляд в будущее. — Смоленск: МАКМАХ, 2010. — 128 с.

5. Козлов, Р.С. Возбудители инфекций дыхательных путей и структура их лекарственной устойчивости / Р.С. Козлов // Consilium medicum. — 2009. — Экстравыпуск. — С. 2–4.

6. Синопальников, А.И. Пневмонии / А.И. Синопальников // Рос. мед. вести. — 2004. — Т. 4, № 1. — С. 4–16.

7. Шабалов, Н.П. Пневмонии у детей раннего возраста / Н.П. Шабалов // Лечащий врач. — 2003. — № 2. — С. 16–22.

8. Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae cause not only atypical pneumonias / N. Principi [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 32, № 9. — P. 1281–1289.

9. Chlamydia pneumoniae in children with community-acquired pneumonia in Istanbul, Turkey / A. Somer [et al.] // J. Trop. Pediat. — 2006. — Vol. 52, № 3. — P. 173–178.

10. Prevalence of Mycoplasma and Chlamydia pneumonia in severe community-acquired pneumonia among hospitalized children in Thailand / R. Samransamruajkit [et al.] // Jap. J. Infect. Dis. — 2008. — Vol. 61, № 1. — P. 36–39.

Поступила 16.08.2011

THE CAUSATIVE ROLE OF *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* AND *CHLAMYDOPHILA (CHLAMYDIA) PNEUMONIAE* FOR COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN HOSPITALIZED CHILDREN AND ADOLESCENTS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Gorbich O., Chistenko G.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Etiology and epidemiology of community-acquired pneumonias in children and adolescents hospitalized in two Minsk hospitals were looked at. A special attention was paid on the role of the atypical pathogens in different age groups. To the authors' knowledge the results of the present study are of interest for specialists in pediatrics and prophylactic medicine.

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae,* community-acquired pneumonia, children, epidemiology.

ТУБЕРКУЛЕЗ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ СРЕДИ ДЕТСКОГО И ПОДРОСТКОВОГО НАСЕЛЕНИЯ ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ

Горбач Л.А.

Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Беларусь

Резюме. В работе проведено изучение всех зарегистрированных случаев заболеваний туберкулезом органов дыхания среди детского и подросткового населения Гомельской области за период 1999–2009 гг. Изучена структура впервые заболевших по полу, возрасту и клиническим формам заболевания. Определена значимость проведения профилактических осмотров на туберкулез для детского и подросткового населения области. Выявлена частота встречаемости эпидемических,

медицинских и социальных факторов, способствующих возникновению заболевания туберкулезом. Изучены особенности влияния этих факторов в детском и подростковом возрасте.

Ключевые слова: туберкулез органов дыхания, дети, подростки.

Введение. Проблема заболеваемости туберкулезом детей и подростков сохраняет свою актуальность [1, 2]. Ежегодно в мире 1 миллион детей в возрасте до 15 лет заболевает туберкулезом [3]. Возникновение туберкулеза у детей свидетельствует о недавнем инфицировании микобактериями и является маркером экзогенного распространения инфекции среди населения [3].

Заболеваемость туберкулезом детей и подростков в Республике Беларусь существенно ниже, чем в других странах СНГ. Однако, несмотря на проводимые профилактические противотуберкулезные мероприятия, заболеваемость детей и подростков из очагов туберкулезной инфекции в 20–40 раз превышает общую заболеваемость туберкулезом детского и подросткового населения.

Целью данной работы явился анализ всех случаев заболеваний туберкулезом органов дыхания, зарегистрированных в период 1999–2009 гг. среди детского и подросткового населения Гомельской области.

Материал и методы исследования. Объектом исследования были все зарегистрированные пациенты с туберкулезом органов дыхания в возрасте до 19 лет, впервые выявленные среди детского и подросткового населения Гомельской области в период 1999–2009 гг. Анализируемая группа включала 192 человека.

Для анализа случаев заболеваний была разработана специальная карта. Персонифицированная информация о каждом пациенте вносилась в карту, а затем в разработанную электронную базу данных. Обработка данных проводилась с использованием методов описательной статистики, построения таблиц сопряженности и вычисления критерия χ^2.

Результаты исследования и обсуждение. В анализируемой группе преобладали лица женского пола: 102 девочки (53,1%) и 90 мальчиков (46,9%). Средний возраст пациентов анализируемой группы составил 13,6 ± 4,7 года. Наибольшее число заболеваний туберкулезом зарегистрировано у пациентов в возрасте 15–19 лет (117 больных или 60,9%) и в возрастном периоде 12–15 лет (25 больных или 13,0%). Меньше всего заболеваний отмечено в возрастном периоде до 3 лет (8 случаев или 4,2%). Эти данные представлены на рисунке 1.

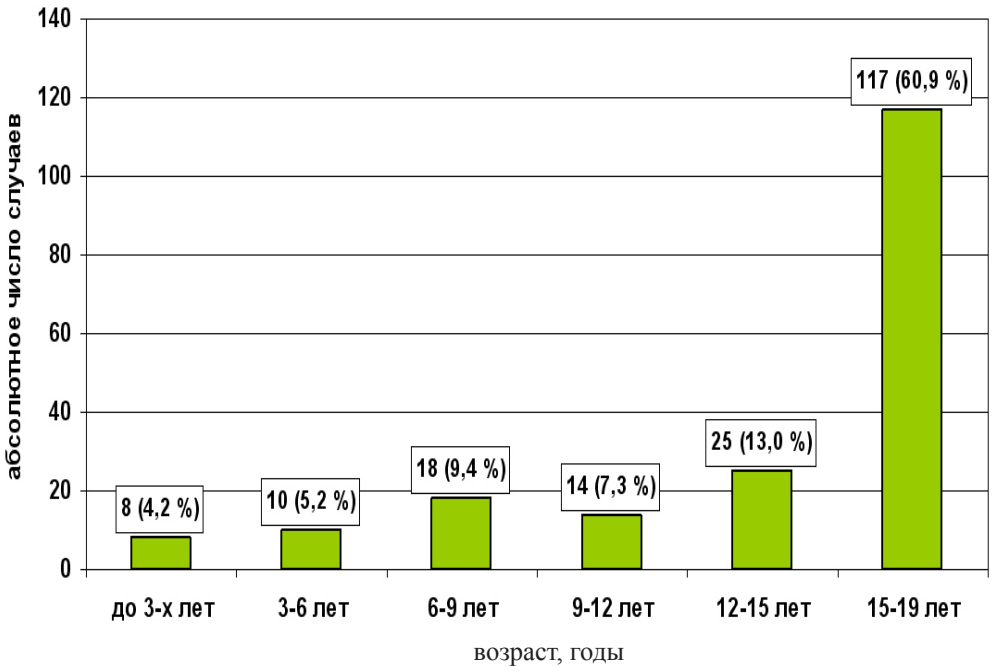


Рисунок 1 — Распределение пациентов анализируемой группы по возрасту

Структура анализируемой группы пациентов по клиническим формам туберкулеза органов дыхания представлена на рисунке 2.

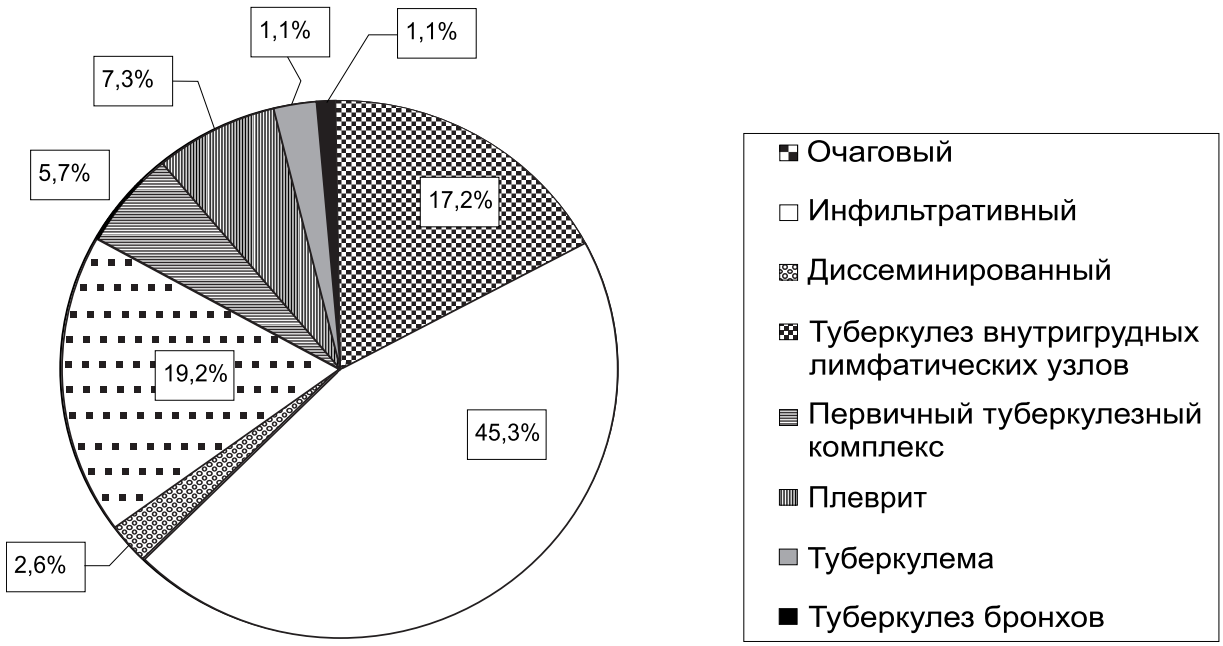


Рисунок 2 — Структура анализируемой группы пациентов по клиническим формам туберкулеза органов дыхания

Как видно из рисунка 2, в структуре анализируемой группы по клиническим формам превалировал инфильтративный туберкулез (45,3% или 87 случаев). Второе место по частоте встречаемости занимал туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (18,2% или 35 случаев), третье место — очаговый туберкулез (17,2% или 33 случая). Зарегистрировано по 5 заболеваний диссеминированным туберкулезом (2,6%) и туберкулемой (2,6%), 2 случая туберкулеза бронхов (1,1%).

У большинства пациентов анализируемой группы (81% или 155 детей) туберкулез органов дыхания был выявлен с помощью профилактических осмотров. При этом на момент выявления заболевания пациенты не предъявляли никаких жалоб, а имеющиеся слабовыраженные клинические симптомы игнорировали. У 84 больных (44%) туберкулез был выявлен с помощью туберкулинодиагностики, а у 71 (37%) — с помощью рентгенологического обследования (профилактический флюорографии).

В 19% случаев (37 детей) заболевание туберкулезом органов дыхания было выявлено при обращении за медицинской помощью. На момент выявления заболевания эти пациенты жаловались на кашель, одышку, боли в грудной клетке, снижение аппетита, слабость, потливость, повышенную утомляемость, снижение веса, субфебрильную температуру по вечерам.

Для проведения многофакторного анализа причин, способствующих возникновению туберкулеза органов дыхания у пациентов анализируемой группы, были выделены три основные группы факторов:

– эпидемические: установленный контакт с больным туберкулезом органов дыхания; тубинфицирование в анамнезе (по данным результатов туберкулинодиагностики); пропущенный вираж туберкулиновой пробы;

– медицинские: наличие в анамнезе заболеваний и состояний, которые могли способствовать в дальнейшем возникновению туберкулеза органов дыхания (частые острые респираторные вирусные инфекции, детские инфекционные заболевания, хронические неспецифические заболевания легких, заболевания желудочно-кишечного тракта, сахарный диабет, неврологическая патология, длительный прием кортикостероидов, цитостатиков и т.п.);

– социальные: социально опасное положение несовершеннолетнего (в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 22.07.2009 № 733); несовершеннолетний нуждается в государственной защите (в соответствии с постановлением Министерства образования Республики от 28.07.2004 № 47); миграция семьи; низкий уровень материального положения семьи; неблагополучные жилищно-бытовые условия; многодетная семья.

Как показало исследование, все пациенты из анализируемой группы имели эпидемические, медицинские и социальные факторы, которые могли привести к возникновению заболевания тубер-

кулезом. Не зарегистрировано ни одного случая заболевания туберкулезом органов дыхания, где не было бы отмечено влияние какого-либо фактора. У 28 (14,6%) пациентов отмечалась только одна из трех вышеперечисленных групп факторов, у 64 (33,3%) — одновременно две группы факторов и у 100 (52,1%) пациентов — все три группы факторов (рисунок 3).

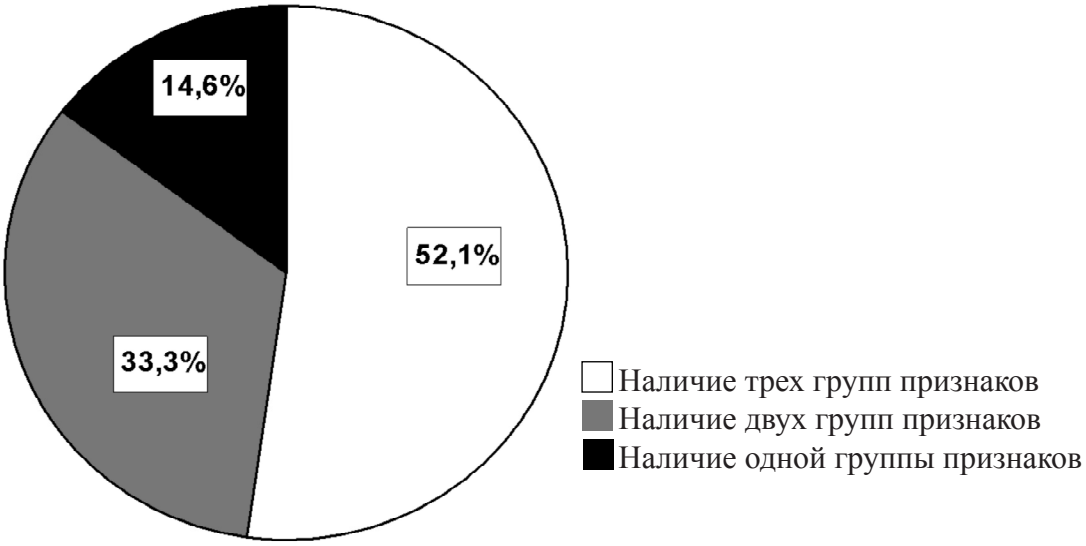


Рисунок 3 — Частота встречаемости факторов, способствующих возникновению заболевания туберкулезом органов дыхания у пациентов анализируемой группы

На первом месте среди анализируемых факторов по частоте встречаемости были медицинские факторы. Это наблюдалось у 190 пациентов (98,9%). Эпидемические факторы были отмечены у 141 пациента (73,4%). Реже всего отмечались социальные факторы. Они имели место у 125 пациентов (65,1%). Эти результаты представлены на рисунке 4.

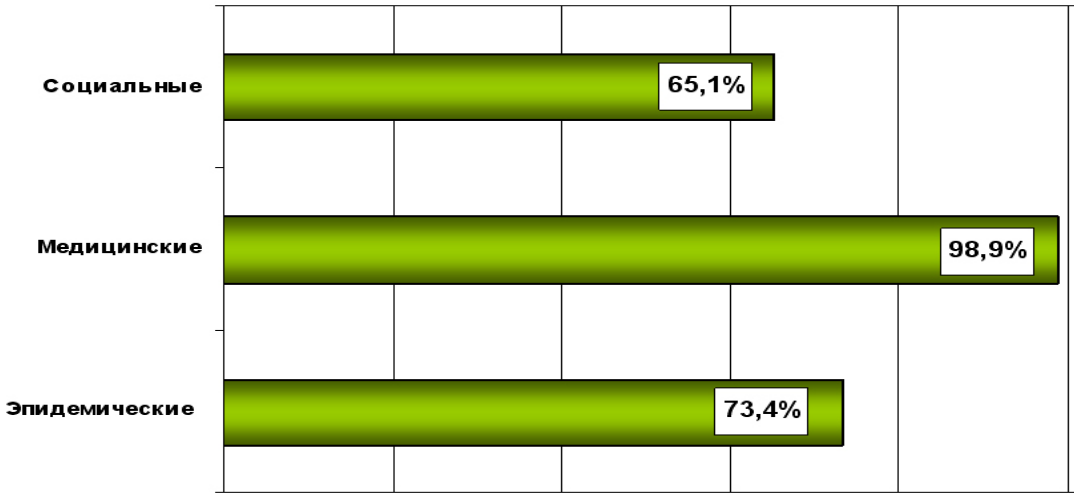


Рисунок 4 — Частота встречаемости эпидемических, медицинских и социальных факторов, способствующих возникновению заболевания у пациентов анализируемой группы

Для изучения особенностей выявления туберкулеза и влияния различных факторов на возникновение заболевания у детей и подростков анализируемая группа была разделена на две подгруппы. Первая подгруппа включала детей в возрасте 0–15 лет (75 человек), вторая подгруппа — подростков в возрасте 15–19 лет (117 человек).

С помощью построения таблиц сопряженности и вычисления критерия χ^2 нами проведено изучение значения проведения профилактических осмотров для выявления туберкулеза органов дыхания у детей и подростков (таблица 1).

Таблица 1 — Распределение пациентов анализируемых подгрупп по методу выявления заболевания

Подгруппы пациентов	Заболевание выявлено по жалобам	Заболевание выявлено при профилактическом осмотре на туберкулез	Всего
Пациенты в возрасте 0–15 лет	20	55	75
Пациенты в возрасте 15–19 лет	17	100	117
Всего	37	155	192

При сравнении двух подгрупп пациентов, указанных в таблице 1, не выявлено достоверных различий: $\chi^2 = 3{,}58$ $\nu = 1$, $p = 0{,}058$. Следовательно, проведение профилактических осмотров на туберкулез имело одинаковую значимость для выявления этого заболевания как среди детского населения, так и среди подросткового населения Гомельской области.

Аналогичным методом мы провели изучение встречаемости факторов, способствующих возникновению заболевания у пациентов анализируемых подгрупп (таблица 2).

Таблица 2 — Распределение пациентов анализируемых подгрупп по наличию факторов, способствующих возникновению заболевания

Подгруппы пациентов	Имеется одна группа факторов, способствующих возникновению заболевания	Имеются две группы факторов, способствующих возникновению заболевания	Отмечены все три группы факторов, способствующих возникновению заболевания	Всего
Пациенты в возрасте 0–15 лет	19	24	32	75
Пациенты в возрасте 15–19 лет	9	40	68	117
Всего	28	64	100	192

Как показало наше исследование, при сравнении двух подгрупп пациентов, перечисленных в таблице 2, выявлены достоверные различия: $\chi^2 = 11{,}914$, $\nu = 2$, $p = 0{,}003$. Следовательно, возникновение заболевания туберкулезом органов дыхания у пациентов в возрасте 15–19 лет (подростков), как правило, было связано с воздействием целого комплекса факторов: эпидемических, медицинских, социальных. В то же время у пациентов в возрасте 0–15 лет (детей) такой зависимости не выявлено. В данной подгруппе отмечено, что возникновение заболевания у пациентов могло быть обусловлено воздействием только одной группы факторов, что встречалось чаще, чем среди пациентов в возрасте 15–19 лет.

Нами проведено изучение наличия эпидемических, медицинских и социальных факторов, способствующих возникновению туберкулеза органов дыхания у пациентов двух подгрупп (таблицы 3–5).

Таблица 3 — Распределение пациентов анализируемых подгрупп по наличию эпидемических факторов, способствующих возникновению заболевания

Подгруппы пациентов	Присутствовали эпидемические факторы	Эпидемические факторы не выявлены	Всего
Пациенты в возрасте 0–15 лет	50	25	75
Пациенты в возрасте 15–19 лет	91	26	117
Всего	141	51	192

При сравнении подгрупп пациентов, перечисленных в таблице 3, не выявлено достоверных различий: $\chi^2 = 2{,}351$, $\nu = 1$, $p = 0{,}125$. Следовательно, как среди пациентов в возрасте 0–15 лет (детей), так и среди пациентов 15–19 лет (подростков) чаще отмечалось наличие эпидемических факторов, чем их отсутствие.

Аналогичные результаты получены при анализе распределения пациентов анализируемых подгрупп по наличию медицинских факторов (таблица 4).

Таблица 4 — Распределение пациентов анализируемых подгрупп по наличию медицинских факторов, способствующих возникновению заболевания

Подгруппы пациентов	Присутствовали медицинские факторы	Медицинские факторы не выявлены	Всего
Пациенты в возрасте 0–15 лет	74	1	75
Пациенты в возрасте 15–19 лет	116	1	117
Всего	190	2	192

При сравнении подгрупп пациентов, перечисленных в таблице 4, не выявлено достоверных различий: $\chi^2 = 0{,}168$, $\nu = 1$, $p = 0{,}682$. Следовательно, среди пациентов двух подгрупп отмечалась одна и та же тенденция - наличие медицинских факторов.

Изучение распределения пациентов по наличию социальных факторов выявило другую закономерность (таблица 5).

Таблица 5 — Распределение пациентов анализируемых подгрупп по наличию социальных факторов, способствующих возникновению заболевания

Подгруппы пациентов	Присутствовали социальные факторы	Отсутствовали социальные факторы	Всего
Пациенты в возрасте 0–15 лет	39	36	75
Пациенты в возрасте 15–19 лет	86	31	117
Всего	125	67	192

При сравнении двух подгрупп пациентов, перечисленных в таблице 5, выявлены достоверные различия $\chi^2 = 8{,}380$, $\nu = 1$, $p = 0{,}004$. Как показало наше исследование, у пациентов 15–19 лет (подростков) чаще определялось наличие социальных факторов, чем у пациентов в возрасте 0–15 лет (детей).

Выводы. На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. В анализируемой группе пациентов с туберкулезом органов дыхания преобладали лица женского пола (53,1%). Наибольшее число случаев заболевания зарегистрировано у пациентов в возрасте 15–19 лет (60,9%). Меньше всего случаев заболевания отмечено в возрастном периоде до 3 лет (4,2%).

2. В структуре анализируемой группы по клиническим формам превалировал инфильтративный туберкулез (45,3%). Реже всего регистрировался диссеминированный туберкулез (2,6%), туберкулема (2,6%) и туберкулез бронхов (1,1%).

3. У большинства пациентов анализируемой группы (81%) туберкулез органов дыхания был выявлен с помощью профилактических осмотров. При этом ведущим методом выявления заболевания у пациентов анализируемой группы была туберкулинодиагностика (44%). Проведение профилактических осмотров на туберкулез имело одинаковую значимость для выявления этого заболевания, как среди детского населения, так среди подросткового населения Гомельской области.

4. У всех пациентов анализируемой группы отмечалось наличие эпидемических, медицинских и социальных факторов, способствующих возникновению туберкулеза органов дыхания. У 52,1% пациентов зарегистрированы все группы факторов. Наиболее часто регистрировались медицинские (98,9%) и эпидемические (73,4%) факторы, способствующие возникновению туберкулеза.

5. Возникновение заболевания туберкулезом органов дыхания у подростков, как правило, было связано с воздействием целого комплекса факторов: эпидемических, медицинских, социальных. В то же время возникновение заболевания у детей могло быть обусловлено воздействием только одной группы факторов.

6. Не выявлено различий у детей и подростков по наличию эпидемических и медицинских факторов, способствующих возникновению заболевания. В то же время у подростков чаще отмечено влияние социальных факторов, чем у детей.

Литература

1. Крюкова, А.М. Факторы риска развития локальных форм туберкулеза у детей в крупном промышленном центре: автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.00.26 / А.М. Крюкова; ГОУВПО «Самарский гос. мед. ун-т Росздрава». — М., 2008. — 18 с.

2. Bjune, G. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children / G. Bjune [et al.] // Geneva: WHO, 2006. — 41 p. — WHO/HTM/TB/2006.371.

3. Corrigan, D.L. Tuberculosis in children / D.L. Corrigan, J.Y. Paton // Breathe. — 2007. — Vol. 3, № 4. — P. 351–363.

Поступила 23.08.2011

PULMONARY TUBERCULOSIS AMONG CHILDREN AND ADOLESCENT POPULATION IN GOMEL REGION

Gorbach L.A.

Republican Research & Practical Centre «Mother and Child», Minsk, Belarus

The study objective was to investigate all cases of pulmonary tuberculosis among children and adolescent population registered in the Gomel region in 1999-2009. The analyzed group included 192 patients with pulmonary tuberculosis in the age of 0-19 years. The structure of patients group was investigated (sex, age, clinical forms of the disease). The significance of preventive routine inspections on pulmonary tuberculosis for children and adolescent population of the Gomel region was determined. The incidence of epidemic, medical and the social factors contributing to the emergence of pulmonary tuberculosis was found. The features of influence of these factors in children and adolescent age were investigated.

Keywords: pulmonary tuberculosis, children, adolescences.

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ К КОРИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2011 ГОДУ

Самойлович Е.О.[1], Свирчевская Е.Ю.[1], Ермолович М.А.[1], Семейко Г.В.[1], Маяускене Т.А.[2], Астапов А.А.[2]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;

[2]Городская детская инфекционная клиническая больница, Минск, Беларусь

Резюме. В ходе исследования были изучены уровень и напряженность популяционного иммунитета к кори в различных возрастных и территориальных группах населения Республики Беларусь. Исследование 756 образцов сыворотки, собранных из всех семи регионов страны, показало, что 691 (91,4%) из них содержал IgG-антитела к вирусу кори. Пороговый уровень иммунитета (90%) был достигнут во всех регионах, за исключением Минской и Гродненской областей. Анализ популяционного иммунитета в разных возрастных группах показал, что наиболее низкий его уровень отмечался у детей в возрасте 12–24 месяцев и взрослых — 20–29 лет. Низкий уровень серопозитивных среди детей в возрасте 12–24 месяцев обусловлен высокой долей неиммунизированных детей в рассматриваемой группе, среди взрослых 20–29 лет — первичными либо вторичными поствакцинальными неудачами.

Ключевые слова: корь, популяционный иммунитет, Беларусь.

Введение. Несмотря на провозглашенную Европейским региональным бюро ВОЗ цель элиминировать корь и краснуху к 2015 г., региональная ситуация по кори в последние годы является неблагоприятной. Если в 2007–2009 гг. в Европейском регионе ежегодно регистрировалось 7000–8000 случаев кори [1], то 2010 г. и первой половине 2011 г. отмечались вспышки инфекции во многих странах Европейского региона, в первую очередь в странах Западной Европы [2, 3]. О росте заболеваемости корью в 2011 г. сообщило 35 стран. Только в странах Европейского Союза в течение первых 6 месяцев 2011 г. была выявлена 21 000 случаев кори, 6 из них — с летальным исходом [2]. В этой ситуации риск завоза вируса кори на территорию других стран становится очень высоким.

После трехлетнего отсутствия кори в Республике Беларусь с конца 2010 г. стали регистрироваться единичные случаи завоза этой инфекции. В октябре 2010 г. в г. Минске выявлен завозной случай из Индии, вызванный вирусом генотипа D8. В январе 2011 г. в г. Минске и марте 2011 г. в г. Витебске выявлены два случая кори (оба завезены из Германии), вызванные вирусами генотипов D4 и D8, соответственно. Все эти случаи не получили распространения в Республике Беларусь. В мае 2011 г. в Минской области (в основном Червенский район) была выявлена вспышка кори (48 заболевших), продолжавшаяся до середины июля. Этиологическим агентом вспышки явился вирус генотипа D8. В данной ситуации изучение популяционного иммунитета к кори и установление его

региональных и возрастных особенностей представляет особую важность. В последние несколько десятилетий иммунитет населения Республики Беларусь формируется в основном за счет вакцинации. Календарь прививок включает вакцинацию против кори в 12 месяцев (осуществляется с 1967 г.) и ревакцинацию (осуществляется с 1987 г.) в 6 лет.

Целью данной работы было изучить уровень и напряженность популяционного иммунитета к кори в различных возрастных и территориальных группах населения.

Материалы и методы. Для оценки популяционного иммунитета к кори были исследованы сыворотки крови 756 человек в возрасте 1–60 лет из всех 7 регионов страны, собранные методом случайной выборки. Забор сывороток крови был осуществлен в мае–июне 2011 г. в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 14.05.2011 № 501. В число обследованных также вошли 19 работников Минской городской детской инфекционной клинической больницы.

Антитела класса IgG к вирусу кори определяли с использованием иммуноферментной тест-системы производства Virion/Serion (Германия). Концентрацию антител рассчитывали в международных единицах на мл (МЕ/мл). Пороговой концентрацией считали 150 мМЕ/мл. Выявление антител в концентрации 150–200 мМЕ/мл рассматривали как свидетельство условной защищенности, выявление антител в концентрации более 200 мМЕ/мл — как свидетельство защищенности от кори.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистического пакета компьютерной программы Microsoft Excel Windows XP.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали, что антитела в условно-защитной и защитной концентрации имел 691 из 756 (91,4%) обследованных человек (таблица 1). Условный уровень защиты (150–200 мМЕ/мл) был отмечен у 21 человека (2,8%), у 670 лиц (88,6%) антитела присутствовали в защитной концентрации (более 200 мМЕ/мл).

Таблица 1 — Популяционный иммунитет к кори в различных возрастных группах населения Республики Беларусь, 2011 г.

Возраст, лет	Число обследованных	Число (%) серопозитивных	Из них с содержанием антител, мМЕ/мл			Концентрация антител, мМЕ/мл
			150–200	201–350	>350	
1–5	171	136 (79,5%)	2	20	114	753,4
6–10	99	95 (96,0%)	0	9	86	998,6
11–14	80	79 (98,8%)	2	12	65	950,6
15–19	92	89 (96,7%)	5	14	70	780,2
20–29	101	85 (84,2%)	8	14	63	610,7
30–39	97	91 (93,8%)	2	11	78	941,5
40–49	63	63 (100,0%)	2	4	57	1519,0
>50	53	53 (100,0%)	0	1	52	1921,1
Всего	756	691 (91,4%)	21	85	585	960,4

Уровень популяционного иммунитета различался в различных возрастных группах населения. Среди лиц старше 40 лет восприимчивых к кори выявлено не было. Среди лиц в возрасте 11–15 и 15–19 лет уровень серопозитивных превышал 95%. Уровень серопозитивных лиц в возрастной группе 30–39 лет был несколько ниже, чем в вышеуказанных группах (93,8%), однако также достиг 90% порогового уровня, достаточного для прекращения трансмиссии вируса кори.

Наиболее низкий уровень защищенности был выявлен в двух возрастных группах: дети в возрасте 1–5 лет (79,5%) и взрослые в возрасте 20–29 лет (84,2%). Анализ данных о вакцинальном статусе обследованных лиц возрастной группы 1–5 лет показал, что среди вошедших в эту группу 61 ребенка в возрасте 12–24 месяца только 26 уже получили вакцинацию против кори. У 4 из 26 привитых детей забор крови для изучения иммунитета к кори был осуществлен через 1–7 дней после вакцинации. Как известно, этого времени не достаточно для выработки поствакцинального иммунитета. Наличие среди обследованных большого числа непривитых детей, а также детей, привитых несколько дней назад, и обусловило более низкий уровень серопозитивных в сравнении с другими возрастными группами. Среди 110 обследованных детей в возрасте 2–5 лет антитела были выявлены у 101 (91,8%). Низкий уровень популяционного иммунитета среди лиц 20–29 лет обусловлен первичными или вторичными поствакцинальными неудачами, связанными с недостаточной иммуногенностью применявшихся вакцин либо с несоблюдением холодовой цепи при их транспортировке или хранении.

Напряженность иммунитета (средняя концентрация антител) также различалась в различных возрастных группах населения. Наиболее высокая концентрация антител отмечалась у лиц 40–49 лет, а также 50 лет и старше (1515 и 1921 мМЕ/мл соответственно). Высокая концентрация антител в этих возрастных группах объясняется тем, что в большинстве случаев антитела являются постинфекционными, а не поствакцинальными. Так как вакцинация против кори в Беларуси детей в возрасте 12 месяцев осуществляется с 1967 г., поствакцинальные антитела могли быть выявлены только у лиц моложе 45 лет, хотя не исключено, что часть из них также сталкивалась и с циркулирующим диким вирусом кори. Наиболее низкая концентрация антител отмечалась в возрастной группе 20–29 лет. В этой группе, наряду с высоким уровнем неиммунных к кори лиц (15,8%), среди лиц, у которых были выявлены антитела, у 25,8% они присутствовали в низкой концентрации (< 350 мМЕ/мл).

Территориальный анализ иммунитета к кори выявил следующее. Иммунная прослойка к кори в 5 из 7 регионов страны (г. Минск, Гомельская, Могилевская, Витебская и Брестская области) превышала 90%, в двух регионах страны не достигала 90% (Гродненская область — 88,4%, Минская область — 87,4%). Достоверных различий в уровне иммунной прослойки между областями страны выявлено не было (таблица 2).

Таблица 2 — Популяционный иммунитет к кори в областях Республики Беларусь, 2011 г.

Области	Число обследованных	Число (%) серопозитивных	Из них с содержанием антител, мМЕ/мл			Концентрация антител, мМЕ/мл
			150–200	201–350	>350	
Брестская	105	98 (93,3%)	6	13	79	992,1
Витебская	105	99 (94,3%)	5	11	83	853,1
Гомельская	109	99 (90,8%)	0	9	90	1332,4
Гродненскаяя	112	99 (88,4%)	4	11	84	826,0
г. Минск	103	95 (92,2%)	1	9	85	936,1
Минская	103	90 (87,4%)	1	10	79	950,9
Могилевская	119	111 (93,3%)	4	22	85	841,1
Республика Беларусь	756	691 (91,4%)	21	85	585	960,4

Популяционный иммунитет населения Гомельской области отличался достоверно более высокой напряженностью в сравнении с другими областями страны. У 90 (90,9%) из 99 обследованных из Гомельской области были выявлены антитела к кори в высокой концентрации, средняя концентрация антител составила 1332,4 мМЕ/мл. У жителей шести других областей страны определялась практически одинаковая напряженность иммунитета к кори, средняя концентрация антител колебалась от 826,0 мМЕ/мл в Гродненской области до 992,1 мМЕ/мл в Брестской области.

Среди обследованных 19 работников Минской городской детской инфекционной клинической больницы 2 человека (оба — в возрасте 23 года) не имели антител к вирусу кори, у 4 — антитела присутствовали в низкой концентрации (210–230 мМЕ/мл). Учитывая высокую вероятность инфицирования по месту работы всем 6 обследованным было рекомендовано получить вакцинацию против кори. У остальных 13 обследованных антитела присутствовали в достаточно высокой концентрации (400–1500 МЕ/мл)

Заключение. В соответствии с международным опытом, критическим (пороговым) уровнем популяционного иммунитета, необходимым для ликвидации кори, является 90–95% иммунных [4]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что во всех возрастных группах населения, за исключением детей в возрасте 12–24 месяцев и взрослых в возрасте 20–29 лет, необходимый уровень иммунитета достигнут.

Для повышения уровня иммунной прослойки к кори среди детей в возрасте 12–24 месяцев необходимо повысить своевременность охвата плановой вакцинацией. Повышение уровня иммунной прослойки среди лиц 20–29 лет может быть достигнуто за счет дополнительных мероприятий по иммунизации.

Литература

1. Progress toward measles elimination — European Region, 2005–2008 / Centers for Disease Control and Prevention // MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. — 2009. — Vol. 58, N 6. — P. 142–145.

2. Kreidl, P. ECDC introduces European monthly measles monitoring [Elecronic resource] / P. Kreidl // Euro Surveill. — 2011. — Vol. 16, N 28. — pii = 19918. — Mode of access: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId = 19918. — Data of access: 27.09.2011.

3. Steffens, I. Spotlihgt on measles 2010: measles elimination in Europe — a new commitment to meet the goal by 2015 [Elecronic resource] / I. Steffens, R. Martin, P. Lopalco // Euro Surveill. — 2010. — Vol. 13, N 50. — pii = 19749. — Mode of access: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId = 19749. — Data of access: 27.09.2011.

4. Мэй, Р. Инфекционные болезни человека. Динамика и контроль / Р. Мэй, Р. Андерсон; пер. с англ. — М.: Мир. — 2004. — 784 с.

Поступила 27.09.2011

HERD IMMUNITY TO MEASLES IN THE REPUBLIC OF BELARUS, 2011

Samoilovich E.O.[1], Svirchevskaya E.Ju.[1], Yermalovich M.A.[1], Semeiko G.V.[1], Mayauskene T.A.[2], Astapov A.A.[2]

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Municipal Children's Infectious Clinical Hospital, Minsk, Belarus

The aim of the investigation was to study the level of herd immunity in different age and territorial group of population. The investigation of 756 sera samples collected in all seven regions of Belarus for specific measles virus IgG antibodies showed that 691 (91.4%) of them was seropositive. The threshold level of immunity (90%) was reached in all regions with exception of Minsk and Grodno regions. The analysis of herd immunity in different age groups revealed that the lowest level of immunity has children 12–24 months and adults 20–29 years old. Low level of seropositivity among children 12–24 month is explained by high prevalence of non-immunized children in the examined group, and among 20–29 years adults — by primary or secondary vaccine failure.

Keywords: measles, herd immunity, Belarus.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАБОРАТОРНО ПОДТВЕРЖДЕННЫХ СЛУЧАЕВ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА, ВЫЯВЛЕННЫХ В БЕЛАРУСИ В 2011 ГОДУ

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

[1]Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья;
[2]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Среди выявленных в Беларуси в январе–августе 2011 г. 128 подозрительных на эпидпаротит случаев 42 (32,8%) были подтверждены лабораторно обнаружением специфических IgM-антител, выявлением вирусной РНК или изоляцией вируса. Лабораторно подтвержденные случаи выявлены во всех 7 регионах страны, 31% заболевших относились к возрастной группе 1–17 лет, 69% — к более старшему возрасту (54,8% — 20–29 лет). Клиническая картина была типичной, в 7 (16,7%) случаях были выявлены осложнения (панкреатит — 6 случаев, субмаксилит — 1). Среди заболевших 28 (66,6%) были привиты против эпидпаротита (20 получили одну дозу вакцины, 8 — две дозы). В 7 случаях (16,7%) заболевание развилось через 17–33 дня после вакцинации, 12 (28,6%) заболевших имели контакт с недавно привитыми детьми. Необходимо молекулярно-генетическое исследование вируса паротита, циркулирующего в Беларуси.

Ключевые слова: эпидемический паротит, диагностика, вакцинация.

Введение. До недавнего времени эпидемический паротит (эпидпаротит) был широко распространен в мире: в среднем от 0,1 до 1% (в некоторых странах до 6%) населения переболевало этой инфекцией [1]. Внедрение вакцинации в мире в 60–80-х гг. прошлого столетия позволило изменить эпидемическую ситуацию по эпидпаротиту и перевести эту инфекцию в разряд управляемых. В США показатель заболеваемости за 20 лет применения вакцины снизился с 90,0 на 100 000 до 1,1 на 100 000 населения [2]. В Российской Федерации использование иммунизации против эпидпаротита с 1981 г. в течение 20 лет позволило снизить заболеваемость в 294 раза [1].

По мере роста охвата вакцинацией и улучшения эпидемиологического надзора на фоне общего существенного снижения заболеваемости среди заболевших оказываются и привитые лица, которые вследствие первичных или вторичных вакцинальных неудач остались восприимчивыми к инфекции. В Европе среди 19 640 заболевших эпидпаротитом в 2008 г. 24% были не вакцинированы, 26% получили одну дозу вакцины, 20% — не меньше двух доз. Заболеваемость среди мужчин (3,6 на 100 000) была выше, чем среди женщин (2,61 на 100 000). Наибольший уровень ее отмечался в возрастной группе 5–14 лет (17,22 на 100 000) [3]. В США в 1993–2005 гг. среди заболевших эпидпаротитом 72% были вакцинированы, из них 37% получили две дозы вакцины. Пик заболеваемости отмечен в возрасте 5–9 лет [4].

Описаны также и редкие случаи эпидпаротита, возникшие в результате горизонтальной трансмиссии вакцинных штаммов вируса паротита [5–7]. Заболевания, возникшие у лиц, контактировавших с недавно вакцинированными живой паротитной вакциной членами их семей, развивались в пределах 45 дней со дня контакта с вакцинированным. Клиническая картина описанных в литературе случаев эпидпаротита, обусловленных горизонтальной трансмиссией вакцинных вирусов, проявляется в основном только поражением слюнных желез, хотя описан и единичный случай менингита [6].

В Республике Беларусь в результате высокого уровня охвата вакцинацией (с 1980 г.) и ревакцинацией (с 2000 г.) против эпидпаротита в последние годы наблюдается низкий уровень заболеваемости (2008 — 2,56, 2009 — 1,78, 2010 — 0,92 на 100 000 населения). До 2010 г. диагностика и последующая регистрация эпидпаротита основывалась на клинических данных. С декабря 2010 г. с целью верификации диагноза и дифференции местных и завозных случаев в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии проводится лабораторное обследование больных с подозрением на эпидпаротит.

Целью работы являлся эпидемиологический анализ лабораторно подтвержденных случаев эпидпаротита, выявленных в Республике Беларусь с момента внедрения лабораторной диагностики этой инфекции.

Материалы и методы. Материалом для эпидемиологического анализа явились данные официальной регистрации заболеваний эпидпаротитом населения Республики Беларусь за период с декабря 2010 г. по август 2011 г. В течение этого времени было выявлено 128 случаев, по клиническим симптомам подозрительных на эпидпаротит.

Лабораторное обследование больных проводили с использованием следующих методов: выявление специфических IgM-антител в сыворотке крови (иммуноферментная тест-система производства Virion/Serion, Германия), обнаружение РНК вируса паротита в клиническом материале (носоглоточный мазок, моча) с использованием РТ-ПЦР, выделение вируса паротита в культуре клеток из клинического материала. Позитивный результат, полученный при использовании одного из методов, являлся лабораторным подтверждением диагноза.

Статистические методы применяли для оценки интенсивных и экстенсивных показателей заболеваемости. Обработка материалов исследования проводилась с использованием статистического пакета компьютерной программы Microsoft Excel Windows XP.

Результаты и обсуждение. До декабря 2010 г. диагноз «эпидпаротит» в Республике Беларусь ставился на основании клинических данных. В соответствии с письмом Министерства здравоохранения от 16 декабря 2010 г. № 10-27/18-1630 «О профилактике кори, краснухи и эпидемического паротита» каждый случай заболевания, подозрительный на эпидпаротит, подлежит лабораторному обследованию.

Проведенное в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии лабораторное обследование 128 человек с подозрением на эпидпаротит позволило подтвердить диагноз у 42 (32,8%) из них. В 41 случае обнаружены IgM-антитела к вирусу паротита в сыворотке крови, в одном случае диагноз подтвержден обнаружением вирусной РНК в носоглоточном мазке с помощью ПЦР. Вирус паротита был выделен из клинического материала 4 IgM-позитивных пациентов (в двух случаях — из носоглоточного мазка и в двух — из мочи).

Лабораторно подтвержденные случаи эпидпаротита были выявлены во всех регионах республики: Брестская область — 6, Витебская — 1, Гомельская — 9, Гродненская — 5, Минская — 2, Могилевская — 4, г. Минск — 15.

Анализ заболевших эпидпаротитом по половой принадлежности показал преобладание лиц женского пола (64,3%), лица мужского пола составили 35,7%. Эти данные несколько отличаются от

данных, полученных в других странах Европейского региона, где, как правило, эпидпаротит чаще регистрируется у мужчин [8, 9].

В возрастной структуре заболевших преобладали взрослые лица — 69,0%, доля детского населения составила 31,0%. Более половины наблюдаемых лиц составили пациенты в возрасте 20–29 лет — 54,8% (рисунок).

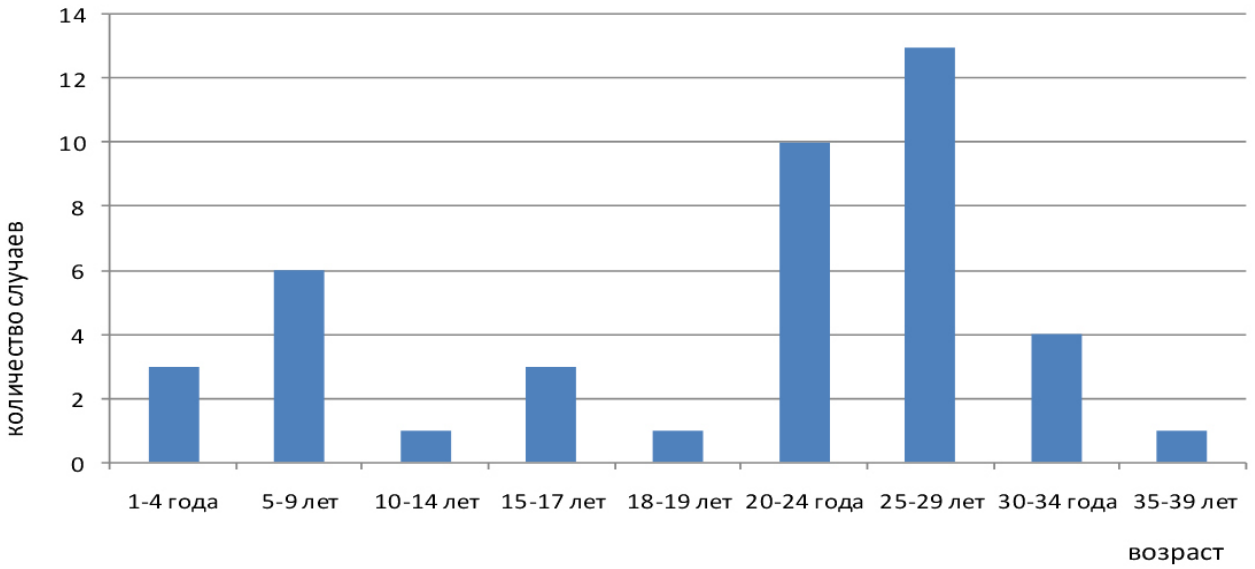


Рисунок — Возрастное распределение случаев эпидемического паротита

В социальной структуре пациентов преобладали женщины, находящиеся в декретном отпуске — 38,9%, учащиеся и студенты составили 27,8%, неорганизованные дети — 5,6%, дети, посещающие дошкольное учреждение — 2,8%, медицинские работники — 5,6%.

Согласно данным прививочной документации, 28 (66,7%) из 42 пациентов были вакцинированы против эпидпаротита, в том числе 20 (47,6%) — однократно, 8 (19,0%) — двукратно, 2 (6,6%) пациента не были привиты. У 12 человек (28,6%) сведения о вакцинации отсутствовали.

Среди однократно привитых 14 вакцинированы моновакциной, 6 — тривакциной корь-паротит-краснуха (КПК). Лица, получившие двукратную вакцинацию (8 человек), в 1 случае были привиты моновакциной и КПК, в 7 случаях — только КПК. У половины привитых заболевших с момента последней вакцинации прошло 10 лет и более.

В 7 (16,7%) случаях заболевание зарегистрировано в течение 17–33 дней после иммунизации, что может свидетельствовать об эпидпаротите, вызванном вакцинным вирусом (т.е. вакциноассоциированном эпидпаротите). Кроме того, при проведении эпидемиологического расследования было установлено, что в 12 случаях (28,6%) заболевшие эпидпаротитом имели семейный контакт с вакцинированными детьми в пределах 45 дней до начала клинических симптомов заболевания, что не исключает развитие заболевания вследствие горизонтальной трансмиссии вакцинного штамма вируса. Для дифференциации классических случаев эпидпаротита, вызванных диким вирусом, и случаев, ассоциированных с вакцинным вирусом, необходимы дальнейшие исследования, направленные на выделение и молекулярно-генетическую характеристику вируса.

Клиническая картина лабораторно подтвержденных случаев эпидпаротита у всех заболевших имела типичное течение. У 30 человек (71,4%) регистрировалась температурная реакция от субфебрильной до 39 °С и выше, в том числе от 37 до 37,9 °С — у 17 человек (56,7%), от 38 до 38,9 °С — у 9 человек (30%) и 39 °С и выше — у 4 человек (13,3%). В клинической картине преобладало одностороннее поражение слюнных желез — у 24 человек (57,1%). Двусторонне поражение слюнных желез выявлено у 18 человек (42,9%). В 7 из 42 (16,7%) случаев наблюдались осложнения эпидпаротита: в 6 случаях выявлен панкреатит, в 1 — панкреатит и субмаксиллит.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на широкий арсенал использованных методов исследования, только 35,6% выявленных в стране случаев, подозрительных на эпидпаротит по клиническим признакам, удалось подтвердить лабораторно. С одной

стороны, это связано с тем, что далеко не все случаи поражения слюнных желез вызваны вирусом паротита. По-видимому, в условиях низкой циркуляции вируса, большинство из них обусловлено другими причинами. В то же время следует помнить, что лабораторная диагностика заболевания у привитых лиц сопряжена с определенными трудностями. Как известно, далеко не у всех ранее привитых лиц, заболевших эпидпаротитом, удается обнаружить специфические IgM-антитела. Вероятность выделения вируса или обнаружения РНК вируса в ПЦР является еще более низкой, так как обнаружить вирус в клиническом материале можно только в течение нескольких дней после появления клинических симптомов. Следовательно, целесообразным является обеспечение регистрации случаев заболевания на основании комплексных клинических, эпидемиологических и лабораторных данных.

Литература

1. Эпидемический паротит. Современные представления о возбудителе, клиника, диагностика, профилактика // под ред. А.П. Агафонова. — Новосибирск: ЗАО «Мед.-биол. союз», 2007. — 82 с.

2. Тимченко, В.Н. Эпидемический паротит (эволюция, причина бесплодного брака, современная терапия и экстренная профилактика) / В.Н. Тимченко. — СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2006. — 261 с.

3. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2010 [Electronic resource] / European Centre for Disease Prevention and Control. — Mode of access: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DispForm.aspx?ID = 578. — Data of access: 27.09.2011.

4. Barskey, A.E. Mumps resurgences in the United States: a historical perspective on unexpected elements / A.E. Barskey, J.W. Glasser, C.W. LeBaron // Vaccine. — 2009. — Vol. 27. — P. 6186–6195.

5. Horizontal transmission of the Leningrad-3 live attenuated mumps vaccine virus / A.V. Atrashevskaya, A.A. Neverov, S. Rubin, G.M. Ignatyev // Vaccine. — 2009. — Vol. 24. — P. 1530–1536.

6. Transmission of the L-Zagreb mumps vaccine virus, Croatia, 2005-2008 [Electronic resource] / B. Kaic [et al.] // Euro Surveill. — 2008. — Vol. 13, N 4–6. — P. 150–152. — Mode of access: http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EQ/V13N02/V13N02.pdf. — Data of access: 27.09.2011.

7. Transmission of Urabe mumps vaccine between siblings / H. Sawada [et al.] // Lancet. — 1993. — Vol. 342. — P. 371.

8. An increase in the number of mumps cases in the Czech Republic, 2005–2006 [Electronic resource] / N. Baxall [et al.] // Euro Surveill. — 2008. — Vol. 13, N 4–6. — P. 146–149. — Mode of access: http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EQ/V13N02/V13N02.pdf. — Data of access: 27.09.2011.

9. Mumps outbreak in the former Yugoslav Republic of Macedonia, January 2008 – June 2009: epidemiology and control measures [Electronic resource] / G. Kuzmanovska [et al.] // Euro Surveill. — 2010. — Vol. 15, N 23. — Mode of access: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId = 19586. — Data of access: 27.09.2011.

Поступила 27.09.2011

CHARACTERIZATION OF THE LABORATORY CONFIRMED MUMPS CASES REVEALED IN BELARUS IN 2011

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

[1]Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health;
[2]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

In Belarus during January-August 2011 among 128 suspected mumps cases 42 were laboratory confirmed by the presence of specific IgM antibodies or by detecting virus RNA in clinical samples or by virus isolation. Mumps cases were reported in all 7 regions of the country. Only 31% of the patients were children 1–17 years old and 54.8% belonged to the age group 20–29 years old. Clinical presentation in all laboratory confirmed cases was typical, 7 cases (16.7%) had complications (pancreatitis — in 6 cases, submaxilitis — in 1 case). Among 42 cases 28 (66.6%) were vaccinated against mumps (20 — with one dose, 8 — with 2 doses), 2 (4.8%) were not vaccinated and 12 (28.6%) had no data about the vaccination. In 7 (16.7%) cases the disease appears within 17–33 days after vaccination, 12 (28.6%) cases had the family contact with recently vaccinated children. For these cases vaccine origin of mumps virus cannot be excluded. The molecular investigation of mumps virus circulated in Belarus is needed.

Keywords: mumps, mumps virus, diagnostics, vaccination.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА А, ВЫЯВЛЕННЫХ В СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ

Бондаренко Т.Ю.[1], Терновой В.А.[1], Чаусов Е.В.[1], Кочнева Г.В.[1], Сиволобова Г.Ф.[1], Гражданцева А.А.[1], Нетесов С.В.[2]

[1]ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», пос. Кольцово Новосибирской области;
[2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Резюме. С помощью ОТ-ПЦР-анализа была выявлена РНК вируса гепатита А (ВГА) у 101 пациента, поступившего в больницы Сибирского региона, и определена нуклеотидная последовательность фрагментов генома, кодирующих части белков VP1, 2B и белка 2A ВГА. Филогенетический анализ показал принадлежность всех выявленных изолятов ВГА к IA-субгенотипу. Выявлено 2 группы IA-субгенотипа: 1-я группа объединила 92 изолята (91 %) и была близка к штаммам ВГА HAS-15 (США), CR326 (Коста Рика); M2 (Куба), IT-ILG-00 (Италия) и BaliA06-72 (Индонезия). 2-я группа объединила изоляты, оказавшиеся близкими к европейским российским штаммам и штаммам (AH2, FH2) из Японии.

Ключевые слова: изолят, вирус гепатита А, ОТ-ПЦР, молекулярная эпидемиология.

Введение. Гепатит А (ГА) как заболевание широко распространен во всем мире: по данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируется в среднем 1,4 млн. случаев заболевания вирусным ГА. По данным ФГУЗ «Федерального центра гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, в последние 10 лет заболеваемость ГА в России регистрируется в пределах от 5 до 15 случаев на 100 тыс. населения. Вместе с тем ГА может протекать в скрытой, бессимптомной форме, и поэтому реальная заболеваемость ГА, возможно, значительно превышает число учтенных случаев. ГА в основном заканчивается выздоровлением. Случаи смертельных исходов регистрировались у больных старшего возраста и при сопутствующих заболеваниях [1]. Риск летального исхода при ГА составляет менее 0,1% у детей, у людей моложе 40 лет риск возрастает до 0,3%, у лиц старше 40 лет — до 2,1% [2].

Возбудителем заболевания является вирус ГА (ВГА), представитель рода Hepatovirus, семейства Picornaviridae, отряда Picornavirales. Плюс-РНК-геном ВГА имеет длину в 7500 н. К 5′-концу РНК ВГА ковалентно присоединен белок VPg, а 3′-конец полиаденилирован. Имеются 5′- и 3′-нетранслируемые области (НТО). Для генотипирования ВГА используется участок генома, кодирующий части белков VP1/2A [3].

Россию относят к странам средней эндемичности по ГА, но интенсивность вспышек отличается в разных регионах России. Молекулярная эпидемиология ВГА изучалась в Санкт-Петербурге и Карелии в 1997–2003 гг. [4]. В клинических образцах и образцах из окружающей среды преобладающим субгенотипом ВГА был выявлен IA. У получателей внутривенных лекарств были идентифицированы IA- и IIIA-субгенотипы ВГА в 2001–2003 гг. Из 88 изолятов ВГА только один имел генотип IB [4]. В Якутии в 2004–2005 гг. было исследовано 37 больных ГА, у 24 из них был выявлен субтип IIIA, у остальных выявлялся субтип IA [5]. Таким образом, анализ генотипов ВГА, циркулирующих на территории России, проводился только среди больных в европейской части и Якутии [3, 5]. На территории Сибири подобных исследований до сих пор не проводилось. Следовательнно, отсутствие информации о генетических особенностях изолятов ВГА в Сибирском регионе определяло актуальность данной работы.

Целью настоящего исследования являлось изучение генетических особенностей изолятов ВГА, циркулирующих в Сибирском регионе.

В соответствии с этой целью были сформулированы следующие основные задачи исследования:

1. Провести анализ серопозитивных и серонегативных в ИФА на IgM к ВГА образцов сывороток от пациентов, поступивших в 2001–2002 гг. в больницы Новосибирска, Барнаула и Иркутска, на присутствие РНК ВГА с помощью ОТ-ПЦР и в случае положительного результата определить нуклеотидные последовательности участка генома, кодирующего части белков VP1, 2B и белок 2A ВГА.

2. Провести филогенетическое сравнение полученных нуклеотидных последовательностей выявленных изолятов ВГА с нуклеотидными последовательностями известных штаммов ВГА.

Материалы и методы. В работе использовали сыворотки крови и фекалии, собранные в 2001–2002 гг. от пациентов, поступивших в инфекционные больницы Сибирского региона трех крупных городов (Новосибирск, Барнаул и Иркутск) с диагнозом «острый гепатит» и следующими симптомами: лихорадка, желтуха, боль в животе, увеличение печени, повышение уровня АЛТ. Образцы крови и кала были взяты на момент госпитализации.

Больницы, из которых поступали образцы: городская инфекционная клиническая больница № 1 (МИКБ) (г. Новосибирск), клиника инфекционных болезней, городская больница № 5 (г. Барнаул), городская инфекционная клиническая больница (г. Иркутск).

Шифры образцов были следующими: г. Новосибирск: KIV, TTG, KDI, BTG, UYAS; г. Барнаул: HIA, KNG, MOI; г. Иркутск: CHAP, LVV, DYUA.

Исследование проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» [6]. Комплект документов (протокол исследования, информированное согласие и анкета) прошел утверждение Этического Комитета в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». Забор крови проводился после получения письменного согласия информированного пациента с использованием стерильных одноразовых систем «Вакутайнер» («Бектон Дикинсон», Германия; сертификат соответствия РОСС.ДЕ.ИМО8.А01047).

Все поступившие сыворотки были проверены в ИФА на наличие специфических АТ класса IgM к ВГА с помощью тест-систем — «Вектогеп А – IgM» («Вектор-Бест»).

Сыворотку крови получали согласно «Инструкции по применению вакутайнеров».

Суспензию фекалий (10%) готовили перемешиванием в 0,1М Na-фосфатном буфере, pH 7,4, центрифугировали 15 мин при 4800*•g для удаления нерастворимого дебриса.

На основании сравнения нуклеотидных последовательностей различных штаммов ВГА, депонированных в международной базе данных GenBank, и праймеров, предложенных Pina [7], нами были рассчитаны и синтезированы олигонуклеотидные праймеры для выявления РНК ВГА и секвенирования участка генома, кодирующего части белков VP1, 2B и белок 2A ВГА [8].

Выделение вирусной РНК из клинических образцов проводили с помощью реактива TRIzol® согласно инструкции производителя. ОТ-ПЦР, очистку ПЦР-фрагментов и анализ нуклеотидных последовательностей проводили, как описано ранее [8].

Филогенетический анализ осуществляли с использованием программы MEGA 4. Для оценки достоверности группирования применяли бутстреп-тест. Топология дерева была восстановлена при помощи метода объединения ближайших соседей. Матрица генетических расстояний была рассчитана с применением метода Кимуры с двухпараметрической метрикой.

Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей ВГА проводили с прототипными изолятами ВГА: генотипов IA- HAS-15 (здесь и далее, номер последовательности в базе данных GenBank X15464), CR326 (M10033,1), GBM wt (X75215), M2 (AY974170), AH2 (AB020565), FH2(AB020568), FG (X83302), Moscow-1999-122 (AY226591), Serpukhov-2001-101(AY226610), Podolsk-2001-83 (AY226609), IT-ILG-00 (AJ505623), BaliA06-72 (AB298164.1); IB генотипа- HM175 wt (M14707), MBB (M20273), Germany 2007/2008 (EU416258); IIA генотипа- CF53Bern (AY644676); IIIA генотипа- Nor21 (AJ299464); V генотипа- AGM27 (D00924).

Результаты и их обсуждение. Методом ОТ-ПЦР на присутствие РНК ВГА был исследован 131 образец (45 проб сывороток, 86 проб фекалий) от пациентов с серопозитивными в ИФА сыворотками, поступивших в 2001–2002 гг. в больницы Новосибирска, Барнаула и Иркутска с диагнозом «острый гепатит» и 101 образец серонегативных в ИФА сывороток от пациентов с диагнозом «вирусный гепатит невыясненной этиологии».

Из 45 серопозитивных образцов сывороток крови, исследованных методом ОТ-ПЦР, РНК ВГА была обнаружена в 25 случаях. Процент выявления РНК ВГА составил 55,6%. Из 86 образцов фекалий от пациентов с серопозитивными сыворотками в 64 образцах была обнаружена РНК ВГА, что составило 74,4%. Выявляемость РНК ВГА была выше в образцах фекалий, что согласуется с литературными данными о кратковременной виремии и более длительной экскреции вируса с фекалиями [9, 10]. Таким образом, РНК ВГА была обнаружена в 89 случаях из 131.

РНК ВГА в 101 серонегативном образце сывороток была выявлена в 12 случаях (11,8%). При этом в трех случаях было выявлено смешанное инфицирование гепатитами А и С. В литературе и ранее подчеркивалась важность ОТ-ПЦР в выявлении ВГА у больных при смешанных инфекциях [11].

Таким образом, были определены нуклеотидные последовательности фрагментов, полученных в ОТ-ПЦР, для 101 изолята ВГА (89 серопозитивных и 12 серонегативных) с исследуемой территории.

В исследовании использовался фрагмент генома ВГА длиной 309 н. (2852–3161 н., координаты по геному штамма HAS-15 (X15464)), который включает в себя общепринятый [3, 12] при исследованиях вариабельности ВГА (2924–3092 н.), и содержал фрагмент генома, кодирующего части белков VP1, 2B и белок 2A. Таким образом, нами был исследован более протяженный и информативный фрагмент генома ВГА.

Сравнение определенных нуклеотидных последовательностей фрагментов геномов 101 изолята ВГА (62 изолята из Иркутска, 23 — из Новосибирска, 16 — из Барнаула) с таковыми известных штаммов показало, что все последовательности группируются с последовательностями IA-субгенотипа (рисунок). Изоляты образовывали внутри IA-субгенотипа 2 группы. Первая группа объединяла 92 изолята из всех трех городов, филогенетически близких к штаммам ВГА HAS-15 (США), CR-326 (Коста-Рика); M2 (Куба), IT-ILG-00 (Италия), BaliA06-72 (Индонезия). Вторая группа объединяла 9 изолятов из г. Новосибирска TTG413 и TTG415, г. Барнаула KNG305 и из г. Иркутска (CHAP 310, 319, 323; LVV 77, 88, 92), филогенетически близких к российским штаммам и штаммам из Японии (AH2, FH2). При этом 20 изолятов 1-й группы оказались идентичными между собой и не отличались от штамма ВГА HAS-15.

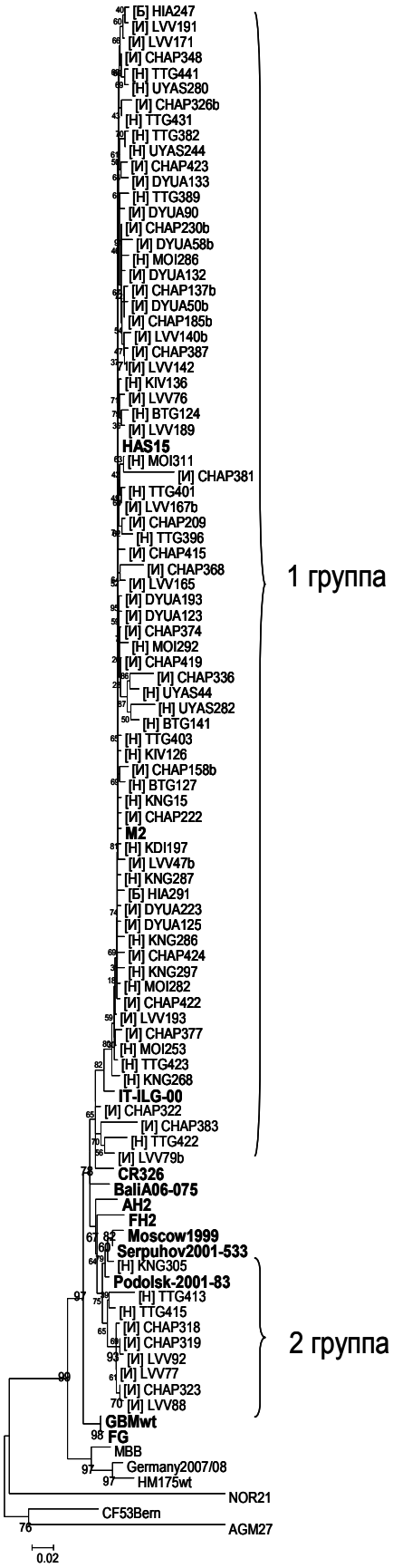
Между изолятами ВГА первой группы из разных городов не оказалось существенных отличий. Видимо, в данное время на территории 3-х крупных городов Сибири циркулировали генетически близкие варианты ВГА IA-субгенотипа. Во вторую группу также попали изоляты из всех 3 городов.

Наличие двух групп свидетельствовало об одновременной циркуляции двух вариантов ВГА IA-субтипа. Все выявленные изоляты отличались от зарубежных европейских изолятов GBM (Германия) и FG (Италия), образующих отдельную ветвь внутри IA-субгенотипа.

Фрагменты геномов 66-ти изолятов содержали значимые нуклеотидные отличия, приводящие к аминокислотным отличиям в белках VP1, 2A и 2B. Среди них были выявлены ранее не описанные варианты ВГА, имевшие уникальные аминокислотные отличия в белках VP1, 2A и 2B в сравнении с прототипными изолятами.

Необходимо отметить, что три крупных города Сибири — Новосибирск, Барнаул и Иркутск — являются большими транспортными узлами, что позволяет говорить об исследовании основных штаммов, циркулирующих на территории Сибири.

Таким образом, впервые на протяжении эпидемического сезона (2001–2002 гг.) было проведено изучение клинических изолятов ВГА от больных с острыми гепатитами в 3 крупных городах Сибири (Барнауле, Новосибирске и Иркутске) и показано, что заболевания ГА (в 101 выявленном случае) были обусловлены двумя вариантами ВГА IA-субгенотипа.



Примечания:

1. Здесь и далее длина линии отражает генетическую дистанцию.
2. Значения индекса поддержки в узлах ветвей указаны после 1000 репликаций.
3. [Н] — Новосибирск, [Б] — Барнаул, [И] — Иркутск.
4. Прототипные изоляты выделены жирным шрифтом.
5. b — безмаркерные пробы.

Рисунок — Филогенетическое дерево, построенное на основе частичных (VP1, 2A 2B) нуклеотидных последовательностей геномов ВГА, выявленных в изолятах, циркулирующих на территории Сибири

Выводы:

1. В 101 случае была обнаружена РНК ВГА у пациентов, поступивших в 2001-2002 гг. в больницы Новосибирска, Барнаула и Иркутска, и определены нуклеотидные последовательности участка генома, кодирующего части белков VP1, 2B и белок 2A ВГА.

2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей участка генома (VP1-2A-2B) выявленных изолятов ВГА показал принадлежность их всех к IA-субгенотипу. Выявленные изоляты образовали внутри IA-субгенотипа 2 группы, что свидетельствует об одновременной циркуляции двух вариантов ВГА IA-субтипа.

Литература

1. Gust, I.D. Epidemiological patterns of hepatitis A in different parts of the world / I.D. Gust // Vaccine. — 1992. — Vol. 10, suppl. 1. — S56–S58.

2. Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C / S. Vento [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1998. — Vol. 338. — P. 286–290.

3. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions / B.H. Robertson [et al.] // J. Gen. Virol. — 1992. — Vol. 73, Pt. 6. — P. 1365–1377.

4. Molecular epidemiology of hepatitis A in St. Petersburg, Russia, 1997–2003 / I. Davidkin [et al.] // J. Med. Virol. — 2007. — Vol. 79. — P. 657–662.

5. Генотипы вируса гепатита А в Якутии: распространенность и клиническое значение / И.В. Карандашова [и др.] // 13-й междунар. конгр. по приполярной медицине: материалы. — Новосибирск, 2006.

6. Основы законодательства Рос. Федерации об охране здоровья граждан: в ред. Указа Президента Рос. Федерации от 24.12.1993 № 2288 «О мерах по приведению законодательства Российской Федерации в соответствие с конституцией Российской Федерации»; Федеральных законов от 02.03.1998 № 30-ФЗ, от 20.12.1999 № 214-ФЗ [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://www.med-pravo.ru/Law/Osnovy/RazdelyOsnov.htm. — Дата доступа: 02.07.2011.

7. Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis / S. Pina [et al.] // J. Gen. Virol. — 2001. — Vol. 82. — P. 2955–2963.

8. Генетическое разнообразие вируса гепатита А в Сибири / В.А. Терновой [и др.] // Вопр. вирусологии. — 2006. — Т. 51, № 1. — С. 23–27.

9. Skinhøj, P. Epidemiological aspects of viral hepatitis A and B infections. A review with special reference to serological studies in isolated areas / P. Skinhøj // Dan. Med. Bull. — 1981. — Vol. 28. — P. 177–192.

10. Fecal excretion of Greek strains of hepatitis A virus in patients with hepatitis A and in experimentally infected chimpanzees / N.C. Tassopoulos [et al.] // J. Infect. Dis. — 1986. — Vol. 154. — P. 231–237.

11. Исследование эффективности и области применения метода гнездовой ПЦР при диагностике гепатита А / А.И. Глухов [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол. — 2004. — № 6. — С. 88–91.

12. Jansen, R.W. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method / R.W. Jansen, G. Siegl, S.M. Lemon // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1990. — Vol. 87. — P. 2867–2871.

Поступила 22.07.2011

COMPARATIVE GENETIC ANALYSIS OF HEPATITIS A VIRUS ISOLATES IDENTIFIED IN SIBERIAN REGION

Bondarenko T.Yu.[1], Ternovoy V.A.[1], Chausov E.V.[1], Kochneva G.V.[1], Sivolobova G.F.[1], Grazhdantseva A.A.[1], Netesov S.V.[2]

[1]State Research Center of Virology & Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region; [2]Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Using RT-PCR analysis the RNA of hepatitis A virus (HAV) was identified in 101 patients admitted to hospitals in the Siberian region, and the nucleotide sequence of genome fragments that encode proteins of VP1, 2B and 2A protein of HAV were determined. Phylogenetic analysis showed affiliation of all HAV isolates identified to subgenotype IA. The two groups of IA subgenotype were revealed: group 1 combined 92 isolates (91%) and was similar to HAV strains HAS-15 (USA), CR326 (Costa Rica); M2 (Cuba), IT-ILG-00 (Italy) and BaliA06-72 (Indonesia); group 2 combined isolates close to the European Russian strains and strains (AH2, FH2) from Japan.

Keywords: isolate, hepatitis A virus, RT-PCR, molecular epidemiology.

СПЕКТР И МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ-КОНТАМИНАНТОВ ВОДЫ ПЛАВАТЕЛЬНЫХ БАССЕЙНОВ

Амвросьева Т.В., Казинец О.Н., Безручко А.А., Гринкевич П.И., Поклонская Н.В., Богуш З.Ф.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Представлены результаты исследования контаминация воды плавательных бассейнов энтеро-, рота-, адено-, норо-, гепатита А вирусами по наличию антигенов и генетического материала. В отношении цитолитических энтеро- и аденовирусов проведены исследования в культурах чувствительных клеток. Установлен спектр вирусов-контаминантов воды плавательных бассейнов. Доминирующими вирусами были энтеровирусы, реже обнаруживались аденовирусы и в единичных случаях были выявлены рота- и гепатита А вирусы. Среди обнаруженных цитолитических вирусов идентифицированы вирусы Коксаки В1, В4, КА21, Е11, Е25. Изучены молекулярно-биологические характеристики выделенных изолятов энтеровирусов и осуществлен их филогенетический анализ.

Ключевые слова: энтеровирусы, ротавирусы, аденовирусы, вирус гепатита А, санитарно-вирусологический контроль воды плавательных бассейнов.

Введение. По современным представлениям, вода плавательных бассейнов (ВПБ) и аквапарков является одним из факторов риска заражения людей вирусными инфекциями. Проблема эпидемической безопасности ВПБ в отношении патогенных для человека вирусных агентов является актуальной во всем мире. По данным зарубежных исследователей, в последние годы отмечается рост числа вспышек вирусных инфекций, связанных с посещением данных водных объектов [1–6].

Целью настоящей работы было установление спектра вирусов-контаминантов ВПБ и изучение молекулярно-эпидемиологических характеристик их доминирующих представителей.

Материалы и методы. В работе исследовано 110 проб вод 4 плавательных бассейнов (детского, взрослого, спортивного и санаторного), которые отбирались с кратностью 2 раза в месяц на протяжении 2009–2010 гг. с помощью «Установки для улавливания вирусов автономной» (ТУ BY 100185198.081-2006, производства ИФОХ НАН Беларуси). Отбор проб проводили в двух точках — на «входе», перед подачей воды в чашу бассейна, и непосредственно в самой «чаше» бассейна. В пробах определяли специфические маркеры — генетический материал (РНК/ДНК) и антиген (АГ) рота- (РВ), норо- (НВ), адено- (АдВ), энтеровирусов (ЭВ) и вируса гепатита А (ВГА) методами ПЦР и ИФА. В отношении цитолитических ЭВ и АдВ проводили исследования в культурах чувствительных клеток RD, BGM, Hep-2c (производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Секвенирование участков ДНК осуществляли в термоциклической реакции с коммерческим набором DTCS Quick Start Kit с последующим анализом продуктов на ДНК-анализаторе CEQ8000 (производства BECKMAN COULTER). 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 4. Генетические расстояния между последовательностями определяли на основании модели нуклеотидных замен Tamura-Nei. Реконструкцию филогенетических древ проводили с помощью алгоритма neighbor-joining. Достоверность топологий полученных филогенетических древ оценивали методом псевдореплик (анализировались 1000 псевдореплик) [6].

Результаты и обсуждение. По результатам ПЦР, общий уровень выявления генетического материала вирусов (РНК, ДНК) в исследованных пробах достигал 11,8%. При этом «в чаше» бассейнов уровень вирусного загрязнения был более высоким (7,27%) по сравнению с таковым «на входе», что представляется вполне логичным с учетом антропогенного механизма контаминации ВПБ вирусными патогенами. «В чаше» бассейнов был выявлен генетический материал РВ, ЭВ и АдВ, уровень детекции которого составил 0,9, 3,64 и 2,7% соответственно. Как видно по полученным результатам, доминирующими водными контаминантами были ЭВ. Генетический материал АдВ был обнаружен только в чаше взрослого и детского бассейнов, доля таких положительных проб составила 2,7%. Положительных результатов на наличие РНК НВ в исследованных пробах не было выявлено.

При исследовании ВПБ на наличие АГ ЭВ доля положительных проб была несколько меньше по сравнению с результатами ПЦР и составила 6,36%. АГ ВГА и РВ обнаруживались, как и при определении соответствующих РНК, в единичных случаях.

Следует отметить, что данные, полученные при параллельном анализе проб методами ИФА и ПЦР в процессе осуществления санитарно-вирусологических исследований ВПБ, были вполне сопоставимыми, что является основанием для их рекомендации в качестве рутинных экспресс-методов по выявлению вирусной контаминации этих водных объектов.

При анализе полученных результатов в динамике по месяцам оказалось, что ЭВ обнаруживались как во взрослом, так и в детском бассейнах на протяжении всех сезонных периодов года. Маркеры АдВ выявлялись в зимне-весенний период. Положительные пробы на наличие маркеров РВ и ВГА были зарегистрированы в феврале (только во взрослом бассейне). Анализируя полученные данные в зависимости от назначения бассейнов, можно заметить определенные различия в спектре детектируемых вирусов. Так, во взрослом бассейне были обнаружены маркеры РВ и АдВ, в детском — ЭВ и АдВ, в спортивном — только ЭВ.

Как известно, выявление вирусных АГ или РНК/ДНК в воде не отвечает на вопрос о степени ее эпидемической опасности вследствие отсутствия информации об инфекционности обнаруженного вирусного материала. Данное обстоятельство диктует необходимость использования при санитарно-вирусологическом контроле комплекса методов, включающих не только ИФА и ПЦР, но и выделение инфекционных вирусов в культурах чувствительных клеток. В отношении детектируемых кишечных вирусов такие исследования выполнимы только для цитолитических вирусов, к которым, среди перечня потенциальных вирусов-контаминантов, относятся ЭВ и АдВ. Следует отметить, что благодаря этим свойствам ЭВ принято использовать в качестве индикаторов вирусного загрязнения питьевых и поверхностных вод [7].

Для выявления в ВПБ инфекционных ЭВ проводились исследования на клеточных линиях RD, BGM, Hep-2c в трех последовательных пассажах. Обнаружено 7 цитопатических агентов (ЦПА), 6 из которых идентифицированы как ЭВ, относящиеся к серотипам КВ1, КВ4, КА21, Е11, Е25, и 1 — как АдВ.

Сопоставляя полученные результаты по выделению вирусов в культурах клеток и выявлению их генетического материала в ПЦР, было установлено, что инфекционными свойствами (способностью заражать клетки и размножаться в них) обладали лишь 66,7% обнаруженных вирусных агентов.

Далее в отношении выделенных из ВПБ вирусов Коксаки А21 и ECHO 11 были проведены молекулярно-эпидемиологические исследования. Молекулярное типирование данных вирусов и анализ их филогенетических взаимоотношений были проведены на основе секвенирования нуклеотидной последовательности фрагмента VP1-кодирующего региона вирусного генома и сравнения с имеющимися в базе данных GenBank последовательностями прототипных штаммов различных серотипов ЭВ [8].

Анализируемый вирус Коксаки А21 обнаружил наибольшее сходство с прототипными штаммами Коксаки А21 Kuykendall и Coe: доля отличий от нуклеотидных последовательностей VP1-регионов (413 нуклеотидов) этих штаммов составила 11,4% (рисунок 1). При изучении филогенетических взаимоотношений данного вирусного изолята с вирусами, циркулировавшими в разные годы в других странах, было установлено, что в генетическом отношении выделенный нами вирус был наиболее близок изолятам из Китая 1999–2003 гг. Средняя доля различий в нуклеотидной последовательности между белорусским и китайскими вирусами составила — 3%. От выделенных в США вирусов белорусский изолят отличался в среднем на 5,6%. Наиболее «отдаленными» оказались вирусы, выделенные в 2000 г. в Бангладеш: средняя доля различий с белорусским изолятом составила 20,1%.

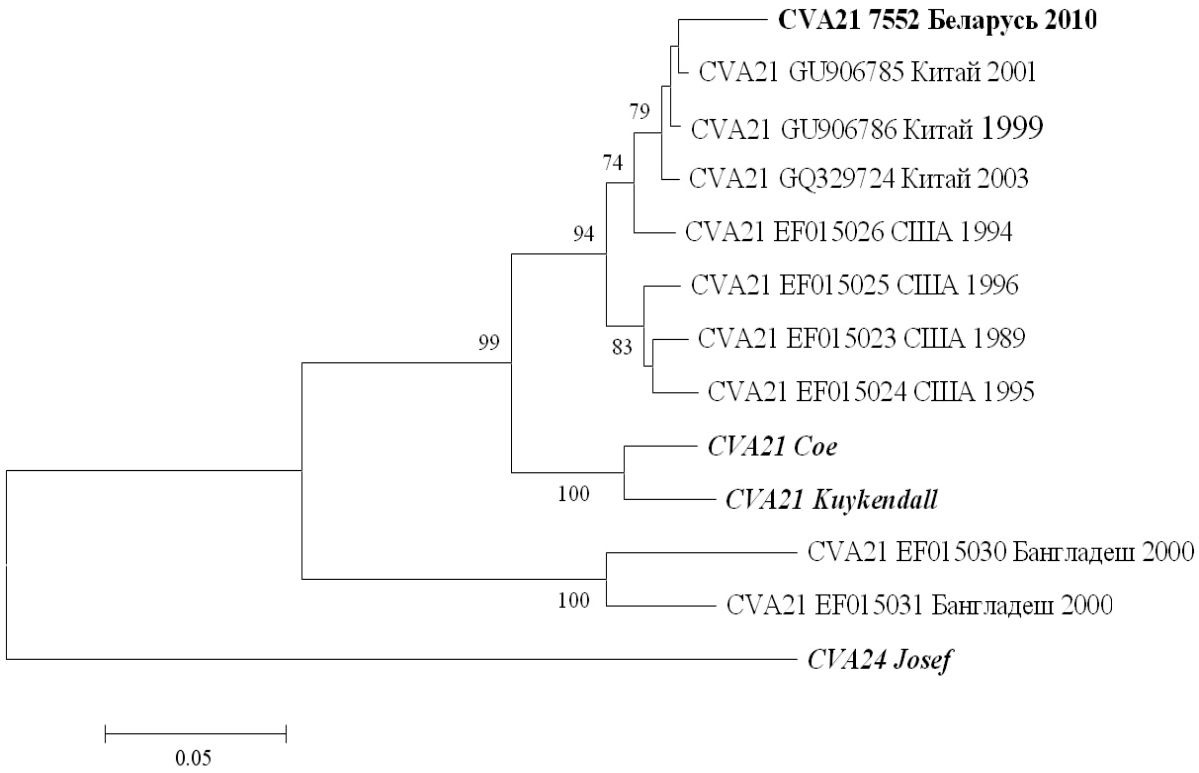


Рисунок 1 — Филогенетические связи изолята Коксаки А21 (№ 7552)

На дендрограмме, представленной на рисунке 2, отражены филогенетические связи изолята ECHO 11, выделенного из ВПБ. Молекулярно-эпидемиологические исследования этого вирусного агента показали, что наименьшая эволюционная дистанция отделяла этот вирус от прототипных штаммов серотипа ECHO11 Silva (20,8%) и Gregory (23,1%). Данный изолят вируса ECHO 11 вместе с изолятом вируса ECHO 11, выделенным нами в 2006 г. из пищевых продуктов (расстояние между ними составило 6,6%), располагались обособленно: в базе данных GenBank не были обнаружены вирусы, имеющие с ними более 90% идентичных нуклеотидов на исследуемом участке генома (303 нуклеотида). Наименьшее расстояние, порядка 12–13%, отделяло белорусский изолят от вирусов, циркулировавших в Европе, США и России в 80–90-х гг. XX века. Имеющиеся в литературе результаты недавних исследований по изучению циркуляции вирусов ECHO 11 в европейских странах [8] дали возможность сравнить изучаемый нами изолят из ВПБ с вирусными агентами, выделенными из клинического материала в разных странах Европы. Оказалось, что данный изолят отличается (по нуклеотидной последовательности фрагмента VP1-региона) от циркулировавших в последнее десятилетие вирусов ECHO 11 на 18% и более. Так, генетическое расстояние, разделявшее его с вирусом ECHO 11, выделенным в Беларуси другими исследователями в 2008 г. [9], составило 18,5%, а с вирусом, циркулировавшим в Украине в 2007 г., оно превысило 21,1%. Еще один изолят ECHO 11 (№ 5318), выделенный в 2006 г. в Беларуси из пищевых продуктов, был также значительно удален от вируса, изолированного из ВПБ: в их последовательностях отличались 16,5% нуклеотидов.

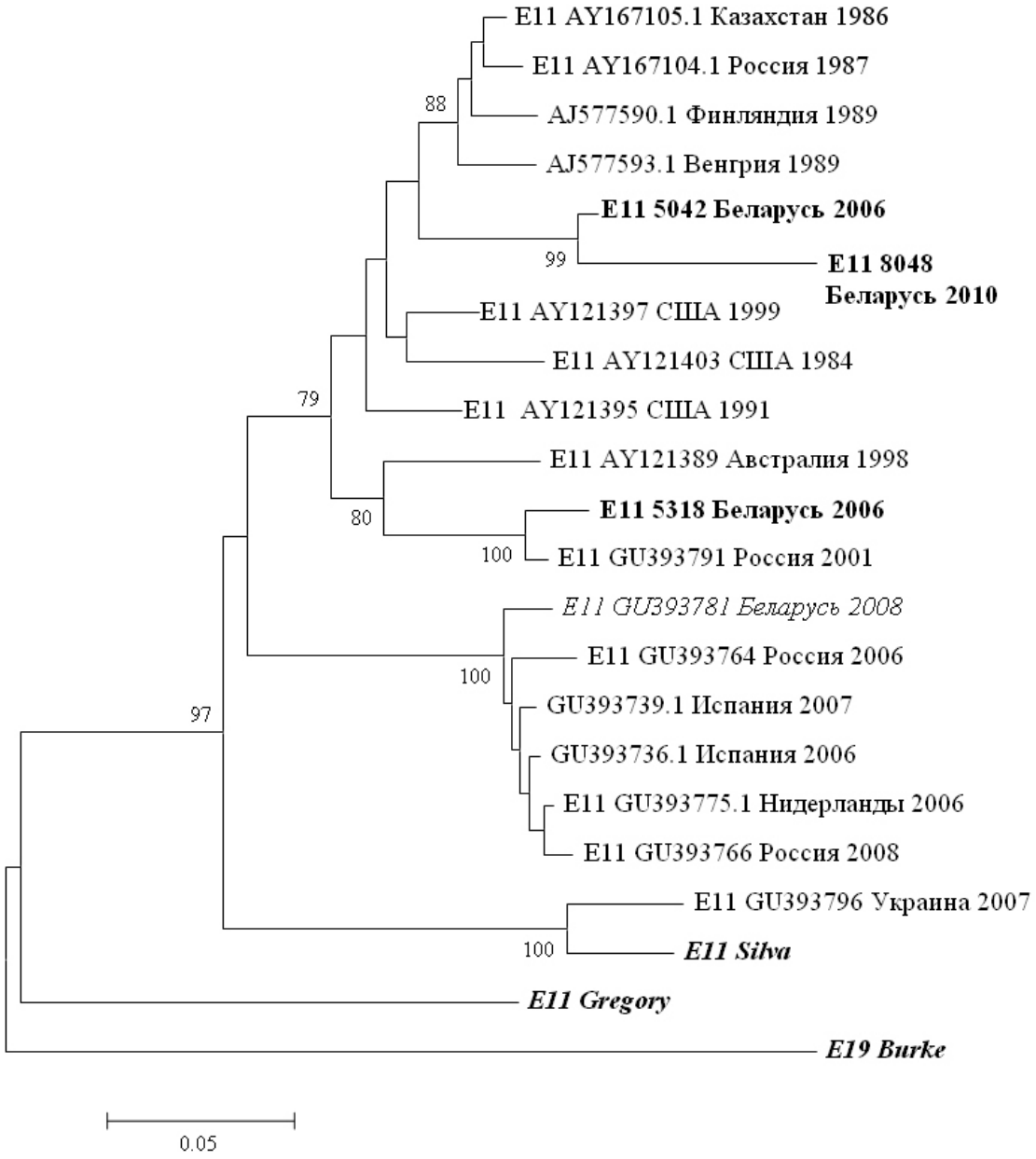


Рисунок 2 — Филогенетические связи изолята ECHO 11 (№ 8048)

Таким образом, исследуемый изолят вируса ECHO 11 в значительной степени отличается от вирусов этого серотипа, связанных с заболеваемостью различными формами энтеровирусной инфекции в Европе в последние годы.

Учитывая тот факт, что вирусы, выделенные нами из ВПБ, обладали значительной степенью отличий от вирусов, выделенных из клинического материала больных, можно предположить высокую вероятность циркуляции данных геновариантов среди здоровых людей и возможность их бессимптомного носительства.

Литература

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Aseptic meningitis outbreak associated with echovirus 9 among recreational vehicle campers — Connecticut, 2003 // MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. — 2004. — Vol. 53, N 31. — P. 710–713.

2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). An outbreak of norovirus gastroenteritis at a swimming club — Vermont, 2004. // MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. — 2004. — Vol. 53, N 34. — P. 793–795.

3. An outbreak of aseptic meningitis due to echovirus 30 associated with attending school and swimming in pools / A. Faustini [et al.] // Int. J. Infect. Dis. — 2006. — Vol. 10, N 4. — P. 291–297.

4. An outbreak of hepatitis A associated with swimming in a public pool / F.J. Mahoney [et al.] // J. Infect. Dis. — 1992. — Vol. 165, N 4. — P. 613–618.

5. Outbreak of norovirus illness associated with a swimming pool / L.J. Podewils [et al.] // Epidemiol. Infect. — 2007. — Vol. 135, N 5. — P. 827–833.

6. Van Heerden, J. Detection and risk assessment of adenoviruses in swimming pool water / J. Van Heerden, M.M. Ehlers, W.O. Grabow // J. Appl. Microbiol. — 2005. — Vol. 99, N 5. — P. 1256–1264.

7. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. EVol. — 2007. — Vol. 24. — P. 1596–1599.

8. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification / M.S. Oberste [et al.] // J. Virol. — 1999. — Vol. 73. — P. 1941–1948.

9. Инструкция по санитарно–вирусологическому контролю водных объектов: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 12.04.2005, № 134-1204. — Минск, 2005. — 21 с.

10. Evolutionary dynamics and temporal/geographical correlates of recombination in the human enterovirus echovirus types 9, 11, and 30 / E.C. McWilliam Leitch [et al.] // J. Virol. —2010. — Vol. 84, N 18. — P. 9292–9300.

Поступила 26.07.2011

SPECTRUM AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SWIMMING POOL WATER VIRAL CONTAMINANTS

Amvrosieva T.V., Kazinetz O.N., Biazruchka A.A., Grinkevich P.I., Paklonskaya N.V., Bogush Z.F.

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

The article presents the results of sanitary-virological and molecular epidemiological studies of water from swimming pools of various types (for adults, for children, sport and health facilities) carried out to detect the markers of enteric viruses: entero-, rota-, noro-, adenoviruses, and HAV. The signs of viral contamination (viral RNA or antigens) were found in the water of swimming pools of all types. The prevalent contaminants were enteroviruses, adenoviruses were less frequent, while rotaviruses and HAV were found only in isolated cases. Cytolytic entero- and adenoviruses were introduced to sensitive cell cultures. The following serotypes were identified: Coxsackieviruses B1, B4, A21 and Echoviruses 11, 25. Molecular epidemiological investigation included molecular typing and phylogenetic analysis of Echovirus 11 and Coxsackieviruses A 21 isolates.It was shown that the Echovirus 11 isolates had a significant degree of difference from viruses isolated from clinical samples, which suggested high probability of the genetic variant circulation among healthy individuals and possibility of asymptomatic carriage.

Keywords: enteric viruses (entero-, noro-, rotavirus, hepatitis A virus), sanitary-virological control, swimming pool water, phylogenetic analysis.

ВИРУСНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД И ОЦЕНКА ИХ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

Богуш З. Ф., Амвросьева Т. В.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Представлены данные о спектре, типовой структуре и биологических свойствах неполиомиелитных энтеровирусов, циркулировавших в поверхностных водах на территории Республики Беларусь в период 2001–2010 гг. Проанализированы уровни их энтеровирусного загрязнения. Показано, что в последние годы уровни вирусной контаминации поверхностных вод имеют тенденцию к снижению.

Ключевые слова: неполиомиелитные энтеровирусы, поверхностные воды, мониторинг, лабораторный контроль, эпидемическая безопасность.

Введение. Одним из важных эпидемически значимых для здоровья человека объектов окружающей среды являются поверхностные воды. Проблема загрязнения рек, озер, водохранилищ, искусственных и естественных водоемов, а также поверхностных источников питьевого водоснабжения инфекционными патогенами широко изучается во всем мире. К настоящему времени накоплено множество фактов, свидетельствующих о присутствии широкого спектра кишечных вирусов (энтеро-, рота-, калици-, адено-, корона-, астровирусов, вирусов гепатита А и Е) в этих водных объ-

ектах [1]. Попадая с фекалиями больного человека или носителя в достаточно высоких концентрациях во внешнюю среду, вирусные частицы механически распространяются со сточными водами, являющимися первым звеном в цепи перемещения вирусных частиц в природе, а затем проникают в воду поверхностных водоемов и далее — в питьевую воду. Контаминированная вирусами поверхностная вода довольно часто является причиной возникновения вспышек и эпидемий вирусных инфекций в мире [2], в том числе и на территории Республики Беларусь. Так, в таблице 1 приведены данные Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, свидетельствующие о причастности контаминированных инфекционными патогенами поверхностных вод к вспышечной заболеваемости населения республики в период 1994–2001 гг.

Таблица 1 — Водные вспышки инфекционных заболеваний на территории Республики Беларусь в бассейне реки Днепр (1994-2001 гг.)

Населенный пункт, река, год	Название инфекции	Причина	Количество заболевших (общее/из них дети до 14 лет)
п. Ореховск Днепр, 1994	Дизентерия	Загрязненная бактериями питьевая вода	119/29
г. Гомель Сож, 1997	Серозный энтеровирусный менингит	Загрязненная энтеровирусами питьевая вода	631/487
г. Мозырь Припять, 1997	Вирусный гепатит А	Загрязненная вирусом гепатита А вода речного водозабора	37/37
г. Корма Сож, 1998	Вирусный гепатит А	Загрязненная вирусом гепатита А питьевая вода	14/11
д. Рогинь Сож, 2000	Дизентерия	Загрязненная бактериями питьевая вода	30/20
г. Давид-городок Горынь, 1997	Вирусный гепатит А	Загрязненная вирусом гепатита А питьевая вода	31/0
д. Ольшаны Горынь, 1998	Вирусный гепатит А	Загрязненная вирусом гепатита А питьевая вода (колодцы)	12/12
г.п. Городище Припять, 2000	Вирусный гепатит А	Загрязненная вирусом гепатита А питьевая вода	21/21
д. Рубель Горынь, 2000	Вирусный гепатит А	Загрязненная вирусом гепатита А питьевая вода	21/20
г. Славгород Сож, 1994	Дизентерия	Загрязненная бактериями питьевая вода	124/53
д. Ржавка Сож, 2000	Вирусный гепатит А	Загрязненная вирусом гепатита А питьевая вода (колодцы)	48/39
п. Тимоново Сож, 2001	Вирусный гепатит А	Загрязненная вирусом гепатита А питьевая вода	47/32

Из вышеизложенного становится очевидным, что поверхностные воды, являясь универсальным, постоянно меняющимся компонентом окружающей среды, до настоящего времени остаются одним из мощных факторов распространения широкого круга инфекционных заболеваний. В этих условиях эпидемическое благополучие населения во многом зависит от качества и эффективности осуществляемого надзора за циркуляцией вирусных агентов в этих эпидемически значимых объектах.

Настоящая работа посвящена анализу результатов проводимого в Республике Беларусь лабораторного контроля за циркуляцией неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ) в поверхностных водах (по данным вирусологической лабораторной службы) и оценке их эпидемической безопасности.

Материалы и методы исследования. За десятилетний период (2001–2010 гг.) проведено 5388 санитарно-вирусологических исследований проб поверхностных вод. Выделение инфекционных НПЭВ осуществляли стандартным методом параллельно на двух клеточных линиях. В работе использовали перевиваемые линии клеток RD (клетки эмбриональной рабдомиосаркомы человека), BGM (клетки почечной ткани обезьяны (Buffalo green monkey kidney), Hep-2C

(клетки карциномы гортани человека), Fl (клетки амниона человека). Идентификацию выделенных вирусов осуществляли в реакции нейтрализации (РН) с использованием кроличьих иммунных сывороток производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов [3]. Сбор и концентрирование вирусов из воды проводили проточным методом при использовании «Установки для улавливания вирусов автономной» (ТУ BY 100185198.081-2006) производства ИФОХ НАНБ (г. Минск, Республика Беларусь) в комплекте с «Набором для сбора и концентрирования вирусов из поверхностных вод, водоисточников и колодцев с помощью автономной установки» (ТУ BY 10055803.123-2006), а также с помощью «Наборов для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды в системе децентрализованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, поверхностных и сточных вод» (ТУ РБ 100558032.047-2001) производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (г. Минск, Республика Беларусь) согласно инструкции по применению. Индикацию антигенов (АГ) НПЭВ проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (ТУ РБ 100558032.092-2004) согласно инструкции по применению. Выделение РНК, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) со стадией обратной транскрипции для детекции РНК ЭВ в исследуемых образцах осуществляли с использованием коммерческих наборов («TRI Reagent», Sigma, «RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase», Fermentas, «Энтеровирус-207», AmpliSens) в соответствии с инструкциями производителей. Для анализа продуктов ПЦР-амплификации использовали метод гель-электрофореза [4].

Результаты исследования и их обсуждение. В Республике Беларусь санитарно-вирусологические исследования воды поверхностных водоемов осуществляются при выборе и эксплуатации источников централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, при оценке эпидемической безопасности водных объектов, используемых для рекреационных целей, отдыха и купания. Основными инструктивными документами, регламентирующими порядок, методы и оценку результатов исследований являются: Инструкция по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов (2005, рег. № 134-1204), Инструкция по применению «Санитарно-бактериологический, санитарно-вирусологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов» (2009, рег. № 037-0405). Данные документы соответствуют Санитарным правилам и нормам 2.1.2.12-33-2005 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод от загрязнения», утвержденными постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 28.11.2005 № 198. Согласно действующей инструктивной базе текущий санитарно-вирусологический контроль качества поверхностных вод предусматривает исследования по обнаружению энтеровирусных АГ и/или РНК, в случае устойчивого их выявления (в двух повторно взятых пробах) проводится детекция инфекционных энтеровирусных агентов в культуре клеток.

Анализ данных, полученных на базе лабораторий территориальных центров гигиены и эпидемиологии в рамках осуществляемого санитарно-вирусологического контроля поверхностных вод, показал, что ежегодно такому исследованию подвергается порядка 500–700 проб (рисунок 1). В структуре общереспубликанских долгосрочных исследований водных объектов на долю поверхностных вод приходится 8,86% (рисунок 2). В 2010 г. этот показатель был несколько ниже среднереспубликанского и составил 6,21%. В региональном аспекте в 2010 г. процент исследования воды открытых водоемов в общей структуре санитарно-вирусологических исследований колебался от 1,68% в Гродненской области до 9,67% в Витебской. В Брестской, Могилевской областях и г. Минске этот показатель составил 6,85, 5,07 и 3,0% соответственно. Гомельский и Минский регионы в 2010 г. не проводили исследований воды открытых водоемов по вирусологическим показателям.

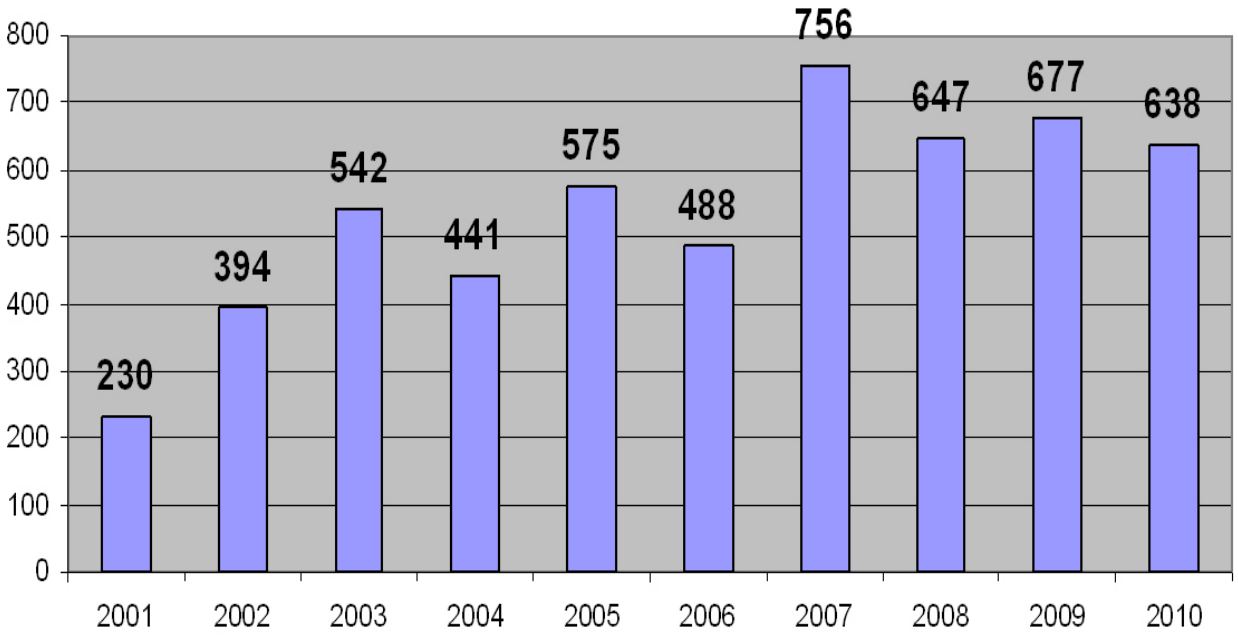


Рисунок 1 — Динамика количества исследованных проб поверхностных вод в Республике Беларусь за 10-летний период наблюдений

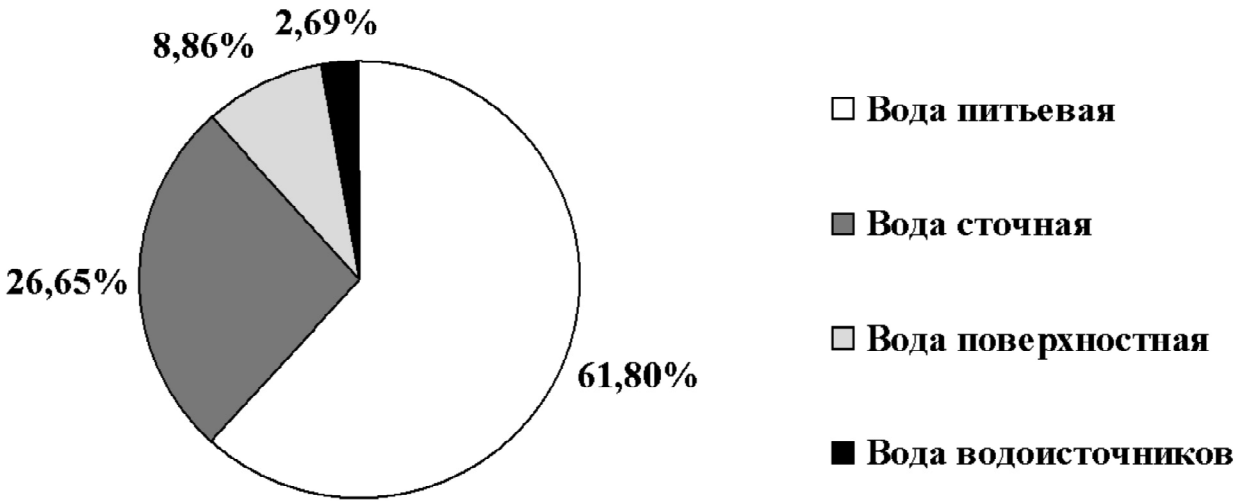


Рисунок 2 — Общереспубликанская структура исследований водных объектов за 10-летний период

Общереспубликанский показатель количества нестандартных по вирусологическим показателям проб поверхностных вод за 10-летний период наблюдений составил 2,28%. В годовой динамике уровни вирусной контаминации колебались в пределах 0,93% в 2008 г. до 5,9% в 2003 г. (рисунок 3). Наиболее высокие показатели вирусного загрязнения отмечались в 2001 г. (4,78%) и 2003 г. (5,9%), когда в стране регистрировалась вспышечная заболеваемость энтеровирусной инфекции (ЭВИ) с подтвержденным действием водного фактора. Достаточно высоким — 3,55% — был уровень контаминированных поверхностных вод и в 2009 г. В этом же году, по сравнению с предыдущим, был зарегистрирован подъем показателя вирусного загрязнении питьевой воды (1,57 против 0,52% в предыдущем году) и, как следствие, рост показателя заболеваемости населения республики с 8,93 (на 100 тыс. населения) в 2008 г. до 10,24 в 2009 г.

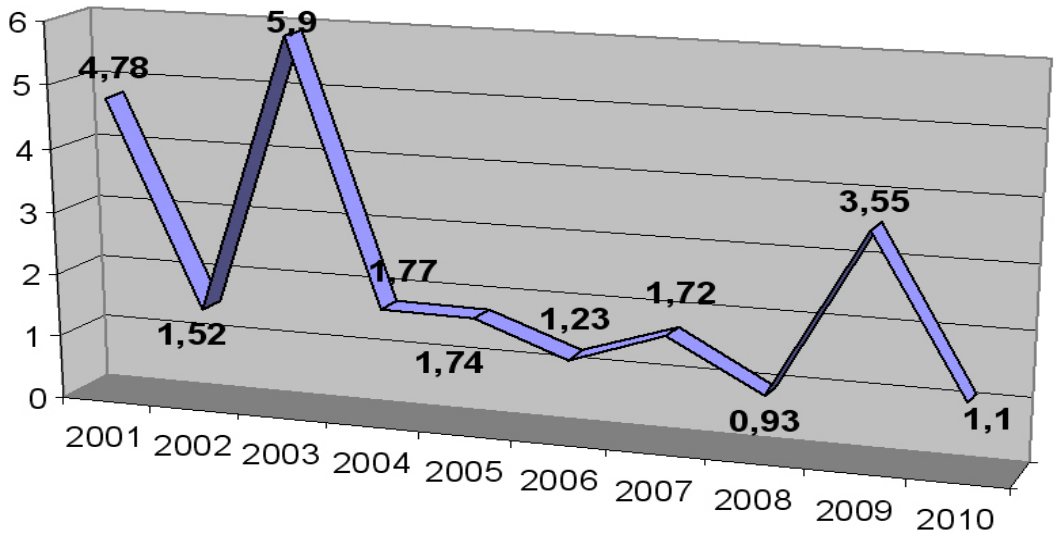


Рисунок 3 — Годовая динамика уровней вирусной контаминации воды открытых водоемов

В общей структуре ЭВ, выделенных из водных объектов на территории Республики Беларусь (всего 841 изолят), доля инфекционных агентов, обнаруженных в воде открытых водоемов, составила 8,32% (70 ЭВ). В отдельные годы этот показатель достигал значительно более высоких значений. Так, в 2001 г. он составил 12,22% (11 из 90), в 2002 г. — 11,76% (6 из 51).

Спектр ЭВ, циркулировавших в поверхностных водах (таблица 2), включал представителей как серогруппы ECHO (ECHO 6, 11, 20, 25, 1-6, 7-13), так и *Coxsackie B* (*Coxsackie B* 1, 4, 5, 1-6). Среди них доминировали вирусы *Coxsackie B5, Coxsackie B4* и ECHO 11.

Таблица 2 — Спектр НПЭВ, циркулировавших в поверхностных водах Республики Беларусь в 2001-2010 гг.

Год	Серотип НПЭВ
2001	CB 4,5; ECHO 11,20; н/т EV
2002	CB 1-6; ECHO 1-6, 7-13
2003	CB 5; ECHO 11; н/т EV; AV
2004	CB 1
2005	CB 1-6
2006	–
2007	CB 5; н/т ЭВ
2008	ECHO 6
2009	–
2010	ECHO 11,25

Заключение. В настоящее время лабораторная служба нашей страны благодаря наличию на отечественном рынке необходимых диагностических и санитарно-вирусологических препаратов, а также современных инструктивных документов имеет реальную возможность осуществления регулярного и эффективного мониторинга за циркуляцией НПЭВ в поверхностных водных объектах в рамках проводимых санитарно-вирусологических исследований водных объектов. Результаты ежегодно выполняемых анализов позволяют получать достаточно полное представление об уровнях загрязнения поверхностных водоемов республики энтеровирусными агентами, установить их спектр и динамику циркуляции, типовую структуру и биологические свойства [5, 6] и, в конечном итоге, дать оценку их эпидемической безопасности. Несмотря на наметившуюся в последние годы тенденцию к снижению уровня энтеровирусного загрязнения поверхностных вод, их санитарно-вирусологический контроль сохраняет свою актуальность. Наличие на территории республики трансграничных рек, которые используются как источники питьевого водоснабжения (например, р. Днепр), требует постоянного совершенствования системы вирусологического надзора за поверхностными водами, направленного на гарантированное и устойчивое обеспечение эпидемической безопасности населения страны в отношении вирусных инфекций с водным путем передачи.

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

Литература

1. Конторович, В.Б. Вирусологическое обследование различных вод Московского региона / В.Б. Конторович, Г.П. Кашкарова // Гигиена и санитария. — 2002. — № 2. — С. 65–67.
2. Water quality / eds. L. Fewtrell, J. Bartram. — London: IWA Publishing, 2001.
3. Инструкции по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 12.04.2005 № 135-1204. — Минск, 2005. — 28 с.
4. Desselberger, U. Medical Virology. A practical approach. / U. Desselberger. — New York, 1995. — 214 p.
5. Вирусное загрязнение водных объектов. Проблемы и перспективы их санитарно-вирусологического контроля / Т.В. Амвросьева [и др.] // ЭКВАТЭК-2008: материалы междунар. конгр. — Москва, 2008. — Сек. 9. — С. 1–6.
6. Состояние и результаты лабораторного контроля за возбудителями энтеровирусной инфекции в Республике Беларусь / З.Ф. Богуш [и др.] // Мед. панорама. — 2008. — № 11. — С. 7–11.

Поступила 08.08.2011

VIRAL CONTAMINATION OF SURFACE WATER AND ASSESSMENT OF ITS EPIDEMICAL SAFETY

Bohush Z.F., Amvrosieva T.V.

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

In the paper the data on the range of types and biological features of non-polio enteroviruses isolated from surface water in Belarus in 2001–2010 are presented. Level of surface water viral contamination have been analyzed, it's concluded that there is a trend of water contamination decrease in the recent years.

Keywords: non-polio enteroviruses, surface water, surveillance, laboratory control, epidemical safety.

ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Русанович А.В.[1], Коломиец Н.Д.[2], Гринь В.В.[1], Наройчик Л.К.[1], Карабан И.А.[3]

[1]Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья;
[2]Белорусская медицинская академии последипломного образования;
[3]Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Минск, Беларусь

Резюме. В Республике Беларусь эпидемия ВИЧ-инфекции имеет две стадии: начальную и концентрированную. Начальная стадия охватывает период с 1987 по 1998 гг. Концентрированная стадия (1999 г. по настоящее время) сформировалась за счет сексуальных партнеров потребителей наркотиков и лиц, инфицированных половым путем, сменой ведущего пути передачи ВИЧ от парентерального к половому.

Ключевые слова: ВИЧ инфекция, пути передачи, концентрированная эпидемия, группы риска.

В соответствии с классификацией всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) эпидемия ВИЧ/СПИД имеет три стадии развития: начальная, концентрированная, генерализованная. На начальной стадии распространенность ВИЧ-инфекции не достигает значительного уровня, ни в одной из групп населения. Выявленные случаи инфекции относятся, в основном, к лицам, поведение которых связано с повышенным риском ВИЧ-инфицирования. Во всех определенных группах населения распространенность ВИЧ устойчиво не превышает 5%. Концентрированная стадия характеризуется быстрым распространением ВИЧ-инфекции только среди определенных групп населения, что указывает на активизацию рискованного поведения в определенных группах населения. Распространенность ВИЧ-инфекции устойчиво превышает пять процентов в одной или нескольких декретированных группах населения. При этом среди беременных женщин, проживающих в городах, распространенность ВИЧ не превышает одного процента. Генерализованная стадия свидетельствует о прочном укоренении ВИЧ-инфекции среди населения в целом. Уровень распространенности ВИЧ-инфекции среди беременных женщин устойчиво выше одного процента [1, 2].

Целью исследования явилось изучение характера развития эпидемии ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь в период с 1987 г. по настоящее время.

Материалы и методы. Для оценки эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь были использованы данные, поступающие в ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» после статистической обработки с помощью компьютерных программ «STATISTICA v.6.0» и «Спектрум». Объем выборки эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции составил 11 759 человек. Определение маркеров ВИЧ-инфекции проводили с помощью иммуноферментного анализа, иммуноблоттинга, полимеразной ценой реакции в соответствии с действующими нормативными документами Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Результаты и обсуждение. Впервые случаи ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь были зарегистрированы в 1987 г. среди иностранных граждан. В период 1987–1995 гг. было зарегистрировано 113 случаев ВИЧ-инфекции. Среди ВИЧ-инфицированных 89 (78,8 ± 3,8%) человек имели половой путь передачи, (преимущественно гетеросексуальный); 8 (7,1 ± 2,4%) человек заразились за счет внутривенного употребления наркотических веществ; 5 (4,4 ± 1,9%) детей инфицировались от матерей; в 2 (1,8 ± 1,2%) случаях инфицирование произошло в результате оказания медицинской помощи в клиниках Российской Федерации и для 9 (7,9 ± 2,5%) пациентов причина инфицирования не была установлена.

В 1996 г. был отмечен стремительный подъем заболеваемости ВИЧ-инфекцией (с 0,07 на 100 тыс. населения в 1995 г. до 9,9 на 100 тыс. населения в 1996 г.), связанный с инфицированием ВИЧ лиц, внутривенно употребляющих наркотические вещества, поскольку из 1021 зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции 954 (93,4 ± 0,8%) человек имели парентеральный путь инфицирования. Половой путь передачи инфекции был установлен у 33 (3,2 ± 0,6%), в 6 (0,5 ± 0,2%) случаях передача ВИЧ произошла вертикальным путем от ВИЧ-инфицированной матери ребенку. Причина инфицирования не была установлена для 29 (2,8 ± 0,5%) пациентов, поскольку обследование проходило анонимно.

С 1997 по 1999 гг. наблюдается снижение заболеваемости с 9,9 до 4,0 на 100 тыс. населения. В этот период времени превалирует парентеральный путь передачи ВИЧ. В 1997 г. в результате инъекционного употребления наркотических веществ инфицировались 87% от общего числа зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции, в 1998 г. — 78,3%, в 1999 г. — 69,3%. При этом прослеживается тенденция к снижению роли парентерального пути передачи ВИЧ и росту полового пути. Исследования, проведенные в 1997 и 1999 гг. в городах Гомельской области с наиболее интенсивным распространением ВИЧ-инфекции (города Светлогорск, Жлобин, Октябрьский) среди беременных женщин, показали, что распространенность ВИЧ-инфекции в этой группе не превышает 1% и составляет 0,6 ± 0,3 и 0,4 ± 0,1% соответственно.

С 1999 г. в республике снова наблюдается тенденция к росту заболеваемости ВИЧ-инфекцией (с 4,0 на 100 тыс. населения в 1999 г. до 11,3 на 100 тыс. населения в 2010 г.). По кумулятивным данным (1987–2010 гг.), 49,8% ВИЧ-инфицированных заразилось ВИЧ-инфекцией при внутривенном введении наркотических веществ. Основной путь заражения в период 1999–2003 гг. — внутривенное потребление наркотиков. В 2004 г. удельный вес парентерального заражения снизился и составил 46,2%.

С 2004 г. отмечается рост передачи ВИЧ-инфекции половым путем (преимущественно гетеросексуальные контакты), на протяжении 2008–2010 гг. на этот путь инфицирования приходилось 75–76,8% вновь выявленных случаев инфекции. Увеличение удельного веса полового пути передачи ВИЧ-инфекции прослеживается как среди женского, так и мужского населения. В 2010 г. 87,4% ВИЧ-инфицированных женщин и 64,1% ВИЧ-инфицированных мужчин заразилось при половых контактах.

Несмотря на значительное снижение числа новых случаев заражения ВИЧ при внутривенном потреблении наркотических веществ (в 2010 г. всего 20,9%), по данным дозорного эпидемического надзора, проведенного среди потребителей инъекционных наркотиков (ПИН), уровень инфицированности в данной группе остается высоким и варьирует в достаточно широких пределах 1–30%.

По данным официальной статистики, за весь период наблюдения за ВИЧ-инфекцией (1987–2010 гг.) зарегистрирован всего 61 случай инфекции среди мужчин, имеющих сексуальные отношения с мужчинами (МСМ). Из них 28 (45,9% от всех инфицированных МСМ) выявлено в период 2008–2010 гг. По-видимому, вовлеченность в эпидемический процесс в этой группе значительно выше, что во многом связано с боязнью раскрытия своей сексуальной ориентации. В 2009 г. показатель инфицированности ВИЧ среди МСМ по сравнению с 2006 г. значительно возрос (с 0,2 ± 0,18 до 2,1 ± 0,7%), что свидетельствуют об активизации эпидемического процесса в этой группе.

В группе женщин, вовлеченных в секс-бизнес, по данным эпидемиологического мониторинга, отмечается рост серопревалентности с 0,98 ± 0,5% в 2006 г. до 2,9 ± 0,8% в 2009 г. Показатель распространенности ВИЧ среди беременных женщин колеблется в пределах 0,09–0,06%.

По состоянию на 1 января 2011 г., в Республике Беларусь зарегистрировано 11 759 случаев ВИЧ-инфекции, показатель распространенности составил 100,4 на 100 тыс. населения, т.е. около 0,1% жителей страны (рисунок 1). Оценочный показатель распространенности ВИЧ в возрастной группе 15–49 лет находится на уровне 0,2–0,3%. По данным многолетних наблюдений, отмечается тенденция к росту заболеваемости ВИЧ-инфекцией (с 7,5 на 100 тыс. населения в 2006 г. до 11,25 на 100 тыс. населения в 2010 г.), темп прироста +45,8%. Наибольшее количество ВИЧ-позитивных лиц (78,05% от общего числа зарегистрированных случаев) проживают в Гомельской области — 5965 человек (показатель распространенности 317,2 на 100 тыс. населения), г. Минске — 1665 человек (показатель распространенности 79,5 на 100 тыс. населения) и Минской области — 1548 человек (показатель распространенности 94,3 на 100 тыс. населения) [3].

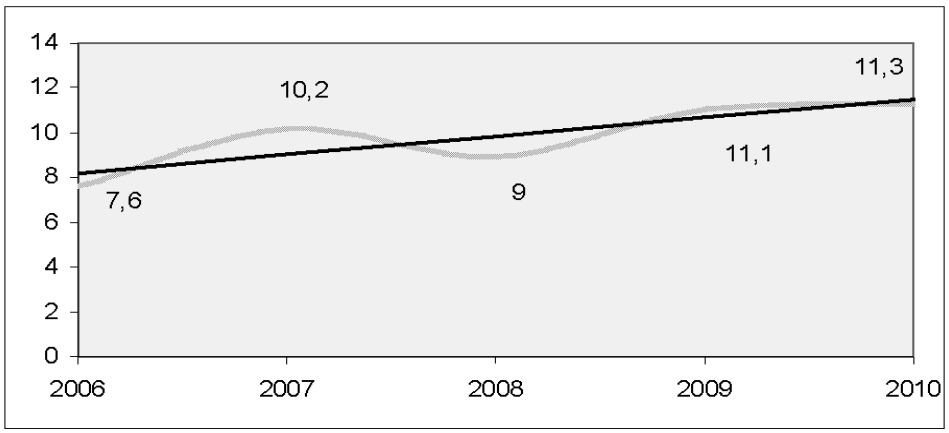


Рисунок 1 — Динамика изменения показателя распространенности ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь

В эпидемический процесс в основном вовлечены молодые люди в возрасте 20–29 лет. Удельный вес этой возрастной группы составляет 55,9% от общего количества зарегистрированных случаев в стране (рисунок 2).

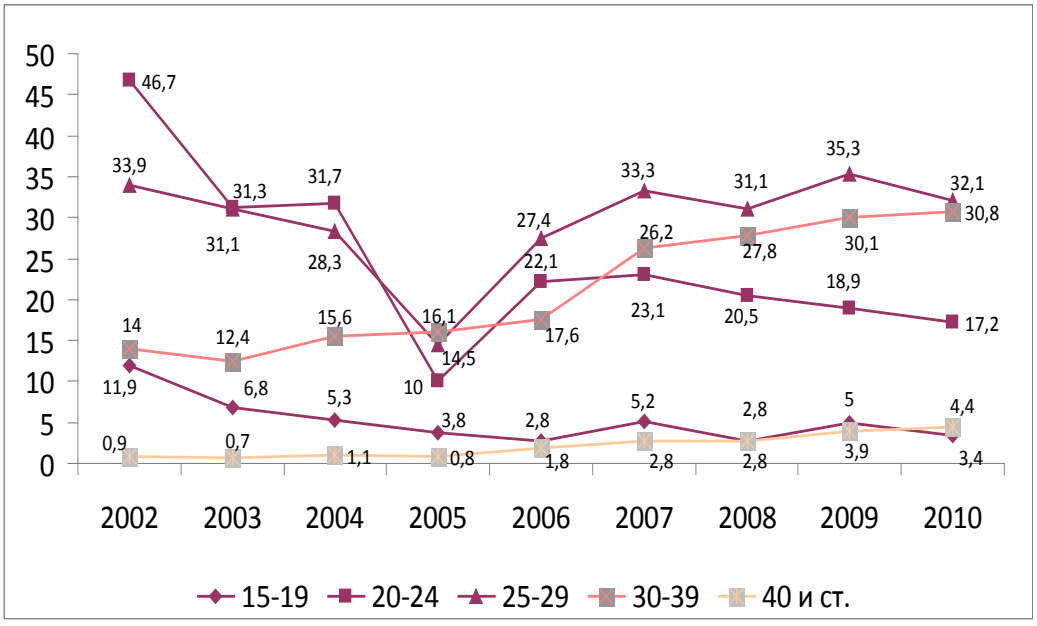


Рисунок 2 — Распределение случаев ВИЧ-инфекции по возрастам

Анализ данных многолетних наблюдений показал, что изменения произошли не только в изменении путей передачи, но и в распределении инфицированных по социальному статусу и возрастной структуре. Если в период с 1996 по 2004 гг. в структуре заболеваемости преобладали люди без определенной занятости и лица из мест лишения свободы, то с 2005 г. и по настоящее время отмечается тенденция к росту удельного веса лиц рабочих специальностей и служащих, что свидетельствует о вовлечении в эпидемический процесс лиц, не относящихся к группам риска по инфицированию ВИЧ. Отмечается тенденция к увеличению в структуре заболеваемости удельного веса рабочих (с 25,1% в 2006 г. до 35,6% в 2010 г.), служащих (с 4,2% в 2006 г. до 7,4% в 2010 г.) и к снижению доли лиц без определенной занятости (с 40,1% в 2006 г. до 36,9% в 2010 г.), студентов (с 3,0% в 2006 г. до 1,6% в 2010 г.), школьников (с 2,7% в 2006 г. до 1,5% в 2010 г.)

Заключение. В соответствии с современной классификацией ВОЗ, в Республике Беларусь можно выделить две стадии развития эпидемии ВИЧ-инфекции: начальную, охватывающую временной промежуток с 1987 по 1998 гг. и концентрированную, развившуюся с 1999 г. по настоящее время. На данном этапе распространенность ВИЧ-инфекции в группе потребителей инъекционных наркотических веществ устойчиво превышает 5% и составляет 10,7%. Среди беременных женщин в городских районах распространенность ВИЧ составляет менее одного процента (0,06%). Отмечается преимущественно половой путь передачи ВИЧ, в котором значительную роль играют сексуальные партнеры наркопотребителей. Наблюдающаяся негативная тенденция к вовлечению в эпидемический процесс людей, не относящихся к группам риска по инфицированию ВИЧ (рабочие и служащие), создает риск выхода вируса из групп риска в широкие слои населения.

Литература

1. Доклад о глобальной эпидемии СПИДа 2008 г. / UNAIDS/08.25R/ JC1510E / пер. на рус. яз. — Минск, 2008.
2. Развитие эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь / А.В. Русанович, Н.Д. Коломиец, В.В. Гринь, Л.К. Наройчик, Е.В. Федорович // Медицина. — 2011. — № 1. — С. 60–63.
3. Эпидситуация по ВИЧ/СПИДу в Республике Беларусь: информ. бюл. / Респ. центр гигиены, эпидемиол. и обществ. здоровья. — Минск, 2011.

Поступила 27.07.2011

EPIDEMIOLOGICAL SITUATION OF HIV INFECTION IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Rusanovich A.V.[1], Kolomiets N.D.[2], Grin V.V.[1], Naroichyk L.K.[1], Karaban I.A.[3]

[1]Republican Center of Hygiene, Epidemiology and Public Health;
[2]Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education;
[3]Ministry of Health of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

In Belarus, the epidemic of HIV infection has two stages: the initial and concentrated. The initial stage covers the period from 1987 to 1998. The concentrated phase (1999 to present) was generated by sexual partners of drug users and people infected through sex, the change of the leading modes of HIV transmission from parenteral to sex.

Keywords: HIV infection, concentrated epidemic, the consumption of drugs, sexual transmission.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ В ГОМЕЛЬСКОМ РЕГИОНЕ

Мамчиц Л.П., Пекарец Е.И.

Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Резюме. Изучены клинико-эпидемиологические особенности герпетической инфекции у детей, госпитализированных в 2010–2011 гг. в отделение иммунопатологии Республиканского научно-практического центра радиационной медицины и экологии человека. Анализу подвергались данные историй болезни 44 пациентов с герпетической инфекцией в возрасте 4–16 лет, анкеты по изучению медико-социальных причин формирования отклонений в здоровье и заболеваний детей. Основны-

ми группами риска развития рецидивирующей формы герпетической инфекции являются дети пубертатного возраста, наиболее значимые факторы риска — частые ОРИ, контакт с источником инфекции в семье, возраст.

Ключевые слова: герпетическая инфекция у детей, эпидемиологические особенности, факторы риска.

Введение. Герпетическая инфекция отличается широким распространением, многообразием клинических форм и проявлений, хроническим течением, различными путями передачи. В большинстве случаев клиническая симптоматика при этом не развивается. Лишь у 10–15% детей наблюдаются выраженные проявления болезни — первичный простой герпес. После инокуляции возбудителя в кожу или слизистые независимо от наличия или отсутствия клиники развивается вирусемия. Вирус достигает паравертебральных ганглиев, где, перейдя в латентное состояние, персистирует пожизненно [1–4].

Герпетическая инфекция относится к болезням иммунной системы, на развитие которой значительное воздействие оказывают факторы, влияющие на состояние иммунитета человека (медико-социальные, экологические, биологические и др.). Современные условия и образ жизни людей при значительном снижении физических нагрузок и физической активности вносят значительный вклад в заболеваемость населения, увеличивают негативное влияние поведенческих факторов в развитие патологий [5].

В настоящее время во всем мире отмечается тенденция к росту инфицированности и заболеваемости герпетической инфекцией во всех возрастных группах. В связи с этим актуальны проблемы диагностики, профилактики, лечения и предотвращения осложнений данной инфекции.

Целью исследования явилось изучение клинико-эпидемиологических особенностей герпетической инфекции у детей и выявление наиболее значимых факторов риска развития данной инфекции.

Материалы и методы. Применены методы эпидемиологической диагностики, анкетирование, статистические методы. Анализу подвергались данные историй болезни 44 пациентов с герпетической инфекцией в возрасте 4–16 лет, госпитализированных в отделение иммунопатологии Республиканского научно-практического центра радиационной медицины и экологии человека в 2010–2011 гг., анкеты по изучению медико-социальных причин формирования отклонений в здоровье и заболеваний детей. Анкеты состояли из трех блоков вопросов, позволяющих оценить социально-экономическое благополучие семьи, образ жизни и физическую активность, состояние здоровья анкетируемых. Социально-экономическое благополучие семьи оценивали по следующим признакам: жилищно-бытовые условия, число детей в семье, доход на одного члена семьи, проживание в полной (неполной) семье, наличие конфликтных ситуаций, образование родителей. Для изучения образа жизни были предложены вопросы, касающиеся соблюдения основных режимных моментов, питания, оздоровления, физической активности. В блоке вопросов, касающихся состояния здоровья включены вопросы о наличии герпетической инфекции в семье, частоте распространения острых респираторных инфекций.

Для изучения факторов, влияющих на обострение герпетической инфекции у детей, медико-социальных причин формирования отклонений в здоровье и заболеваний детей сформированы две группы исследования: дети с обострениями герпетической инфекции (1 группа, n = 27 человек), и здоровые дети аналогичных возрастных групп (2 группа, n = 36 человек), проведено анкетирование.

Обработка данных проводилась с использованием общепринятых статистических методов и компьютерных программ Microsoft® Office Excel 2010, STATISTICA 6.0.

Результаты исследования и обсуждение. Основной причиной госпитализации больных было обострение лабиального герпеса. По результатам изучения медицинской документации больных детей и подростков с герпетической инфекцией, 65% заболевших имели часто рецидивирующий тип инфекции с обострением заболевания 6 раз и более в год. Преобладали среднетяжелые формы заболевания (52%), тяжелые формы встречались в 48% случаев. Среди общих жалоб, предъявляемых пациентами, были субфебрильная температура, головная боль, повышенная утомляемость и нервозность, нарушения сна, миалгии, в отдельных случаях расстройство желудочно-кишечного тракта. Наиболее частые места локализации высыпаний: губы, нос, щеки, носогубные складки, в единичных случаях были поражены ушные раковины, слизистая полости рта. Чаще герпес регистрировался в возрастной группе 11–14 лет (48%), дети до 10 лет в общей структуре заболевших составили 22,7%, 15–16 лет — 29,3%. Девочки составили 55% в структуре заболевших, мальчики — 45%.

Начало заболевания у всех пациентов отмечалось в раннем возрасте — до 5 лет. Это связано с исчезновением или резким уменьшением содержания в этом возрасте пассивно переданных от матери антител к возбудителю, что делает организм восприимчивым к инфицированию вирусом. У 31,8% больных обострение герпеса возникло не в виде четких нозологических форм, а на фоне острой респираторной инфекции. Сопутствующие заболевания, связанные с нарушением функций иммунной системы (дисбактериоз, аллергия), имели 20,5% детей. У 29,5% пациентов выделен *S. aureus* из носоглотки и зева 10^5–10^7, у 9,1% — *E. coli* 10^5–10^6, что свидетельствует об активизации сапрофитной микрофлоры и, следовательно, о сниженном иммунитете детей с герпетической инфекцией. Все случаи подтверждены лабораторно, у всех больных обнаружены антитела IgG к вирусам простого герпеса 1 и 2 типа, из них в 6,7% также обнаружены антитела IgG к цитомегаловирусам и в 26,7% — к вирусу Эпштейна — Барр.

При изучении социально-экономического благополучия семьи в двух сравниваемых группах существенные различия не выявлены. Большинство опрошенных проживает в отдельных квартирах с достаточной площадью на одного члена семьи (77,8% в первой группе и 83,3% во второй группе), в полных семьях (77,8 и 75% соответственно). Доходы на одного человека в семье оценены как достаточные, выше прожиточного минимума в 3 раза и более, у 55,6% в первой группе и 67% опрошенных второй группы (здоровые дети). Анкетируемые оценили обстановку в семье как благополучную в 77,8 и 83,3% случаях соответственно. Родители имеют высшее образование у 41,5% детей первой группы и 55,6% детей второй группы.

При изучении образа жизни в сравниваемых группах в ответах на вопросы соблюдения режима дня выявлено, что здоровые дети достоверно больше времени проводят на свежем воздухе, чем дети с обострениями герпетической инфекции (рисунок 1).

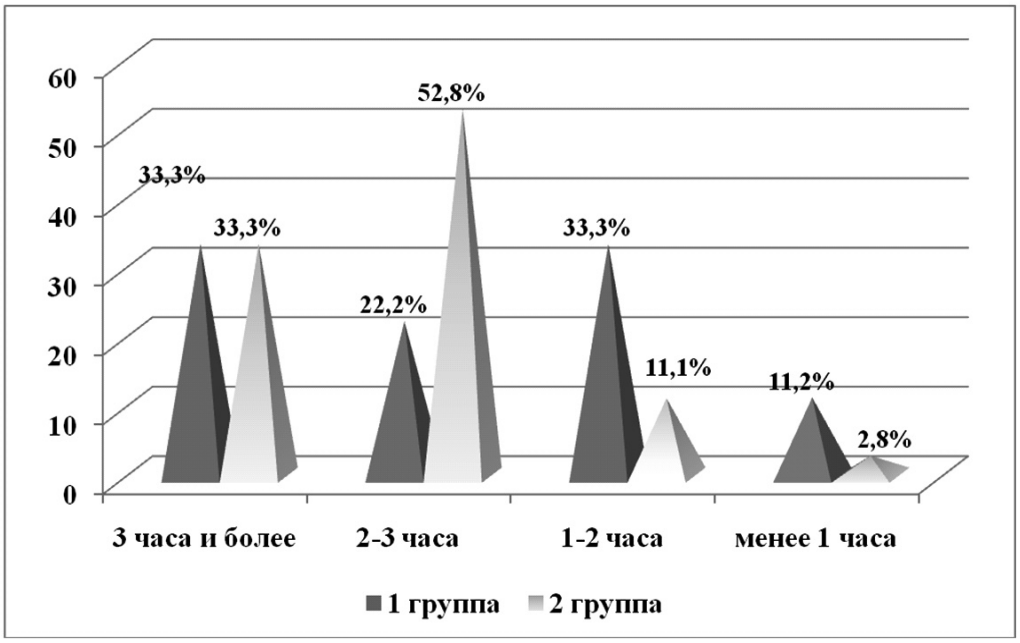


Рисунок 1 — Распределение ответов на вопрос «Сколько времени в режиме дня отводится на прогулки на свежем воздухе?»

Среди детей сравниваемых групп 3 часа и более отводится на прогулки в 33,3% случаев, 2–3 часа — в 22,2 и 52,8% случаев в первой и второй группах соответственно.

Установлены различия при оценке ответов на вопросы, касающиеся занятий физической культурой вне школы. Здоровые дети достоверно чаще занимаются в спортивных секциях, чем дети с обострениями герпетической инфекции (33,3 и 11,1% соответственно). Незанимающихся спортом в 1 группе больше, чем во второй группе (22,3 ± 4,2 и 8,4 ± 2,8% соответственно, $p \leq 0,05$) (рисунок 2).

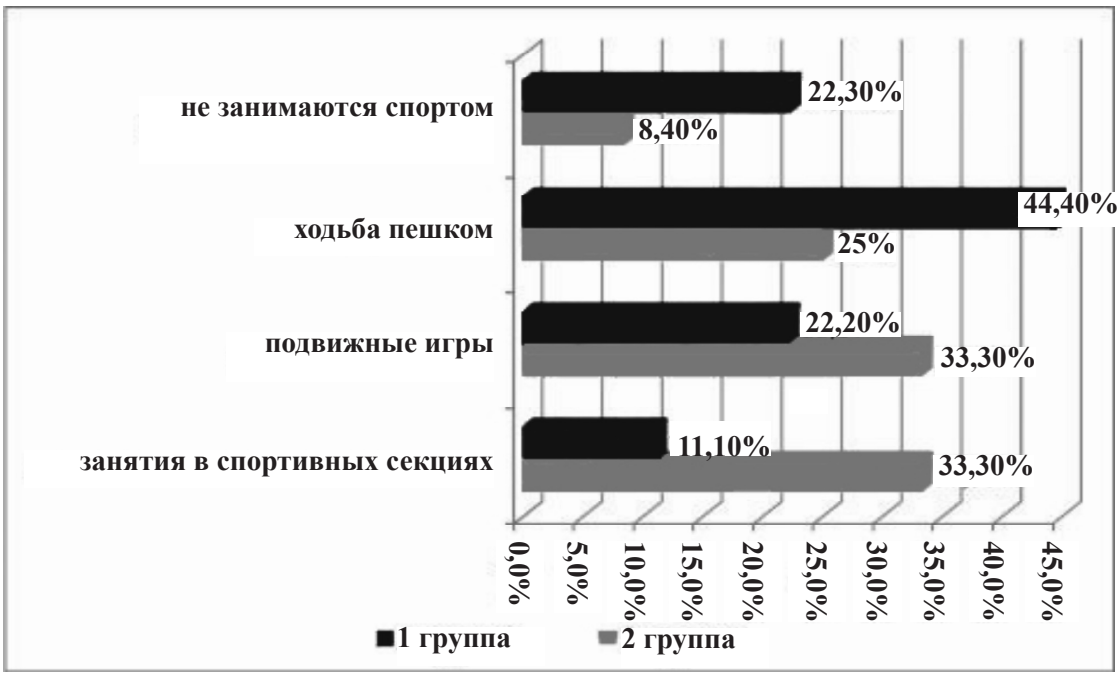


Рисунок 2 — Распределение ответов на вопрос «Занимаетесь ли вы спортом вне школы?»

Достоверно чаще здоровые дети оздоравливаются летом, чем дети с герпетическй инфекцией (соответственно 94,4 ± 2,3 и 66,7 ± 4,7%, p≤0,05). Среди вариантов оздоровления в группе здоровых детей преобладают туристические поездки с семьей за пределы Республики Беларусь (11,1% в первой группе и 52,8% в группе здоровых детей), в группе детей с герпетической инфекцией — отдых в оздоровительных учреждениях (33,3% и 27,8% соответственно) (рисунок 3).

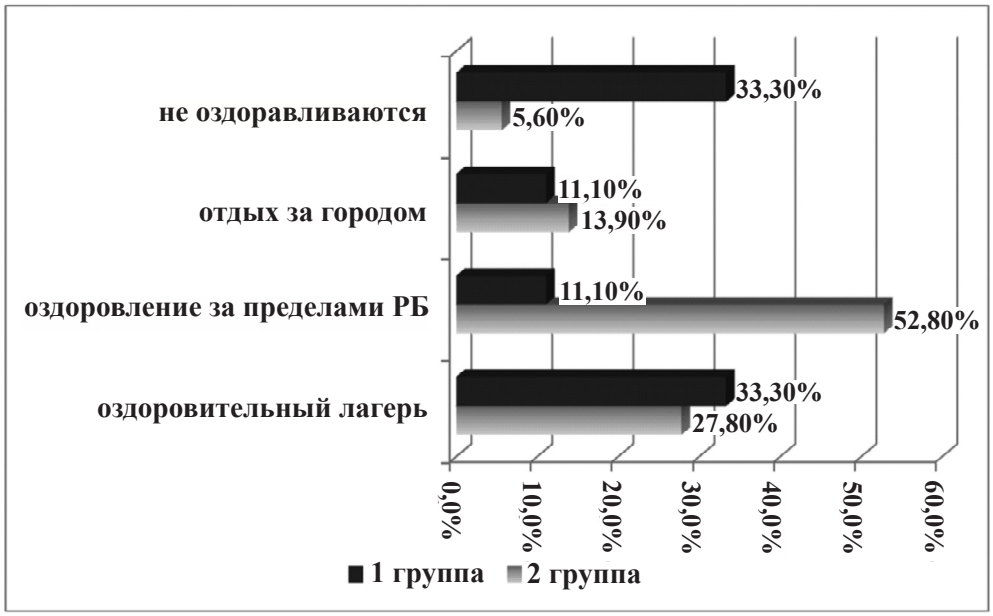


Рисунок 3 — Распределение ответов на вопрос «Где вы оздоравливаетесь летом?»

Результаты анкетирования заболевших детей показали, что в 84% случаев в анамнезе у матери или отца в семье диагностирована герпетическая инфекция. Среди заболевших у 80% частота острых респираторных инфекций (ОРИ) составляет 4 раза и более в год, у 20% опрошенных — 2–3 раза в год. Следовательно, большинство детей с герпетической инфекцией относятся к контингенту часто и длительно болеющих (таблица).

Таблица — Распределение ответов на вопрос «сколько раз в течение года Вы болеете ОРИ?»

Сколько раз в течение года Вы болеете ОРИ?»	1 группа (дети с обострением герпетической инфекции)		2 группа (здоровые дети)	
	Абс.	%	Абс.	%
1 раз в год	1	3,7 ± 1,8	14	38,9 ± 4,8
2–3 раза в год	5	18,5 ± 3,8	16	44,4 ± 4,9
4 раза и более	21	77,8 ± 2,2	5	13,9 ± 3,4
Ни разу не болею	—	-	1	2,8 ± 1,6
Всего	27	100	36	100

Выводы. Основными группами риска развития рецидивирующей формы герпетической инфекции являются дети пубертатного возраста обоих полов, что можно объяснить повышенной восприимчивостью организма к воздействию неблагоприятных факторов в период гормональной перестройки основных физиологических органов и систем. Наиболее значимые факторы риска — частые ОРИ, контакт с источником инфекции в семье, возраст. Имеет значение недостаточное пребывание на свежем воздухе, снижение физических нагрузок, отсутствие полноценного оздоровления в течение года.

Практически целесообразно разрабатывать индивидуальные программы медико-профилактического и лечебно-реабилитационного воздействия для улучшения качества жизни детей с рецидивирующей формой герпетической инфекции. Важным является не только лечение болезней, но и проведение активной профилактической деятельности как основы системного оздоровления с повышением уровня медицинской информированности и вовлечением в физкультурно-оздоровительные мероприятия.

При реализации здоровьесберегающих программ важным направлением должно быть обеспечение ранней диагностики заболеваний, предупреждение обострений и осложнений, выдача лечебно-реабилитационных и оздоровительных рекомендаций, качественное диспансерное наблюдение и др.

Литература

1. Каримова, И.М. Герпесвирусная инфекция. Диагностика, клиника, лечение / И.М. Каримова; под ред. Ю.К. Скрипкина. — М.: Мед. информ. агентство, 2004. — 120 с.

2. Корсунская, И.М. Герпетическая инфекция у детей / И.М. Корсунская, Г.А. Флакс, О.Б. Тамразова // Герпес. — 2009. — № 1. — С. 4–8.

3. Боковой, А.Г. Герпесвирусная инфекция у детей — актуальные проблемы современной клинической практики / А.Г. Боковой // Детские инфекции. — 2010. — № 2. — С. 3–7.

4. Халдин, А.А. Простой герпес / А.А. Халдин // Рос. журн. кож. и вен. болезней. — 2002. — № 2. — С. 42–48.

5. Лучкевич, В.Ч. Качество жизни как объект системного исследования и интегральный критерий оценки здоровья и эффективности медико-профилактических и лечебно-реабилитационных программ: актовая речь / В.Ч. Лучкевич. — СПб.: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2011. — 86 с.

Поступила 21.07.2011

EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF HERPES INFECTION IN CHILDREN IN GOMEL REGION

Mamchits L.P., Pekarec E.

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Clinical and epidemiological features of herpes infections in children hospitalized in the Department of Immunopathology of the Republican Research & Practical Center of Radiation Medicine and Human Ecology in Gomel, Belarus in 2010–2011 were studied. The hospitalization was caused by an acute condition of labial herpes, 65% of the infected patients had recurrent infection with more than 6 acute attacks a year. Herpes was often revealed in the 11–14 age group (48%). The disease was observed to develop at early age, from 2 to 5. 31,8% patients had an acute attack of herpes at the background of acute respiratory infections. 20,5% children had concomitant diseases (disbacteriosis, allergy). The main risk groups are children of pubertal age, risk factors — frequent acute respiratory infections, contact with the source of the infection in family, age, sex, acute respiratory infections.

Keywords: herpetic infection in children, epidemiological features, risk factors.

НОСИТЕЛЬСТВО ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕНОГО РИСКА И ДРУГИХ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ОБЩЕЙ ПОПУЛЯЦИИ ЖЕНЩИН ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ

Волченко А.Н.[1], Воропаев Е.В.[1], Беляковский В.Н.[1], Силин А.Е.[2], Бельская С.В.[3], Шевцова А.Н.[3], Тамеева И.Н.[3], Голубых Н.М.[1], Рубаник Н.Н.[1]

[1]Гомельский государственный медицинский университет;
[2]Республиканский центр радиационной медицины и экологии человека;
[3]Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Гомель, Беларусь

Резюме. В статье представлены результаты обследования женщин общей популяции Гомельской области (n = 1523) на носительство вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР), *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma spp., Mycoplasma hominis,* HSV I–II, CMV. Материалом служили цервикальные мазки, в которых методом ПЦР определялась ДНК возбудителей урогенитальных инфекций. Отмечается высокий уровень носительства ВПЧ ВКР (40,1%) среди женщин общей популяции, причем наибольшая частота обнаружения ДНК ВПЧ ВКР в возрасте до 24 лет (59,8%). Доминирующими генотипами в общей популяции женщин Гомельской области являются ВПЧ-16 (29,3%), ВПЧ-56 (16,3%) и ВПЧ-31 (15,0%). Выявлено, что у ВПЧ-инфицированных статистически значимо чаще одновременно обнаруживается ДНК *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma spp., Mycoplasma hominis*, HSV I–II.

Ключевые слова: вирусы папилломы человека высокого канцерогенного риска, урогенитальные инфекции, носительство.

Введение. Папилломавирусная инфекция (ПВИ) является одной из наиболее распространенных вирусных инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), которой инфицирована большая часть сексуально активного населения. Как и другие урогенитальные инфекции, она является важной проблемой в системе по охране репродуктивного здоровья [1]. В настоящее время известно более 120 типов ВПЧ, которые эпидемиологически разделяются на кожные, тропные к ороговевающему типу эпителия (группы β и γ) и слизистые или аногенитальные, тропные к слизистым оболочкам (группа α). Более 30 генотипов папилломавирусов могут инфицировать генитальный тракт [2]. В 1995 г. Международное агентство по исследованию рака (МАИР) официально объявило, что ВПЧ-16 и ВПЧ-18 являются доказанными канцерогенами [3]. Более поздние клинико-эпидемиологические исследования (Mucoz et al., 2003) подтвердили канцерогенность и других генотипов ВПЧ: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82. Как вероятные канцерогены классифицированы генотипы 26, 53 и 66 [4].

Вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) является этиологическим агентом цервикального рака [3]. Рак шейки матки (РШМ) является наиболее значимой онкологической патологией у женщин. В 2008 г. подсчитано, что ежегодно регистрируется 529 000 случаев заболеваний цервикальным раком и 274 000 смертей от этой патологии по всему миру и имеет тенденцию к росту [5]. В Республике Беларусь также наблюдается рост заболеваемости РШМ (с 15,7 впервые выявленных случаев на 100 тыс. женского населения в 2000 г. до 18,5 случаев, зарегистрированных в 2008 г.), причем увеличение заболеваемости отмечается в основном в группе женщин детородного возраста. В 2009 г. показатель заболеваемости впервые установленным РШМ составил 17,9 случаев на 100 тыс. населения [6]. Распространенность генотипов ВПЧ ВКР имеет свои географические особенности [3]. Фактические данные о распространенности, как преобладающего типа, так и менее распространенных генотипов ВПЧ могут быть ценными при организации мер по вакцинопрофилактике и при мониторинге ее эффективности.

Многие исследования показали, что ВПЧ-инфекция носит в основном временный характер, и только в небольшом проценте случаев инфекция может длительно персистировать и приводить к поражению многослойного плоского эпителия [3]. Длительная персистенция вируса часто ассоциирована с носительством других ИППП [7, 8].

Цель: определить частоту обнаружения ДНК ВПЧ ВКР, а также ДНК *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma spp., Mycoplasma hominis,* HSV I–II, CMV в цервикальных мазках женщин общей популяции Гомельской области и их возможную взаимосвязь, выделить наиболее часто циркулирующие генотипы.

Материалы и методы. Материалом для исследования явились цервикальные мазки, полученные у женщин Гомельской области, прошедших обследование на ДНК ВПЧ ВКР в 2009–2011 гг. Исследование выполнено в рамках проекта НИР «Разработать и внедрить протокол диагностики и элиминации вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ) среди женщин Гомельской области», выполняемого Центральной научно-исследовательской лабораторией Гомельского государственного медицинского университета (ЦНИЛ ГомГМУ) совместно с лабораторией молекулярной генетики Республиканского центра радиационной медицины и экологии человека (обследование для женщин добровольное и бесплатное, n = 1023), а также в рамках рутинной работы лаборатории диагностики вирусных и особо опасных инфекций (ООИ) Гомельского областного центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья (ОблЦГЭиОЗ) (обследование добровольное или по направлению врача, платное, n = 500). В цервикальных мазках этих же женщин вместе с ДНК ВПЧ ВКР методом ПЦР также определялись ДНК *Chlamydia trachomatis* (n = 837, «АмплиСенс® Chlamydia trachomatis-FL»), ДНК *Ureaplasma spp*. (n = 1523, «АмплиСенс® Ureaplasma spp. EPh», «АмплиСенс® Ureaplasma spp.-FL»), ДНК Mycoplasma hominis (n = 1523, «АмплиСенс® Mycoplasma hominis-FL», «АмплиСенс® Mycoplasma hominis EPh»), ДНК HSV I–II типа (n = 1523, «АмплиСенс® HSV I–II EPh», «АмплиСенс® HSV I, II-FL»), ДНК CMV (n = 627, «АмплиСенс® CMV-FL»).

ДНК ВПЧ ВКР определялась с использованием тест-систем «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-EPh» (генотипы: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 70; n = 500) и «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL» (генотипы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59; n = 1023).

Также проанализированы результаты генотипирования ВПЧ ВКР у женщин, у которых не определялась ДНК других возбудителей урогенитальных инфекций («АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL», генотипы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59; n = 70).

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием 95% доверительного интервала (95% ДИ), отношения шансов (ОШ) и их 95% доверительного интервала, для определения характера распределения признаков применялся критерий Колмогорова — Смирнова, для сравнения групп использовался критерий χ^2, χ^2 с поправкой Йетса, различия между пропорциями определяли при помощи двустороннего t-теста.

Результаты исследований и их обсуждение. Среди обследованных женщин отмечается различная частота обнаружения ДНК инфекционных агентов на слизистой шейки матки и цервикального канала.

В когорте обследованных в лаборатории диагностики вирусных и ООИ ОблЦГЭиОЗ статистически значимо чаще обнаруживались ДНК ВПЧ ВКР (p = 0,0001), ДНК *Ureaplasma spp*. (p = 0,0003), ДНК *Mycoplasma hominis* (p = 0,04). ДНК *Chlamydia trachomatis* (p = 0,3), по сравнению с результатами в ЦНИЛ ГомГМУ. ДНК HSV I–II типа (p = 0,2), ДНК CMV (p = 0,6) обнаруживались одинаково часто как в когорте обследованных в лаборатории диагностики вирусных и ООИ ОблЦГЭиОЗ, так и в ЦНИЛ ГоГМУ (рисунок 1).

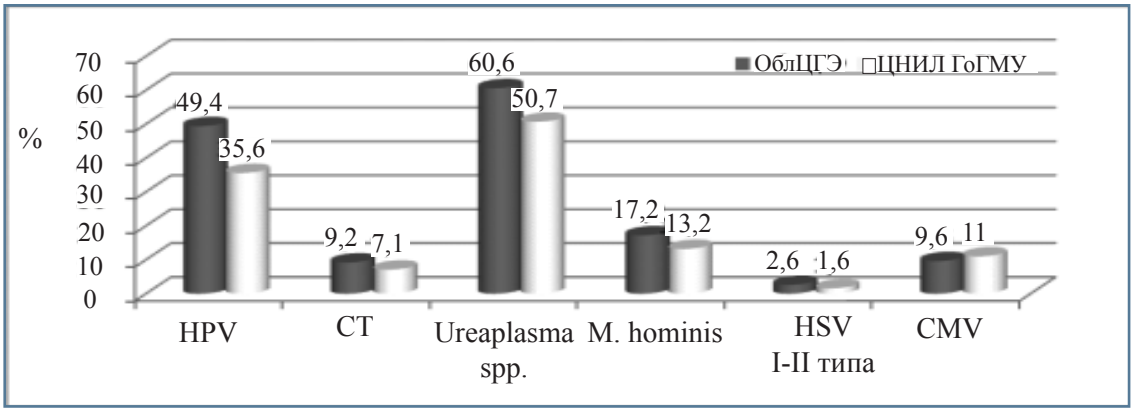


Рисунок 1 — Частота обнаружения ДНК инфекционных агентов в цервикальных мазках

Подобный результат можно объяснить различиями в контингенте обследованных. Так, в проекте принимали участие женщины, считающие себя здоровыми, без дисплазии и цервикального рака в анамнезе. Обследование же в лаборатории ОблЦГЭиОЗ проходили женщины по направлению вра-

чей и собственной инициативе. Определенный вклад вносят и различия в протоколах используемой модификации ПЦР (в классическом варианте или в режиме реального времени). Интерпретация результатов ПЦР с электрофоретической детекцией носит более субъективный характер, чем ПЦР в режиме реального времени [9]. В то же время результаты совместного анализа полученных данных, охватывающего более 1% населения области, отражают характеристику популяции.

Так, по суммарным данным, ДНК ВПЧ ВКР диагностирована у 40,1% (611/1523) (95% ДИ: 37,6–42,6%) женщин; ДНК *Chlamydia trachomatis* — 8,4% (70/837) (95% ДИ: 6,5–10,3%); ДНК *Ureaplasma spp*. — у 54,0%,(819/1517) (95% ДИ: 51,5–56,5%); ДНК *Mycoplasma hominis* — у 14,5% (220/1517) (95% ДИ: 12,7–16,3%); ДНК HSV I–II — 1,6% (29/1517) (95% ДИ: 1,2–2,6%); ДНК CMV — 9,9% (62/627) (95% ДИ 7,6–12,2%).

Наибольшая частота обнаружения ДНК *Ureaplasma spp., Chlamydia trachomatis*, HPV наблюдается в возрасте до 24 лет, ДНК HSV I–II — в возрастных группах 25–29 лет и 30–39 лет, т.е. в наиболее репродуктивно-активной части населения. Высокая инфицированность ИППП в молодом возрасте создает предпосылки для подрыва репродуктивного здоровья и невозможности реализации своей репродуктивной функции. Частота выявления ДНК *Mycoplasma hominis* и ДНК CMV остается на одинаковом уровне во всех возрастных группах до 50 лет. У женщин в возрасте старше 50 лет частота обнаружения ДНК возбудителей ИППП минимальна, и ДНК *Chlamydia trachomatis*, ДНК HSV I–II, ДНК CMV не были выявлены. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Частота выявления ДНК возбудителей урогенитальных инфекций в различных возрастных группах, %

Возраст / Возбудитель	До 24 лет (n = 438)	25–29 лет (n = 381)	30–39 лет (n = 453)	40–49 лет (n = 200)	Старше 50 лет (n = 51)
Ureaplasma spp	64,8	53,0	47,9	51,0	31,4
Mycoplasma hominis	15,3	15,7	13,2	14,0	9,8
Chlamydia trachomatis	14,6	7,5	4,3	3,8	0,0
HSV I–II	1,4	2,4	2,6	1,0	0,0
CMV	10,1	8,3	12,6	9,5	0,0
HPV	59,8	42,8	27,8	25,5	13,7

Для выявления особенностей носительства ВПЧ ВКР и других возбудителей ИППП была проанализирована частота совместного обнаружения ДНК возбудителей урогенитальных инфекций (таблица 2).

Таблица 2 — Частота выявления ДНК возбудителей генитальных инфекций у лиц с ВПЧ-положительным и ВПЧ-отрицательным статусом, %

ИППП	ВПЧ+ (n = 611)	ВПЧ– (n = 912)	Уровень p	Значение ОШ	95% ДИ ОШ
HSV I–II	3,3	1,0	0,0005	3,7	1,7–8,3
Ureaplasma spp	64,8	46,8	0,0001	2,1	1,7–2,6
Mycoplasma hominis	19,5	11,2	0,0001	1,9	1,4–2,6
Chlamydia trachomatis	10,9	6,2	0,01	1,8	1,1–3,0
CMV	9,3	10,6	0,6	0,9	0,5–1,5

Таким образом, инфицированность ВПЧ ВКР статистически значимо выше у лиц с урогенитальными инфекциями, даже отнесенными к группе условно-патогенных микроорганизмов (*Ureaplasma spp.* и *Mycoplasma hominis*). Вероятность выявления ДНК ВПЧ ВКР на слизистой шейки матки при обнаружении ДНК изучаемых генитальных инфекций возрастает в 2 раза, а при выявлении ДНК HSV I–II типа вероятность детектирования в цервикальных мазках ДНК ВПЧ ВКР — в 4 раза. Частота детектирования ДНК CMV в исследовании была независимой от ВПЧ-статуса.

По результатам генотипирования папилломавирусов (n = 386), в 39,4% случаях (95% ДИ: 34,5–44,3%) было обнаружено несколько генотипов вируса в одном образце одновременно (от 2 до 6), что статистически значимо реже, чем обнаружение моногенотипа вируса (p = 0,00001). Частота циркуляции различных генотипов ВПЧ ВКР представлена на рисунке 2.

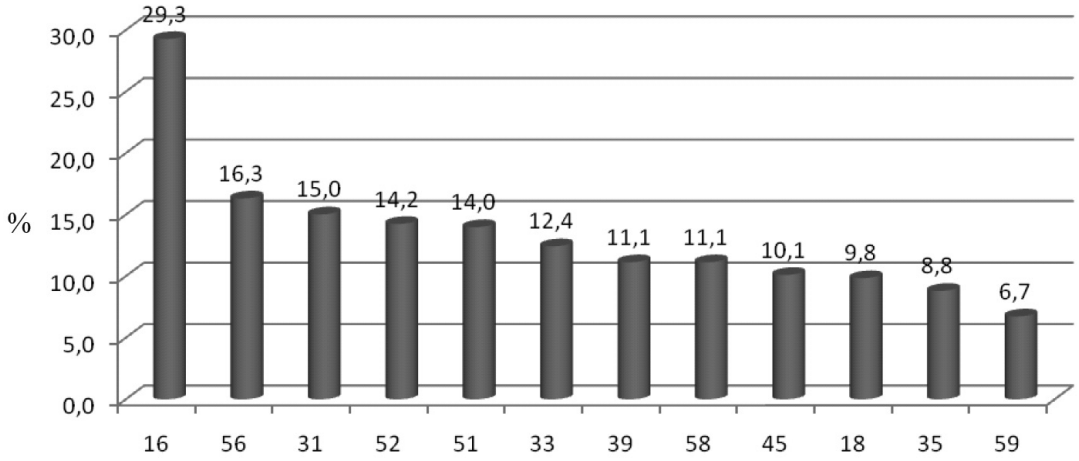


Рисунок 2 — Частота обнаружения отдельных генотипов ВПЧ ВКР в цервикальных мазках

В общей популяции женщин Гомельской области отмечается высокая частота циркуляции ВПЧ-16 — 29,3% (95% ДИ 24,8–33,8%) — по сравнению с другими генотипами (p = 0,0001). Второй доминирующий генотип — ВПЧ-56 — 16,3% (95% ДИ: 12,6–20,0%). Суммарная частота инфицирования ВПЧ-16 и ВПЧ-18, вакцинными генотипами, составила 39,1% (95% ДИ: 34,2–44,0%). В научном сообществе обсуждается возможность развития перекрестного иммунитета к филогенетически наиболее близким для вакцинных генотипов — ВПЧ-31 и ВПЧ-45 [10]. Суммарная частота встречаемости генотипов ВПЧ-16, 18, 31, 45 в группе обследованных составила 68,1% (95% ДИ: 63,5–73,8%). Широкое распространение вакцинных генотипов на территории области создает определенные предпосылки для эффективности вакцинации против папилломавирусной инфекции.

Была проанализирована частота ко-инфицирования у женщин моногенотипом ВПЧ ВКР и ассоциациями папилломавирусов (n = 364). Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Частота ко-инфицирования у женщин моногенотипом ВПЧ ВКР и ассоциациями папилломавирусов (n = 364)

ИППП	ВПЧ + моногенотип (n = 222)	ВПЧ + ассоциации (n = 142)	Уровень p	Значение ОШ	95% ДИ ОШ
HSV I-II	3,6	2,8	0,9	0,8	0,2–2,6
Ureaplasma spp.	60,4	71,8	0,03	1,7	1,1–2,6
Mycoplasma hominis	16,2	22,5	0,1	1,5	0,9–2,6
Chlamydia trachomatis	4,8	15,8	0,03	3,7	1,1–12,5
CMV	11,4	9,1	0,9	0,8	0,2–3,5

Таким образом, частота ко-инфицирования уреаплазменной и хламидийной инфекциями при обнаружении ассоциаций папилломавирусов ВКР статистически значимо выше, чем при обнаружении моногенотипа.

Выводы. Среди обследованных женщин отмечается различная частота обнаружения ДНК урогенитальных инфекций. Отмечается высокий уровень носительства ВПЧ ВКР (40,1%) среди женщин общей популяции, причем наибольшая частота обнаружения ДНК ВПЧ ВКР — в возрасте до 24 лет (59,8%).

Доминирующими генотипами в общей популяции женщин Гомельской области являются ВПЧ-16 (29,3%), ВПЧ-56 (16,3%) и ВПЧ-31 (15,0%).

Выявлено, что у ВПЧ-инфицированных статистически значимо чаще одновременно обнаруживается ДНК *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma spp, Mycoplasma hominis,* HSV I–II. Частота ко-инфицирования уреаплазменной и хламидийной инфекциями при обнаружении ассоциаций папилломавирусов ВКР статистически значимо выше, чем при обнаружении моногенотипа.

Вышеизложенное дает возможность рекомендовать обследование на ИППП ВПЧ-позитивных пациенток и обследования на ВПЧ женщин с диагностированными урогенитальными инфекциями и их лечение, с целью уменьшения риска инициирования и прогрессирования злокачественной трансформации эпителия шейки матки.

Литература

1. Prevalence of HPV infection among females in the United States / E.F. Dunne [et al.] // JAMA. — 2007. — Vol. 297. — P. 813–819.

2. Профилактика рака шейки матки: руководство для врачей / В.И. Кулаков [и др.]. — М.: МЕДпресс-информ, 2008. — 56 с.

3. HPV in the etiology of human cancer / N. Muñoz [et al.] // Vaccine. — 2006. — Vol. 24, suppl. 3. — S3/1-10.

4. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. — Lyons, France: Int. Agency Res. Cancer, 1995. — Vol. 64: Human papillomaviruses.

5. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 /J. Ferlay [et al.] // Int. J. Cancer. — 2010. — Vol. 127. — P. 2893–2917.

6. Злокачественные новообразования в Беларуси 2000–2009 / [С.М. Поляков и др.]; под ред. М.М. Сачек, А.И. Ларионовой. — Минск.: РНПЦ МТ. — 2010. — 205 с.

7. Шевченко, Е.А. Анализ этиологической структуры инфекций, передающихся половым путем, и иммунологической реактивности женщин с наличием папилломавирусной инфекции шейки матки / Е.А. Шевченко, О.А. Успенская // Вопр. вирусологии. — 2009. — № 4. — С. 37–39.

8. Verteramo, R. Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients / R. Verteramo [et al.] // BMC Infect. Dis. — 2009. — Vol. 12. — P. 9–16.

9. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. — Минск: Юнипол, 2007. — 176 с.

10. Classification of papillomaviruses / E.M. de Villiers [et al.] // Virology. — 2004. — Vol. 324. — P. 17–27.

Поступила 31.07.2011

CARRIAGE HUMAN PAPILLOMAVIRUSES OF HIGH CANCER RISK AND SOME OTHER UROGENITAL INFECTION IN GENERAL POPULATION OF WOMEN GOMEL REGION

Volchenko A.N.[1], Voropaev Eu.V.[1], Belyakovskij V.N.[1], Silin A.Eu.[2], Belskaya S.V.[3], Shevtsova A.N.[3], Tameeva I.N.[3], Golybych N.M.[1], Rubanik N.N.[1]

[1]Gomel Medical State University;
[2]Republican Research & Practical Center for Radiation Medicine & Human Ecology;
[3]Gomel Region Center of Hygiene, Epidemiology and Public Health, Gomel, Belarus

In the article we have presented results of DNA HPV HCR examination of women of general population in Gomel region (n = 1523) by PCR, also in cervical swabs we detected DNA of *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma spp, Mycoplasma hominis*, HSV I–II, CMV. In general population of women of Gomel region high level of HPV HCR carriers was marked (40,1%). And the highest frequency of HPV HCR detection was noted in women aged to 24 years old (59,8%). In general population of women of Gomel region the dominant HPV genotypes were HPV-16 (29,3%), HPV-56 (16,3%) and HPV-31 (15,0%). During analysis it was elucidated, that DNA of *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma spp, Mycoplasma hominis*, HSV I-II were detected in cervical swabs HPV-infected women statistically significant more often.

Keywords: human papillomaviruses of high cancer risk, urogenital infection, carriage.

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ОСТРЫМИ КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ НЕУСТАНОВЛЕННОЙ ЭТИОЛОГИИ НА ОТДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

Шайхиева Г.М., Ефимов Г.Е., Кайданек Т.В., Кучимова Н.А., Абдрашитова Р.Т.

Башкирский государственный медицинский университет, Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Башкортостан, Уфа, Россия

Резюме. В работе приводятся данные о состоянии заболеваемости острыми кишечными инфекциями неустановленной этиологии среди различных групп населения на отдельных территориях Республики Башкортостан.

Ключевые слова: кишечные инфекции неустановленной этиологии, заболеваемость, возрастное распределение.

Введение. По данным ВОЗ, острые кишечные инфекции (ОКИ) представляют серьезную медико-социальную проблему для мирового сообщества [1]. В России общая заболеваемость ОКИ среди всех инфекционных заболеваний детей традиционно остается на высоком уровне, устойчиво занимая второе–третье место [2]. Среди них, в зависимости от регионов, до 65–67% случаев ОКИ остаются нерасшифрованными [3].

Цель работы: выявление особенностей проявления заболеваемости острыми кишечными инфекциями неустановленной этиологии на отдельных территориях Республики Башкортостан (РБ) в условиях многолетних наблюдений.

Материалы и методы исследования. В наиболее крупных городах РБ — Уфа, Стерлитамак, Салават, Октябрьский, Нефтекамск — с совокупным населением около двух миллионов человек исследовали уровень, динамику и структуру заболеваемости острыми кишечными инфекциями неустановленной этиологии (ОКИНЭ). Информация о зарегистрированных случаях заболеваний ОКИНЭ среди населения отдельных территорий была получена из отчетной формы № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» за 1997–2010 гг. Данные о численности населения в анализируемых городах за исследуемые годы были взяты в Госкомстате РБ. Полученные результаты подвергались обработке приемами и способами эпидемиологической диагностики [4, 5].

Результаты исследования. В структуре всей суммы ОКИ в 1997–2010 гг. на долю ОКИНЭ приходилось две трети всех случаев заболеваемости в г. Октябрьский (73,3%), около одной трети в городах Уфе (32,7%), Салавате (28,9%) и немногим более половины от общего числа случаев ОКИ в городах Стерлитамаке (57,1%) и Нефтекамске (57,3%).

По среднемноголетним показателям, среди всего населения наибольшая заболеваемость ОКИНЭ оказалась в г. Стерлитамаке (280,6‰), а наименьшая — в г. Салавате (96,4‰). Вторую ранговую позицию в этом отношении занял г. Нефтекамск (179,3‰), третью — г. Октябрьский (142,3‰) и четвертую — г. Уфа (129,1‰) (рисунок 1).

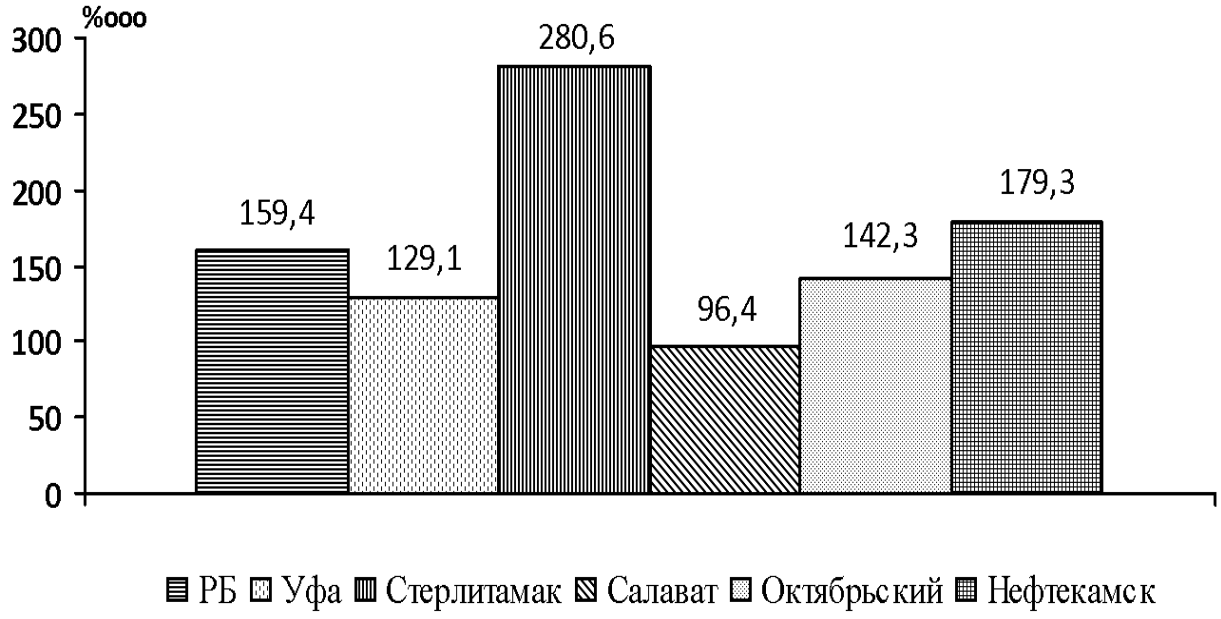


Рисунок 1 — Заболеваемость ОКИНЭ среди населения исследуемых территорий в 1997–2010 гг. (среднемноголетние показатели)

Исследуемые территории по динамике заболеваемости ОКИНЭ характеризовались различной направленностью линии тренда. Позитивной она оказалась в городах Стерлитамаке, Салавате и неблагоприятной с различной выраженностью — на остальных территориях. В г. Октябрьский восходящий тренд при стабильном его характере среди детского населения формировали лица старше 15 лет. Эта категория лиц определяла неблагоприятный тренд заболеваемости ОКИНЭ и в городах Нефтекамске, Уфе. Вместе с тем, в г. Уфе и особенно в г. Нефтекамске наиболее весомый вклад в этот процесс вносило детское население (рисунок 2).

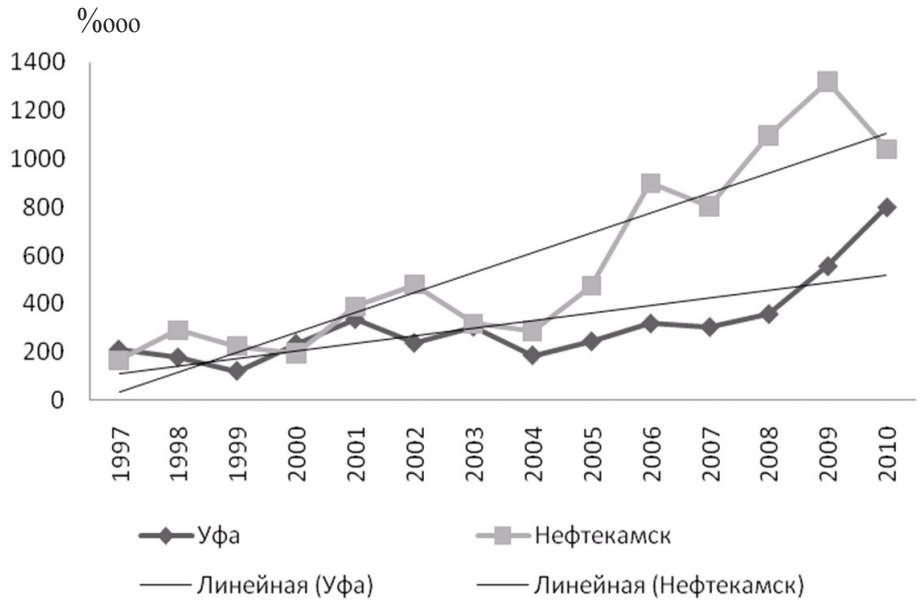


Рисунок 2 — Динамика заболеваемости ОКИНЭ среди детского населения городов Уфы и Нефтекамска за 1997–2010 гг.

Среди них по соотношению кривой заболеваемости и линии тренда в указанных городах выявлялись сходные циклические проявления с одинаковой продолжительностью в 11 лет (1997–2010 гг.), с фазой подъема и снижения соответственно в 1997–2001 гг. и 2002–2007 гг. Период 2008–2010 гг. характеризовал фазу подъема нового цикла. Заболеваемость детей во втором периоде в г. Уфе (263,24‰) в 1,2 раза превосходила ее интенсивность в первом (211,07‰) (рисунок 3). В г. Нефтекамске это различие по периодам формировалось при более высоких уровнях (272,1 и 525,2‰) и достигало 2-кратного значения. При этом во втором периоде наблюдения заболеваемость в г. Нефтекамск превосходила таковую в г. Уфе почти в 2 раза. В последние годы (2008–2010 гг.) кратность наблюдаемого превышения на данных территориях продолжала заметно нарастать при существенно более высоких показателях заболеваемости детей ОКИНЭ (1150,9 и 571,3‰).

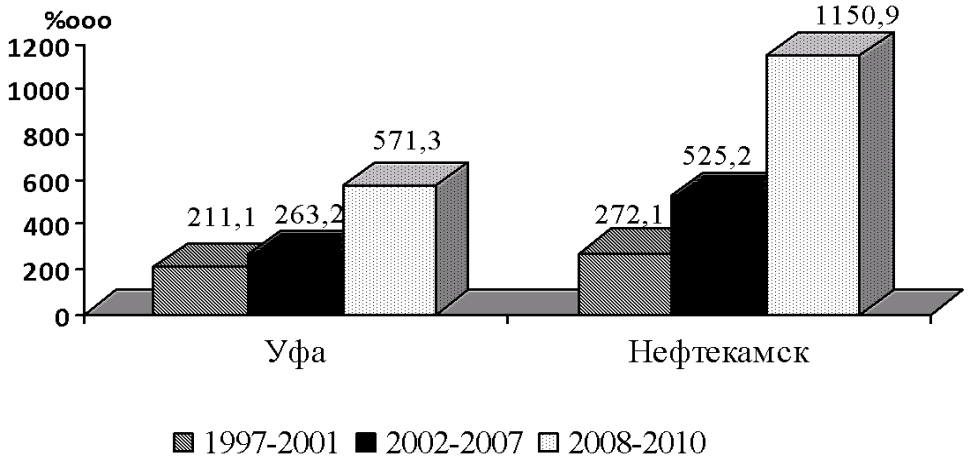


Рисунок 3 — Заболеваемость ОКИНЭ среди детского населения в городах Уфе и Нефтекамске в различные периоды наблюдения

В формирование столь высоких показателей заболеваемости ОКИНЭ на обеих территориях вовлекались дети различных возрастных групп, но особенно дети до двухлетнего возраста (рисунок 4).

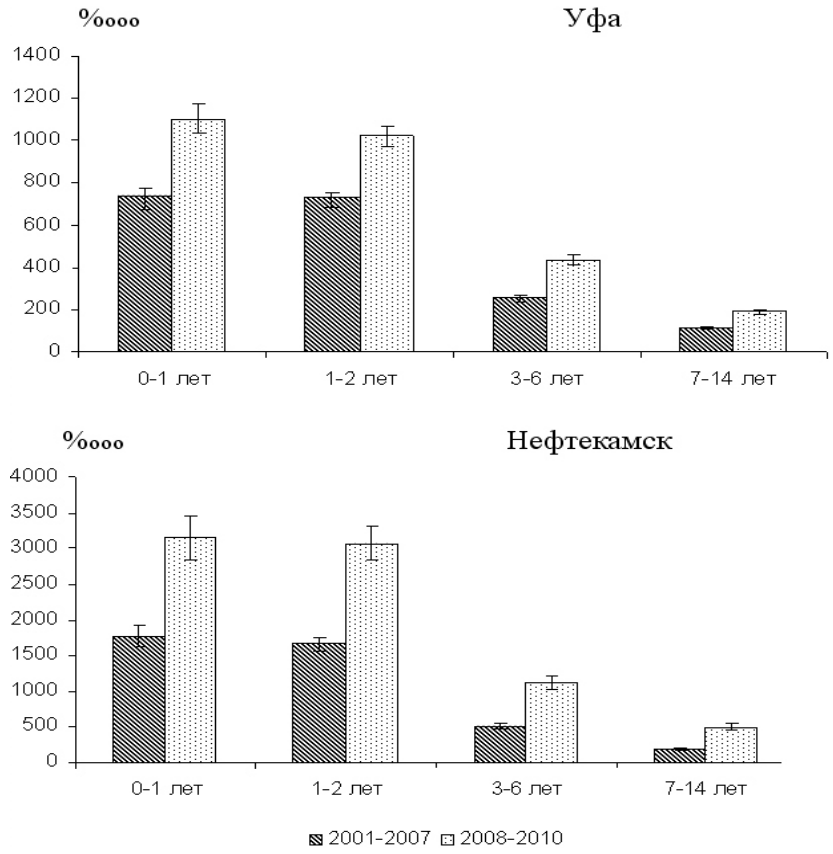


Рисунок 4 — Заболеваемость ОКИНЭ среди отдельных возрастных групп детского населения в городах Уфе и Нефтекамске в различные периоды наблюдения

При этом заболеваемость детей указанной группы в г. Уфе (1062,9‰) почти в 3 раза уступала ее интенсивности в г. Нефтекамске (3110,0‰). Это, очевидно, было обусловлено в целом недостаточностью этиологической расшифровки случаев заболеваемости ОКИ у детей на данной территории. Указанное подтверждается низким (более чем в 2 раза) показателем заболеваемости острыми кишечными инфекциями установленной этиологии (ОКИУЭ) у детей до двух лет в г. Нефтекамске(2054,9‰) по сравнению с таковым в г. Уфе (4995,7‰) (рисунок 5).

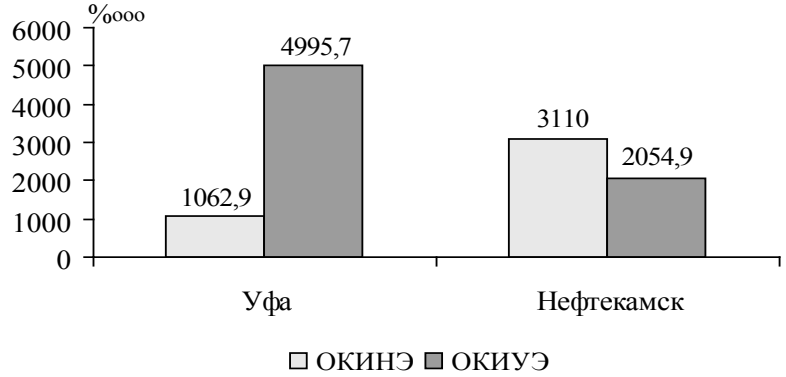


Рисунок 5 — Заболеваемость острыми кишечными инфекциями детей возрастной группы до 2-х лет в городах Уфе и Нефтекамске за 2008–2010 гг.

Такая закономерность наблюдалась и по остальным возрастным группам детского населения, но на многократно более низких уровнях, чем у детей до двухлетнего возраста. На их долю в структуре заболеваемости ОКИУЭ приходилось более половины (55,3%) от числа всех заболевших детей.

Заключение. Приведенные данные указывают, что среди исследуемых территорий по выраженности неблагоприятной тенденции и уровням заболеваемости ОКИНЭ наиболее напряженная

ситуация складывалась в г. Уфе и особенно в г. Нефтекамске. На всех исследуемых территориях, несмотря на разнонаправленный характер линии тренда в заболеваемости ОКИНЭ, группами высокого риска являлись дети до 2-х лет, особенно в городах Уфе и Нефтекамске, а также в г. Стерлитамаке, где заболеваемость данной группы детей многократно превосходила таковую в городах Салавате и Октябрьский. Указанное требует более широкого внедрения в практику лабораторной диагностики на региональном и муниципальном уровнях методов молекулярно-генетических исследований, что позволит улучшить не только этиологическую расшифровку и адекватное лечение больных, но и повысить эффективность профилактических, а также противоэпидемических мероприятий в борьбе с острыми кишечными инфекциями.

Литература

1. Учайкин, В.Ф. Инфекционные болезни / В.Ф. Учайкин, О.В. Шамшева; под ред. А.А. Баранова, Б.М. Блохина // Педиатрия. Национальное руководство. — М., 2009. — Т. 2. — С. 561–665.
2. Онищенко, Г.Г. Санитарно-эпидемиологическое благополучие среды и здоровья детского населения российской Федерации / Г.Г. Онищенко // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2008. — № 2. — С. 72–78.
3. Горелов, А.В. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых кишечных инфекций у детей / А.В. Горелов, Л.Н. Милютина. — М., 2005. — 106 с.
4. Шляхтенко, Л.И. Основы эпидемиологии. Эпидемиологическая диагностика неинфекционных болезней: учеб.-метод. пособие для врачей / Л.И. Шляхтенко. — СПб., 1994. — 162 с.
5. Зуева, Л.П. Эпидемиологическая диагностика / Л.П. Зуева, С.Р. Еремин, Б.И. Арсланов. — СПб.: Фолиант, 2009. — 312 с.

Поступила 01.11.2011

MORBIDITY FOR INTESTINAL INFECTIONS OF UNKNOWN ETIOLOGY ON CERTAIN TERRITORY OF BASHKORTOSTAN REPUBLIC

Shaikhieva G.M., Efimov G.E., Kaidanek T.V., Kuchimova N.A., Abdrashitova R.T.

Bashkir State Medical University, Federal Service on Customers' Rights Protection & Human Well-Being Surveillance in the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russia

The paper presents data on morbidity for acute intestinal infections of unknown etiology among different population groups in certain regions of the Republic of Bashkortostan.

Keywords: intestinal infections of unknown etiology, morbidity, age distribution.

ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ОСТРЫМИ КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ УСТАНОВЛЕННОЙ ЭТИОЛОГИИ НА ОТДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

Шайхиева Г.М., Ефимов Г.Е., Кайданек Т.В., Кучимова Н.А., Ганиева Р.И.

Башкирский государственный медицинский университет, Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Башкортостан, Уфа, Россия

Резюме. В работе приводятся данные о состоянии заболеваемости острыми кишечными инфекциями установленной этиологии среди различных групп населения на избранных для исследования территориях Республики Башкортостан.

Ключевые слова: кишечные инфекции установленной этиологии, уровень и динамика заболеваемости.

Введение. В условиях климатических, социальных, антропогенных и демографических сдвигов кишечные инфекции приобретают все большее значение [1]. Среди них острые кишечные инфекции (ОКИ) занимают одно из ведущих мест в инфекционной патологии особенно у детей. По данным ВОЗ, в мире ежегодно болеют острыми желудочно-кишечными инфекционными болезнями (диареями) более 1 млрд. человек, из которых 65–70% составляют дети в возрасте до 5 лет [2].

Цель работы: исследование особенностей проявления заболеваемости острыми кишечными инфекциями установленной этиологии на отдельных территориях Республики Башкортостан (РБ) в условиях многолетних наблюдений.

Материалы и методы исследования. В наиболее крупных городах РБ — Уфа, Стерлитамак, Салават, Октябрьский, Нефтекамск — с совокупным населением около двух миллионов человек исследовали уровень, динамику и структуру заболеваемости острыми кишечными инфекциями установленной этиологии (ОКИУЭ), обусловленными сальмонеллами, шигеллами и другими возбудителями ОКИ (эшерихии, клебсиеллы, ротавирусы).

Информация о случаях ОКИ за 1997–2009 гг. была получена из отчетной формы № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях». Полученные результаты подвергались обработке приемами и способами эпидемиологической диагностики [3, 4].

Результаты исследования. В структуре всех ОКИ наибольший удельный вес заболевших ОКИУЭ регистрировался в городах Салавате (71,1%) и Уфе (67,3%), а наименьший в г. Октябрьский (26,7%), тогда как города Стерлитамак и Нефтекамск со сходными значениями (42,9 и 42,8% соответсвенно) заняли промежуточное положение (рисунок 1).

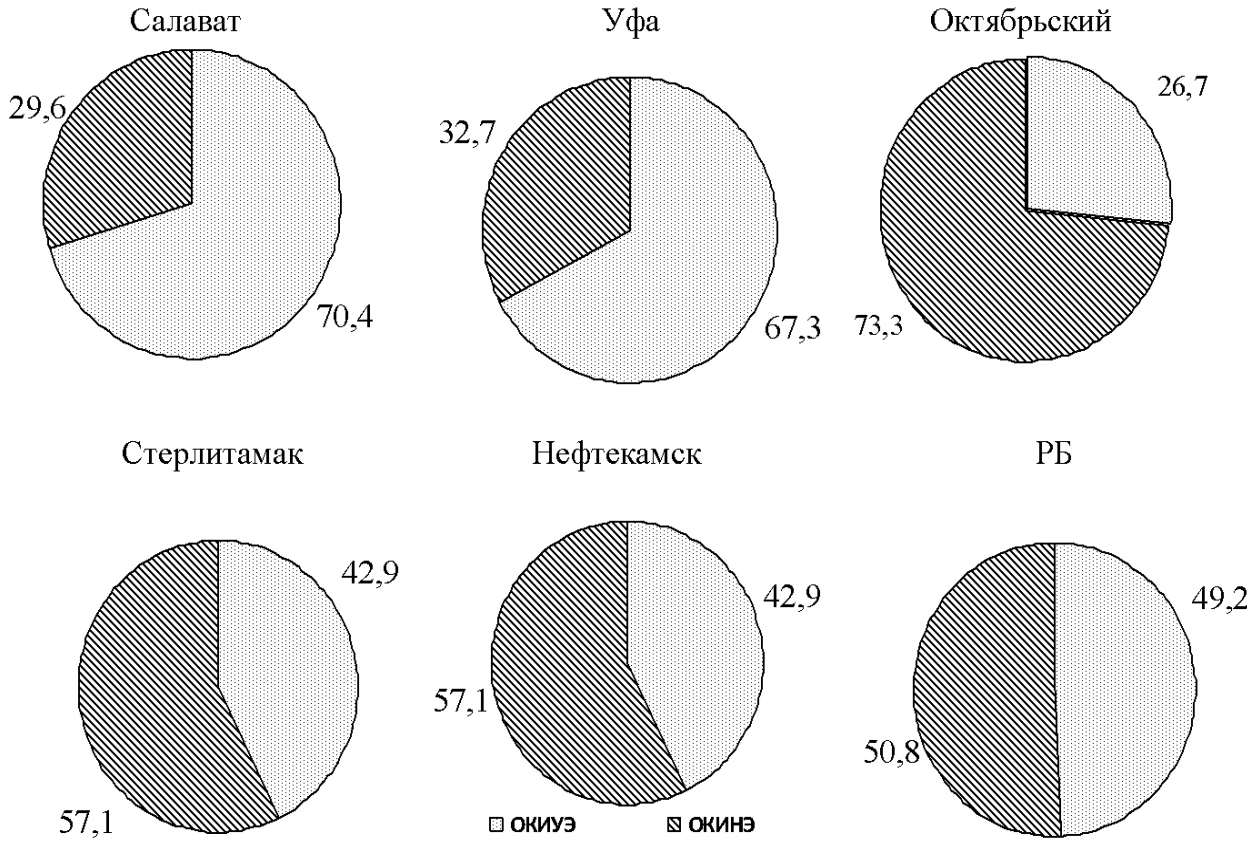


Рисунок 1 — Этиологическая структура заболеваемости острыми кишечными инфекциями среди населения исследуемых территорий в 1997–2009 гг.

Среди ОКИУЭ совокупная доля заболевших эшерихиозами, клебсиеллезами и ротавирусной инфекцией была минимальной в г. Октябрьский (11,1%), которая составляла лишь одну десятую часть от всех случаев ОКИУЭ. На остальных территориях на эти нозологии приходилось около 1/3 всех заболевших (от 28,9 до 37,1%). При шигеллезах наименьшие и близкие доли заболевших регистрировались в городах Стерлитамаке (6,6%), Октябрьский (6,7%) и Нефтекамске (4,1%). В то же время в городах Уфе и Салавате удельный вес больных исследуемой патологией (19,6 и 18,2% соответственно) превосходил таковые на предыдущих территориях в 2–4 раза. Такая же закономерность на территориях отмечалась и по сальмонеллезным инфекциям.

По среднемноголетним данным (1997–2009 гг.) наибольшая заболеваемость шигеллезами отмечалась в г. Уфе (76,6 ± 2,6‰), а наименьшая в городах Нефтекамске (12,7 ± 3,7‰) и Октябрь-

ский (12,7 ± 3,4‰) (рисунок 2). Вторую ранговую позицию в этом ряду территорий занял г. Стерлитамаке (60,3 ± 3,5‰), третью — г. Салавате (32,5 ± 6,2‰).

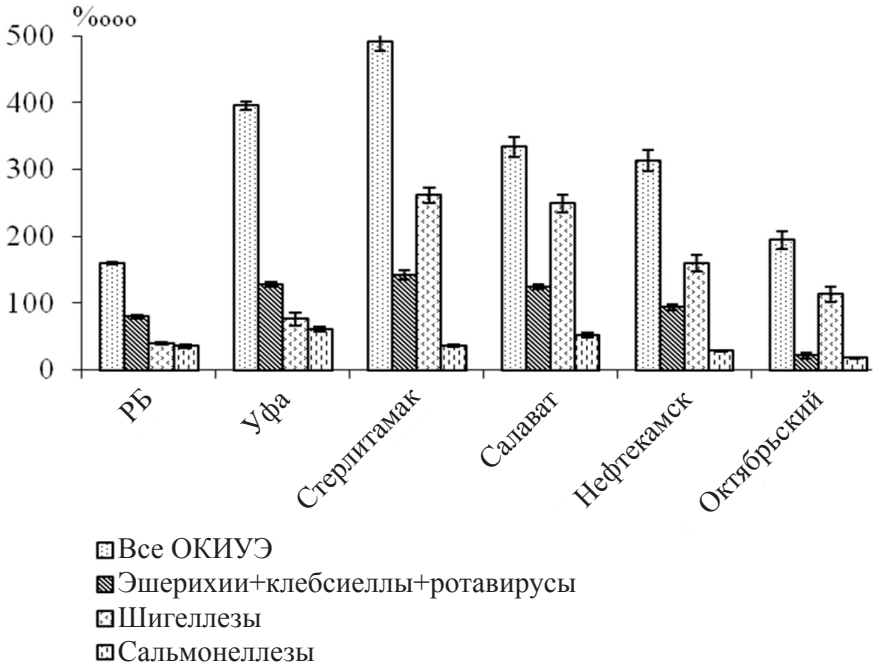


Рисунок 2 — Заболеваемость населения исследуемых территорий различными группами острых кишечных инфекций в 1997–2009 гг.

Сходная картина выявлялась на территориях и по сальмонеллезной инфекции с той лишь разницей, что ее интенсивность в г. Нефтекамске (28,2 ± 2,2‰) была выше таковой в г. Октябрьский (17,4 ± 2,6‰) более чем в 1,5 раза. При этом динамика заболеваемости исследуемыми нозоформами характеризовалась по территориям различной направленностью линии тренда. При шигеллезах она повсеместно имела позитивный характер, что обусловило снижение уровня заболеваемости этой инфекцией в последние годы сравнительно с началом наблюдения в 2 раза в г. Уфе и в 100 раз и более в г. Стерлитамаке. Позитивная направленность линии тренда при сальмонеллезах наблюдалась лишь в городах Стерлитамаке и Нефтекамске. В остальных городах она характеризовалась неблагоприятной тенденцией с наибольшей выраженностью в г. Уфе (рисунок 3).

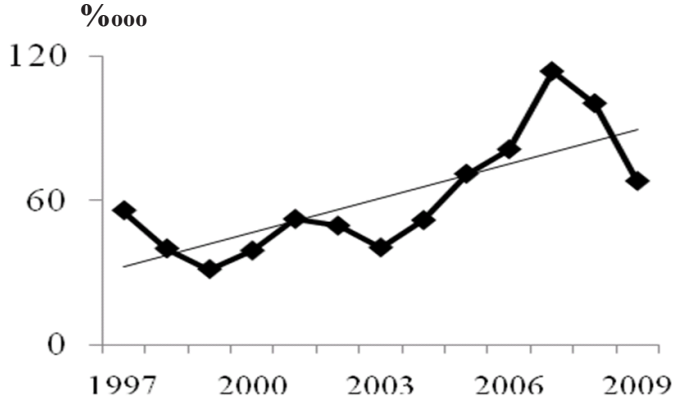


Рисунок 3 — Динамика заболеваемости сальмонеллезами на территории г. Уфы в 1997–2009 гг.

На этой территории ее формирование было обусловлено сальмонеллами серогруппы D, среди которой наиболее значимой оказалась *S. enteritidis*. На ее долю в 2000–2008 гг. приходилось почти 80% от всех случаев сальмонеллезной инфекции, зарегистрированных в г. Уфе (рисунок 4).

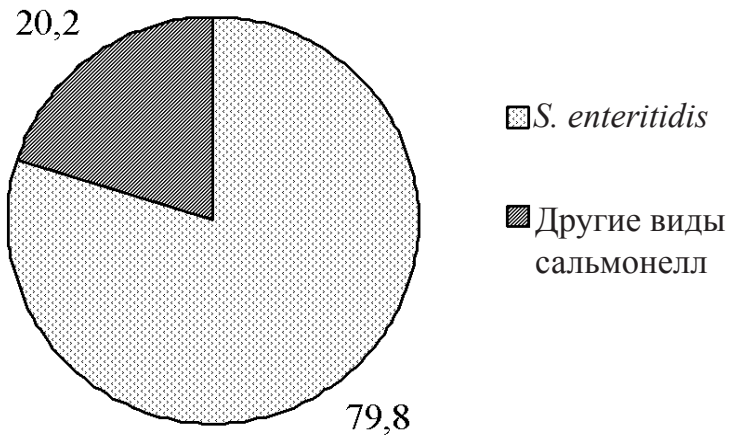


Рисунок 4 — Этиологическая структура заболеваемости сальмонеллезами на территории г. Уфы за 2000–2008 гг.

Полное соответствие с этим обнаруживал и интенсивный показатель, который примерно в 4 раза превосходил суммарную заболеваемость, обусловленную другими видами сальмонелл (56,6 ± 2,2 и 13,6 ± 1,1‰ соответственно).

В динамике заболеваемости, обусловленной *S. enteritidis*, выделялись два периода (рисунок 5). Первый, ограниченный 2000–2004 гг., обнаруживал в целом лишь стабильный характер тенденции. Второй период (2007–2008 гг.), напротив, имел выраженный подъем заболеваемости с максимумом в 2007 г. (105,5‰) и последующей стабилизацией ее в 2008 г. (102,3‰).

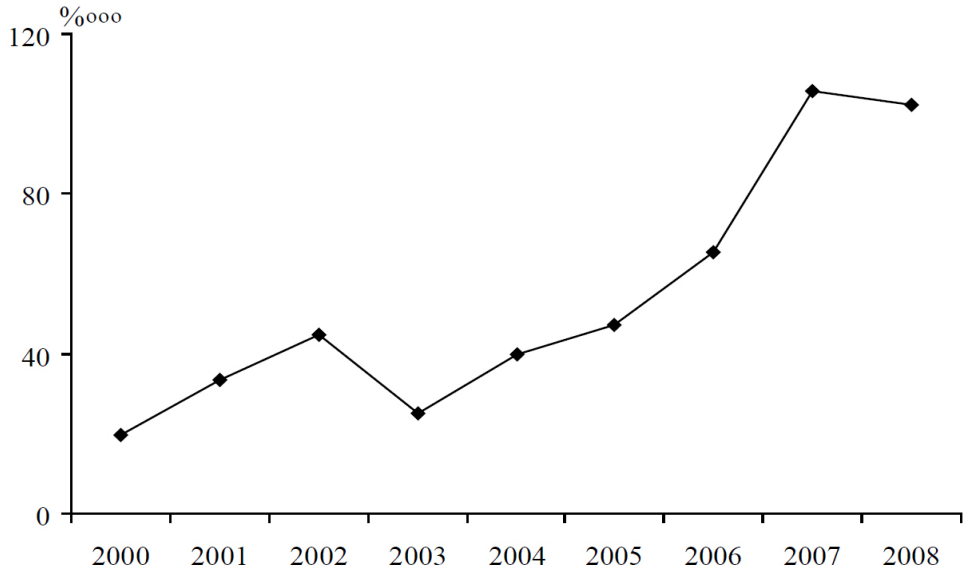


Рисунок 5 — Динамика заболеваемости сальмонеллезом *S. enteritidis* среди населения г. Уфы за 2000–2008 гг.

Эти годы (2007–2008), как и первый период (2000–2004), характеризовались превышением заболеваемости у детей сравнительно со взрослыми более чем в 9 и 4 раза соответственно. Столь высокий уровень заболеваемости, зарегистрированный среди детского населения г. Уфы, был обусловлен интенсивным вовлечением в эпидемический процесс детей возрастной группы до 2 лет (рисунок 6). На их долю приходилась почти половина (43,8%) от всех случаев заболеваний, вызванных *S. enteritidis*.

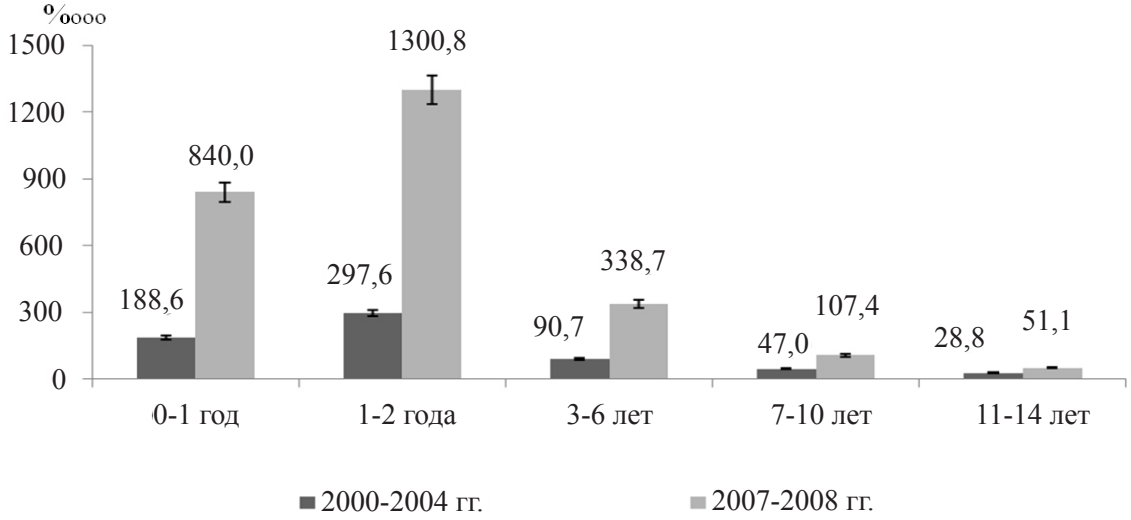


Рисунок 6 — Заболеваемость *S. enteritidis* детей и подростков в г. Уфе в отдельные периоды наблюдения (среднемноголетние показатели)

Заключение. Приведенные данные свидетельствуют, что среди исследуемых нозологических форм ОКИУЭ по выраженности восходящей тенденции, уровню заболеваемости наиболее неблагополучная ситуация на большинстве территорий складывалась по сальмонеллезной инфекции. Особенно неблагоприятной она была в г. Уфе, где заболеваемость обусловливалась в основном сальмонеллами D-серогруппы. Среди них наиболее значимыми оказались *S. enteritidis*, на долю которой приходилось 79,8% от всей заболеваемости сальмонеллезами, при интенсивном вовлечении в этот процесс детского населения и особенно детей в возрасте до 2 лет. На долю детей этой группы в последние годы приходилась почти половина (43,8%) всей заболеваемости, вызываемой *S. enteritidis*. Указанное требует проведения дальнейших исследований по выявлению причин и условий столь широкого распространения *S. enteritidis* с установлением источников и факторов их передачи на основе использования молекулярно-генетических методов исследования.

Литература

1. Онищенко, Г.Г. Санитарно-эпидемиологическое благополучие среды и здоровья детского населения российской Федерации / Г.Г. Онищенко // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2008. — № 2. — С. 72–78.

2. Учайкин, В.Ф. Инфекционные болезни / В.Ф. Учайкин, О.В. Шамшева; под ред. А.А. Баранова, Б.М. Блохина // Педиатрия. Национальное руководство. — М., 2009. — Т. 2. — С. 561–665.

3. Шляхтенко, Л.И. Основы эпидемиологии. Эпидемиологическая диагностика неинфекционных болезней: учеб.-метод. пособие для врачей / Л.И. Шляхтенко. — СПб., 1994. — 162 с.

4. Зуева, Л.П. Эпидемиологическая диагностика / Л.П. Зуева, С.Р. Еремин, Б.И. Арсланов. — СПб.: Фолиант, 2009. — 312 с.

Поступила 01.11.2011

MORBIDITY FOR INTESTINAL INFECTIONS OF SPECIFIED ETIOLOGY ON CERTAIN TERRITORY OF BASHKORTOSTAN REPUBLIC

Shaikhieva G.M., Efimov G.E., Kaidanek T.V., Kuchimova N.A., Ganieva R.I.

Bashkir State Medical University, Federal Service on Customers' Rights Protection & Human Well-Being Surveillance in the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russia

The paper presents data on morbidity for acute intestinal infections of specified etiology among different population groups in certain regions of the Republic of Bashkortostan.

Keywords: intestinal infections of specified etiology, level and dynamics.

АЛГОРИТМ АНАЛИЗА И ОЦЕНКИ ВЕРОЯТНОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ КОНТАМИНАЦИИ ПИЩИ

Коломиец Н.Д., Тонко О.В., Ханенко О.Н., Федоренко Е.В., Шмелёва Н.Д.

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Резюме. Вторичная контаминация готовых блюд может происходить при нарушении санитарно-гигиенического режима в производственных помещениях (наличие микроорганизмов на поверхностях помещения и оборудования), немотивированного поведения персонала, несоблюдения «холодовой» цепи. Предложенный алгоритм оценки вероятности опасностей позволяет идентифицировать и классифицировать по категориям микробиологические риски контаминации готовых блюд, что является важным звеном в осуществлении эпидемиологического надзора за безопасностью питания.

Ключевые слова: микробиологическая контаминация, оценка риска, безопасность питания.

Микробиологические риски и болезни пищевого происхождения, причиной которых они являются, представляют собой важную проблему в области здравоохранения, которая становится все более и более актуальной. В течение последних нескольких десятилетий во многих странах отмечается существенное увеличение распространенности болезней, вызываемых микроорганизмами, передаваемыми через пищу, например, представителями родов *Salmonella, Listeria* и *Campylobacter*. В «пищевой цепочке» возникли новые серьезные микробные факторы риска, такие как энтерогеморрагическая *Escherichia coli* и губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота [1].

Создание потенциала в области безопасности пищевых продуктов имеет приоритетное значение для мирового сообщества. Эпидемиологический надзор является основой совершенствования систем безопасности пищевых продуктов и позволяет конструктивно совершенствовать методологию анализа опасностей и систему управления микробиологическими рисками. В свою очередь система эффективного управления микробиологическими рисками укрепляется посредством использования превентивных подходов системы HACCP (англ. — Hazard Analysis and Critical Control Points), которая является одним из инструментов рабочего контроля в критических точках процесса в целях предотвращения рисков, связанных с пищевыми продуктами [2].

Целью настоящей работы явилась разработка научно обоснованных подходов оценки микробиологических опасностей, возникающих по всей технологической цепи при приготовлении пищи в детских учреждениях.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись образцы сырья и пищевых продуктов различных групп, а также смывы с поверхностей оборудования, инвентаря, посуды, вспомогательных средств на разных стадиях и этапах производства, раздачи и хранения готовой продукции. Отбор проб проводили в соответствии с утвержденными стандартными методами на конкретные виды пищевой продукции. Взятие смывов производили с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов, которые помещали в пробирки с 5 мл стерильного 0,1% водного раствора пептона. Непосредственно перед взятием смыва тампон увлажняли питательной средой. Для взятия смывов с крупных поверхностей использовали трафарет площадью 25 $см^2$, который накладывали 4 раза в разных местах поверхности контролируемого объекта. При взятии смывов с мелких объектов обтиралась вся поверхность предмета. При взятии смывов с мелких предметов одним тампоном протирали три одноименных объекта — три тарелки, стакана (внутренняя поверхность), рабочую часть столовых приборов. В работе использовали следующие питательные среды: жидкая среда Мак Конки, солевой бульон, мясо-пептонный агар, желточно-солевой агар, энтерококковый агар, среда Эндо и др.

Продовольственное сырье и пищевые продукты исследовали в соответствии с требованиями СТБ ISO 7218-2010 [3], инструкциями по применению, утвержденными Министерством здравоохранения Республики Беларусь [3–5]. Видовую идентификацию микроорганизмов осуществляли по общепринятым микробиологическим методикам мануально и с помощью автоматического бактериологического анализатора Vitec 2 Compact [6]. В качестве альтернативного метода исследования среды технологического окружения, продовольственного сырья и пищевых продуктов использовали подложки «RIDA®COUNT» в соответствии с инструкцией по применению [7].

Результаты. Продовольственное сырье, пищевые продукты и приготовленная пища являются богатой питательной средой и местом обитания многих микроорганизмов. Полученные данные показали широкий спектр выявляемости условно-патогенных микроорганизмов в составе эпифитной микрофлоры, при этом ни в одном случае не было обнаружено патогенных микроорганизмов (таблица 1).

Тем не менее, в мясе свинины, шашлыке из курицы до жарки, салате из сырых овощей с добавлением яиц, консервированных овощей с заправкой, картофельном пюре показатель КМАФАнМ, КОЕ/г, превышал допустимые уровни; а для салата из сырых овощей с заправкой, риса и отварных макарон находился на верхней границе допустимого уровня. Таким образом, из исследованных 24 образцов продовольственного сырья и готовых блюд 4 пробы (16,7%) оказались нестандартными.

Таблица 1 — Микробный пейзаж продовольственного сырья и готовых блюд

Наименование продукции	Микробный пейзаж
Мясо (свинина/говядина)	*Escherihia coli, Staphylococcus epidermidis, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis*
Фарш/сырая котлета	*Escherihia coli, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis, Enterococcus cloacae, Citrobacter freundii*
Тушки птиц/сырой шашлык	*Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae, Escherihia coli*
Рыба размороженная	*Escherihia coli*
Морковь/ морковь очищенная	*Enterobacter cloacae, Escherihia coli, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus*
Морковь после бланшировки	*Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus*
Огурец подготовленный (мытый под проточной водой)	*Staphylococcus epidermidis*
Салат из свежих огурцов, капусты, лука	*Staphylococcus epidermidis, Escherihia coli*
Салат из капусты, моркови	*Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, Escherihia coli*
Отварной рис	*Staphylococcus epidermidis*
Отварные макароны	*Staphylococcus saprophyticus*

В качестве объектов внешней среды (среды технологического окружения) были исследованы поверхности (стены, столы), кухонные принадлежности (разделочные доски, ножи, мясорубки, внутренние поверхности емкостей), столовая посуда (стаканы, вилки, ложки, тарелки), ручки кранов в помещениях подготовки и приготовления пищи, а также непосредственно в столовой. Основными выделенными видами микроорганизмов из внешней среды пищеблока являлись *E. faecalis, E. faecium, S. saprophyticus, C. freundii, E. cloacae, E. coli, S. epidermidis, S. aureus, S. saprophyticus.* Микробная нагрузка, выражающаяся в КОЕ/см^2, находилась в пределах от 1 до 100 клеток и была критичной (более 11 КОЕ/см^2) для кранов основных производственных помещений, стеллажей для овощей. Обнаружение вышеперечисленных групп условно-патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов на эпидемически значимых объектах внешней среды пищеблока и высокая микробная нагрузка свидетельствуют о нарушениях гигиенического режима и могут приводить к попаданию патогенных микроорганизмов в готовые блюда.

Для идентификации, определения вероятности, степени тяжести и категории риска микробной контаминации нами были применены принципы прогнозирующей микробиологии. Эти показатели используются для предположения степени риска заболевания после употребления готового блюда или степени риска контаминации продовольственного сырья. В основу положена оценка степени риска с позиций хорошей производственной практики и управляемости процессами с помощью надежных технологических приемов. Категорию риска (допустимый, недопустимый) определяют по степени риска и значимости последствий. Степень риска определяется возможностью или вероятностью возникновения вредного влияния на здоровье, значимость последствий — риском, возникновение которого очень вероятно и который окажет вредное воздействие на здоровье.

С этой точки зрения были рассмотрены риски первичной и вторичной микробиологической контаминации в сочетании с факторами окружающей среды и среды технологического окружения.

Для стандартизации подходов в идентификации микробиологической контаминации выделяют следующие группы готовых блюд: 1) однокомпонентное блюдо, требующее только нарезки/раскладки или розлива из промышленной упаковки, или находящееся в индивидуальной упаковке; 2) многокомпонентное/однокомпонентное блюдо после тепловой обработки подается в горячем/холодном виде; 3) многокомпонетное/однокомпонентное блюдо после первичной тепловой обработки

нарезается; 4) многокомпонетное/однокомпонентное блюдо готовится путем очистки, мойки нарезки или подается в целом виде.

В соответствии с разработанным алгоритмом идентификации микробиологической контаминации и контрольных вопросов определены и идентифицированы риски на всех этапах производства готовых блюд (таблица 2, рисунок). Проведенный анализ показал, что для некоторых видов сырья, которые можно отнести к группе продуктов с высоким уровнем риска микробиологической контаминации, категория риска может рассматриваться как допустимая при соблюдении технологии приготовления, санитарно-гигиенических условий на производстве. В то же время ряд продуктов, прошедших термическую обработку, имеет в процессе приготовления конечного блюда высокую вероятность вторичной контаминации и в этом случае риск уже относится к категории недопустимого. Особое внимание следует обратить на сырые овощи и фрукты, которые могут быть вымыты с нарушением технологии (немотивированное поведение работника) при этом контроль качества подготовки их перед подачей оценивается только визуально.

Таблица 2 — Квалификация опасного микробиологического риска

Продукт/блюдо	Категория		Характеристика микробиологического риска		
	УОФ	НУОФ	Вероятность реализации	Тяжесть последствий	Категория риска
Мясо	да	—	маловероятно	тяжелая	допустимый
Овощи для варки	да	—	маловероятно	средняя	допустимый
Овощи (сырые)	—	да	вероятно	тяжелая	недопустимый
Блюда из мяса, птицы, рыбы с гарниром после тепловой обработки	да	—	маловероятно	средняя	допустимый
Салаты из сырых или смеси сырых/вареных овощей, других компонентов с заправкой	—	да	вероятно	тяжелая	недопустимый

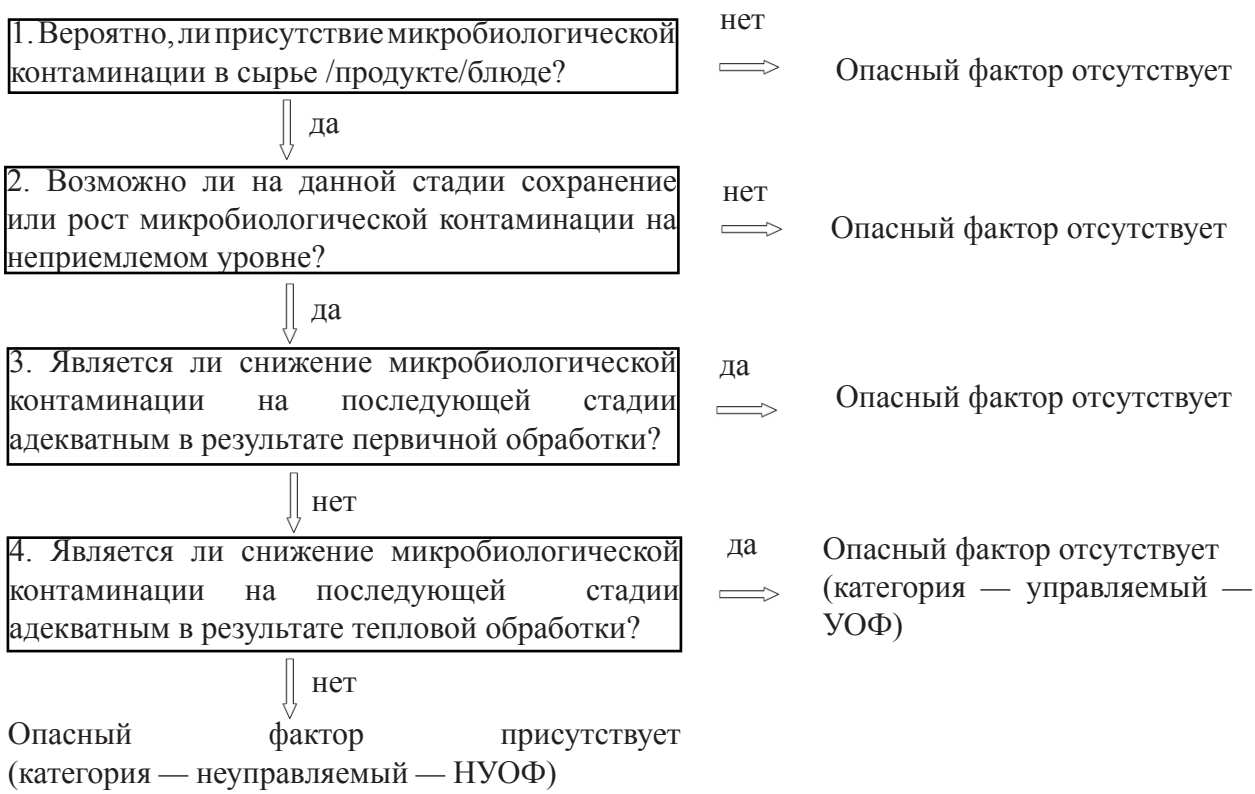


Рисунок — Алгоритм идентификации микробиологической контаминации

Заключение. Микробный пейзаж в некоторых категориях продовольственного сырья и необработанных продуктах был представлен следующими штаммами микроорганизмов: *E. faecalis, E. faecium, S. saprophyticus, C. freundii, E. cloacae, E. coli, S. epidermidis, S. aureus, K. oxytoca.* Основными видами микроорганизмов на технологическом окружении пищеблоков являются *E. faecalis, E. faecium, S. saprophyticus, C. freundii, E. cloacae, E. coli, S. epidermidis, S. aureus,* что свидетельствует об их недостаточной санитарно-гигиенической обработке. Установлено, что вторичная контаминация готовых блюд может происходить при нарушении санитарно-гигиенического режима в производственных помещениях (наличие микроорганизмов на поверхностях помещения и оборудовании), немотивированном поведении персонала, несоблюдении «холодовой» цепи. Учитывая тот факт, что в некоторых готовых блюдах показатель КМАФАнМ, КОЕ/г, превышал допустимый уровень, можно предположить, что причиной превышения данного показателя является вторичная контаминация готовых блюд через предметы технологического окружения.

В этой связи предложенный алгоритм оценки вероятности опасностей позволяет идентифицировать и классифицировать по категориям микробиологические риски контаминации готовых блюд, что является важным звеном в осуществлении эпидемиологического надзора за безопасностью питания.

Литература

1. Глобальная стратегия ВОЗ в области безопасности пищевых продуктов: программа безопасности пищевых продуктов. — Женева, 2002. — 34 с.

2. Системы качества. Управление качеством и безопасностью пищевых продуктов на основе анализа рисков и критических контрольных точек. Общие требования: СТБ 1470-2004. — Минск: Госстандарт, 2004. — 30 с.

3. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных / Общие требования к выполнению микробиологических исследований: СТБ ISO 7218-2010. — Минск: Госстандарт, 2010. — 56 с.

4. Хранение, приготовление и контроль качества питательных сред для санитарной микробиологии: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 19.03.2010 № 079-0210 / Н.Д. Коломиец [и др.]. — Минск, 2010. — 28 с.

5. Коломиец, Н.Д. Метод выявления санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов с использованием автоматического анализатора «ТЕМПО»: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 08.05.2009 № 163-1208 / Н.Д. Коломиец, Н.Н. Левшина. — Минск, 2009. — 14 с.

6. Коломиец, Н.Д. Иммунофлуоресцентный метод ускоренного выявления патогенных микроорганизмов в сырье и пищевых продуктах: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 19.03.2010 №073-0210 / Н.Д. Коломиец, Н.Н. Левшина, И.А. Байроченко. — Минск, 2010. — 15 с.

7. Оптимизированные методы количественного выявления санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов: инструкция по применению, утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 19.03.2010 № 074-0210 / Н.Д. Коломиец, О.В. Тонко, Н.Н. Левшина, О.В. Волохович. — Минск, 2010. — 12 с.

Поступила 05.07.2011

ALGORITHM ANALYSIS AND EVALUATION OF THE PROBABILITY OF FOOD MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION

Kolomiets N.D., Tonko O.V., Khanenko O.N., Fedorenko E.V., Shmeleva N.D.

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Secondary contamination of ready meals could be as a result violations of sanitary and hygienic treatment in industrial premises (the presence of microorganisms on the surfaces of the premises and equipment), unmotivated staff behavior, non-”cold” chain. The proposed algorithm estimates the probability of risks allows us to identify and categorize risks microbiological contamination of ready meals, which is an important step in the implementation of epidemiological surveillance of food safety.

Keywords: microbiological contamination, risk assessment, food safety.

РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИЯМИ В УЧРЕЖДЕНИИ РОДОВСПОМОЖЕНИЯ

Тонко О.В.[1], Коломиец Н.Д.[1], Гойлова А.В.[2], Илькевич Н.Г.[2], Левшина Н.Н.[3], Варивода Е.Б.[3], Шатон Н.А.[3]

[1]Белорусская медицинская академия последипломного образования;
[2]Городской клинический родильный дом № 2;
[3]Минский городской центр гигиены и эпидемиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Разработанная программа микробиологического мониторинга как основа эпидемиологического надзора в учреждениях родовспоможения позволила установить эпидемически значимые микроорганизмы, выделенные от новорожденных, циркулирующие в родильном доме (на объектах внешней среды, коже и слизистых медицинского персонала). Изучена их устойчивость к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам. Разработаны профилактические мероприятия с целью предупреждения возникновения гнойно-септических инфекций у новорожденных.

Ключевые слова: микробиологический мониторинг, родильный дом, новорожденные.

Введение. Начиная с последнего десятилетия прошлого века удельный вес стафилококков в этиологической структуре гнойно-септических инфекций (ГСИ) новорожденных начал увеличиваться [1]. На долю этой инфекции приходится более 50% всех случаев ГСИ новорожденных. Существенно изменилась и чувствительность к антибиотикам этих возбудителей, вызывающих внутрибольничные инфекции (ВБИ). Практически все штаммы являются устойчивыми к ингибиторозащищенным пенициллинам. В то же время групповые случаи и вспышки ВБИ в родовспомогательных учреждениях, как правило, обусловлены грамотрицательными бактериями (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*., *Proteus spp*.), доля которых в структуре ГСИ составляет не более 25% [2–4].

Факторами риска развития ВБИ в лечебных учреждениях, в том числе и в акушерских стационарах, являются инвазивные лечебно-диагностические вмешательства (инъекции, трансфузии, катетеризация сосудов и мочевыводящих путей, забор крови, пункции, искусственная вентиляция легких и т.д.). Развитие медицины, новых технологий лечения, развертывание сети лечебно-профилактических учреждений привели к формированию нового мощного, искусственно создаваемого (артифициального) механизма передачи, связанного с медицинскими лечебными и диагностическими процедурами. Поток медицинских манипуляций, выполняемых в стационаре, постоянно растет [5].

Источниками возбудителей ВБИ могут быть больные, медицинский персонал, лица, привлекаемые к уходу за пациентами, и посетители. В настоящее время, несмотря на прогресс в области инфекционного контроля, появление и внедрение в клиническую практику новых антимикробных препаратов, более быстрых и совершенных методов диагностики, повышение общего уровня ухода за больными, проблема профилактики и контроля внутрибольничных инфекций сохраняет свою актуальность [6].

Особенностью последних лет является увеличение роли медицинского персонала как источника ВБИ во многих типах стационаров и в том числе в родовспомогательных учреждениях. Вегетация стафилококка на слизистой оболочке передних отделов полости носа обычно не сопровождается клиническими проявлениями. Лишь у части постоянных носителей имеют место хронические воспалительные процессы в носоглотке. У носителей среди медицинского персонала, как правило, определяются нозокомиальные штаммы стафилококка, обладающие селективными преимуществами и вытесняющие те штаммы стафилококка, с которыми пациенты поступают в стационар. Уровень культуры медицинского персонала при этом имеет исключительное значение, особенно при инфекциях, возбудители которых распространяются с помощью контактно-бытовой передачи [5, 6].

Пациентами отделения реанимации новорожденных в большинстве случаев являются дети различной степени недоношенности, чаще глубоко незрелые, что обуславливает высокую восприимчивость к условно-патогенной флоре. Основными источниками инфекции являются больные и носители, причем наиболее эпидемически опасными являются пациенты с мани-

фестными формами и «длительные» носители. Наибольшую значимость имеют контактный и аппаратный путь передачи [5].

Цель работы: усовершенствование системы эпидемиологического надзора для своевременного принятия управленческих решений в связи с возможностью оценки рисков возникновения гнойно-септических инфекций в учреждениях родовспоможения.

Материалы и методы исследования. В родильном доме в качестве основного элемента производственного контроля нами организован микробиологический мониторинг. Взятие материала, выделение и идентификацию культур микроорганизмов осуществляли по общепринятым методикам, применяемым в микробиологических лабораториях с изучением комплекса признаков и использованием мануальных методов и автоматического микробиологического анализатора VITEK-2 Compact. Статистическая обработка цифрового материала с целью определения удельного веса и структуры первичных данных с достоверностью $P < 0,05$ проводилась с использованием программы EPI INFO.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе проведения исследования в течение 2009–2010 гг. были разработаны алгоритмы обследования пациентов групп риска, регламентирующие показания для микробиологического обследования, сроки и правила забора и транспортировки биологического материала. Проведен ежемесячный анализ результатов, полученных при проведении мониторинга микроорганизмов, колонизирующих беременных, рожениц, родильниц и новорожденных. Всего за анализируемый период было обследовано 1410 пациентов и выделено 1550 штаммов микроорганизмов.

В результате микробиологических обследований новорожденных, находящихся в отделении интенсивной терапии и реанимации из различных локусов (ухо, глаза, горло, нос, пуп) было выделено 235 штаммов микроорганизмов. Основными выделенными группами микроорганизмов являлись стафилококки (45,1%), энтеробактерии (23,4%), энтерококки (11,9%), стрептококки (8,9%), грибы (5,1%) и грамотрицательные неферментирующие бактерии (2,1%). Среди изолятов преобладали *Staphylococcus epidermidis* (34,5%), *Escherichia coli* (17,9%), *Enterococcus spp*. (10,2%), *Staphylococcus aureus* (7,2%), *Streptococcus agalactiae* (6,8%), *Staphylococcus saprophyticus* (3,8%) и *Klebsiella pneumoniae ss. pneumonia* (3,4%), Частота выделения других микроорганизмов была меньшей и составляла от 2,6 до 0,4%.

Нами оценена устойчивость/чувствительность 323 штаммов микроорганизмов, наиболее часто вызывающих гнойно-воспалительные процессы у детей. При анализе резистентности 128 изолятов стафилококков к антибактериальным препаратам, установлено, что 94,1% штаммов *S. aureus* устойчивы к пенициллину, оксациллину, цефазолину и эритромицину, 75% — к гентамицину, 56,2% — к клиндамицину, 5,9% — к левофлоксацину. Все 17 изученных штаммов *S. aureus* были чувствительны к ванкомицину.

Резистентность *S. epidermidis* к пенициллину составила 91,4%, к оксациллину — 77,7%, к эритромицину — 61,7%, к гентамицину — 58,1%, к цефазолину — 56,5%, к клиндамицину — 36,2%, к левофлоксацину — 9,6%. Все изученные 94 штамма *S. epidermidis* были чувствительны к ванкомицину.

Резистентность *S. saprophyticus* к пенициллину составила 76,9%, к оксациллину — 61,5%, к эритромицину — 53,8%, к гентамицину — 23,1%, к клиндамицину — 46,2%, к цефазолину — 38,5%, к левофлоксацину — 7,7%, к ванкомицину — 7,7%.

При анализе резистентности 47 изолятов энтерококков установлено, что 31,8% штаммов устойчивы к ампициллину, 2,1% — к ванкомицину.

Все штаммы *S. agalactiae* были чувствительны к наиболее часто назначаемым при стрептококковых инфекциях антибактериальным препаратам (пенициллинам и макролидам).

При анализе резистентности к антибактериальным препаратам 54 штаммов энтеробактерий установлено, что 42,2% штаммов *E. coli* устойчивы к ампициллину, 33,3% — к амоксициллину-клавуланату, 4,4% — к нитрофурантоину, 2,2% — к амикацину, цефтазидиму и офлоксацину. Все штаммы *E. coli* были чувствительны к цефтриаксону и имипенему.

Резистентность *K. pneumonia* к ампициллину составила 88,9%, к амоксициллину-клавуланату — 25%, к нитрофурантоину — 66,7%. Все изученные штаммы *K. pneumonia* были чувствительны к амикацину, имипенему, цефтазидиму, офлоксацину, цефтриаксону.

Нами проведен анализ результатов исследования эпидемически значимых медицинских инвазивных устройств, непосредственно длительно контактирующих со слизистыми и кожными покровами новорожденных.

Всего на исследование было отобрано у новорожденных ОИТР и поста интенсивной терапии 83 образца от 65 доношенных и недоношенных детей, в том числе интубационных трубок — 49, сосудистых катетеров — 22, проб крови на стерильность — 12 (таблица 1).

Таблица 1 — Удельный вес положительных находок микроорганизмов, выделенных из инвазивных медицинских устройств и крови новорожденных

Сроки проведения исследования, 2010 г.	Количество	Вид образца			
		Интубационные трубки	Сосудистые катетеры	кровь	итого
Январь	всего	3	0	1	4
	положит.	3	0	0	3
	%	100,0	0,0	0,0	75,0 ± 21,7
Февраль	всего	8	9	0	17
	положит.	5	2	0	7
	%	62,5 ± 17,1	22,2 ± 13,9	0,0	41,2 ± 11,9
Март	всего	21	8	3	32
	положит.	18	2	2	22
	%	85,7 ± 7,6	25,0 ± 15,3	66,7 ± 27,2	68,8 ± 8,2
Апрель	всего	17	5	8	30
	положит.	16	2	5	23
	%	94,1 ± 5,7	40,0 ± 21,9	62,5 ± 17,1	76,7
Всего	всего	49	22	12	83
	положит.	42	6	7	55
	%	85,7 ± 5,0	27,3 ± 9,5	58,3 ± 14,2	66,3 ± 5,2

Всего из инвазивных устройств и крови было выделено 53 штамма микроорганизмов. Структуру составили 22 штамма грамположительных микроорганизмов (41,5 ± 6,8%), 26 штаммов грамотрицательных микроорганизмов (49,1 ± 6,9%) и 5 изолятов грибов (9,4 ± 4,0%) (таблица 2).

Таблица 2 — Удельный вес микроорганизмов, выделенных из интубационных трубок, сосудистых катетеров и крови новорожденных

Микроорганизм	Интубационные трубки		Кровь		Сосудистые катетеры		Всего	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
E. faecalis	5	12	–	–	1	16,7	6	11,2
E. faecium	2	4,7	–	–	–	–	2	3,8
S. epidermidis	4	9,4	–	–	2	33,3	6	11,2
S. hominis	–	–	2	40	–	–	2	3,8
S. saprophyticus	1	2,4	–	–	–	–	1	1,9
S. aureus	1	2,4	–	–	2	33,3	3	3,8
S. viridans	1	2,4	–	–	–	–	1	1,9
S. agalactiae	1	2,4	–	–	–	–	1	1,9
E. cloacae	20	47,6	–	–	1	16,7	21	39,6
P. aeruginosa	5	12	–	–	–	–	5	9,4
C. parapsilosis	2	4,7	3	60	–	–	5	9,4
Всего выделено микроорганизмов	42	100	5	100	6	100	53	100

Микробиологическому исследованию подвергались и эпидемически значимые объекты внешней среды в ОИТР: поверхность реанимационного стола, ручки и кнопки кувезов, кнопки шприцевого дозатора, уплотнители кувеза и другие, а также слизистые зева и носа, руки медицинского персонала.

Всего было выполнено 46 отборов проб. В 32 (69,6 ± 6,8%) случаях из 46 отобранных образцов выделены штаммы микроорганизмов. Среди идентифицированных 32 изолятов преобладали стафилококки — 30 штаммов (93,8 ± 4,3%). Основными видами выделенных стафилококков являлись: *S. epidermidis* — 16 (53,3 ± 9,1%), *S. aureus* — 7 (23,3 ± 7,7%). Другие представители рода *Staphylococcus* были изолированы в единичных случаях.

Нами было проведено 42 исследования слизистых персонала отделения новорожденных на носительство штаммов стафилококков и других микроорганизмов (таблица 3).

Таблица 3 — Результаты микробиологических исследований персонала отделения новорожденных

Микроорганизм	Врачи		Медицинские сестры		Санитарки		Всего	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
S. epidermidis	5	62,5	11	40,7	2	28	18	42,7
S. aureus	—	—	7	26	—	—	7	16,7
S. agalactiae	1	12,5	—	—	—	—	1	2,4
Bacillus spp.	—	—	—	—	1	14	1	2,4
Neisseria spp.	—	—	—	—	1	14	1	2,4
E. coli	—	—	2	7,4	—	—	2	4,8
K. pneumoniae	—	—	1	3,7	—	—	1	2,4
E. cloacae	—	—	1	3,7	—	—	1	2,4
E. coli + K. pneumoniae	—	—	—	—	1	14	1	2,4
Посев роста не дал	2	25	5	18,5	2	28	9	21,4
Всего	8	100	27	100	7	100	42	100

Данные микробиологического мониторинга устойчивости госпитальных штаммов к антисептикам и дезинфектантам являются важным элементом эпидемиологического надзора.

Для этих исследований мы отобрали 26 штаммов *S. aureus* и 8 штаммов *E. cloacae,* выделенных из биологического материала новорожденных, объектов внешней среды, от медицинского персонала и медицинских инвазивных устройств и изучили их устойчивость к антибиотикам, дезинфектантам и антисептикам, применяемым в родильном доме. Среди изученных выборок стафилококков и энтеробактеров выявлена устойчивость к рабочим концентрациям хлоргексидина, полидеза, делансина.

Штаммы золотистого стафилококка, выделенные из объектов окружающей среды и от медицинского персонала, проявили 100% чувствительность к испытуемым антисептикам и дезинфектантам. Наиболее устойчивыми культурами к используемым в родильном доме антисептикам и дезинфектантам оказались *E. cloacae*, выделенные из интубацинных трубок новорожденных отделения интенсивной терапии и реанимации. Всего из 8 тестируемых культур *E. cloacae* — 100% были устойчивы к хлоргексидину, 50 ± 17,7% — к полидезу, 37,5 ± 17,1% — к делансину. Из 26 изученных штаммов *S. aureus* 53,8 ± 9,8% были устойчивы к хлоргексидину, 34,6 ± 9,3% — к полидезу, 7,7 ± 5,2% — к делансину.

Выводы. В результате исследования установлено, что:

- основными микроорганизмами, выделенными из различных локусов недоношенных новорожденных, находящихся в отделении интенсивной терапии и реанимации являются *Staphylococcus epidermidis* (34,5%), *Escherichia coli* (17,9%), *Enterococcus spp*. (10,2%), *Staphylococcus aureus* (7,2%), *Streptococcus agalactiae* (6,8%), *Staphylococcus saprophyticus* (3,8%) и *Klebsiella pneumoniae ss. pneumonia* (3,4%);

- эпидемически значимыми микроорганизмами, циркулирующими в родильном доме и находящимися на объектах внешней среды, а также коже и слизистых медицинского персонала отделения интенсивной терапии и реанимации и отделения новорожденных, являются: *Staphylococcus aureus* (38,6%), *Staphylococcus epidermidis* (34,3%), *Staphylococcus saprophyticus* (18,6%), полирезистентные к антистафилококковым препаратам;

- основными микроорганизмами, выделенными из сосудистых катетеров, находившихся у новорожденных поста интенсивной терапии отделения новорожденных являлись стафилококки (66,7 ± 19,2%), в то время как из интубационных трубок от новорожденных ОИТР в 47,6 ± 7,7% случаев выделялись штаммы *E. cloacae;*

- среди изученных выборок стафилококков и энтеробактеров выявлена устойчивость к рабочим концентрациям хлоргексидина, полидеза, делансина. Наиболее устойчивыми культурами к используемым в родильном доме антисептикам и дезинфектантам оказались *E. cloacae*, выделенные из интубацинных трубок новорожденных отделения интенсивной терапии и реанимации;

- разработанная программа микробиологического мониторинга как основа эпидемиологического надзора в учреждениях родовспоможения позволяет оценить эпидемическую ситуацию в каждый конкретный момент времени в соответствии с составленным прогнозом, базирующимся на многолетних данных типичных для данного стационара уровней циркуляции и характеристики условно-патогенных микроорганизмов.

Литература

1. Собещук, О.П. Коагулазоотрицательные стафилококки и их роль в возникновении внутрибольничных инфекций / О.П. Собещук, А.А. Адарченко // Мед. новости. — 1999. — № 3. — С. 8–12.

2. Госпитальные инфекции в неонаталогии и принципы организации профилактических мероприятий в «проблемных» отделениях / С.А. Касихина [и др.] // Педиатрия. — 2004. — № 3. — С. 66–69.

3. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci / T.L. Bannerman [et al.] // Manual Clin. Microbiol. — 2007. — Vol. 1. — P. 390–411.

4. Fitzpatrick, F. The genetics of staphylococcal biofilm formation – will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection / F. Fitzpatrick, H. Humphreys, J.P. O'Gara // Clin. Microbiol. Infect. — 2005. — Vol. 11. — P. 967–973.

5. Венцель, Р. Руководство по инфекционному контролю в стационаре / под ред. Р. Венцеля, Т. Бревера, Ж-П. Бутцлера; пер. с англ. — Смоленск: МАКМАХ, 2003. — 272 с.

6. To what extent can antibiotic use be reduced by preventing nosocomial infections? / Gastmeier P. [at al.] // Proc. 8th ECCMID Congr. — 1997. — abstr. P0465.

Поступила 06.07.2011

RESULTS OF MICROBIOLOGICAL MONITORING IN SURVEILLANCE SYSTEM FOR PURULENT-SEPTIC INFECTION IN MATERNITY HOSPITAL

Tonko O.V.[1], Kolomiets N.D.[1], Goylova A.V.[2], Ilkevich N.G.[2], Levshina N.N.[3], Varivoda E.B.[3], Shaton N.A.[3]

[1]Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education;
[2]Municipal Clinical Maternity Hospital;
[3]Minsk Centre of Hygiene and Epidemiology, Minsk, Belarus

The program developed as a basis for monitoring on microbiological surveillance in maternity hospitals allowed to reveal epidemically significant microorganisms isolated from different newborns loci, as well as circulating in a maternity hospital and environmental objects, and mucocutaneous probes from medical staff in order to study antibiotic, antiseptics and disinfectants resistance for the development of prophylaxis measures against emerging of septic infections in newborns.

Keywords: microbiological monitoring, maternity hospital, newborns.

ПЕРВАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *NEISSERIA MENINGITIDIS* В БЕЛАРУСИ

Глазкова С.[1], Тулин С.[2], Титов Л.[1], Домейка М.[3], Унемо М.[2]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь;
[2]Шведская референс-лаборатория по патогенным нейссериям, отдел лабораторной медицины и микробиологии при университетском госпитале, Оребро, Швеция;
[3]Отделение медицинских наук университета Уппсалы, Уппсала, Швеция

Резюме. Были исследованы 27 культур менингококков, выделенные от разных контингентов населения в разных регионах страны за 2006–2010 гг. Из 23 определенных сиквенс-типов 19 выявлены впервые, определены 12 различных геносубтипов и 13 типов белка FetA. При секвенировании фрагментов генома у 5 изолятов (23%) описаны мозаичные структуры гена *penA*, но не было показано наличие мута-

ций, обуславливающих резистентность к рифампицину и ципрофлоксацину. Были определены новые аллели гена *rpoB*. Изучение молекулярной эпидемиологии и уровней чувствительности/устойчивости менингококков к противомикробным препаратам является важным в системе мониторинга за инфекцией.

Ключевые слова: *Neisseria meningitidis*, геносубтипирование, МЛСТ.

Введение. Менингококковая инфекция (МИ) является острым, серьезным заболеванием, вызываемым бактерией *Neisseria meningitidis*. Часто *N. meningitidis* является нормальным обитателем носоглотки человека, но иногда вызывает тяжелый сепсис и менингит [1]. Менингококк является аэробным грамотрицательным диплококком, схожим с бактериями *Neisseria gonorrhoeae*, а также с рядом других непатогенных видов нейссерий, например *N. lactamica*.

Штаммы *N. meningitidis* могут классифицироваться по серогруппам на основании строения капсульных полисахаридов. Некоторые штаммы, наиболее часто выделяемые при бессимптомном назофаренгиальном носительстве, являются негруппирующимися, и часто не имеют капсулы. Практически все инвазивные формы инфекции вызваны менингококками основных 5 серогрупп: A, B, C, Y и W-135 [2]. Относительная важность каждой из серогрупп зависит от региона, возрастных характеристик населения, других факторов. Менингококки экспрессируют два белка-порина — PorA и PorB. Варианты белка PorA определяют серосубтип штаммов, а белок PorB определяет серотип [3].

Если антибиотики назначены на раннем этапе заболевания, лечение менингококковой инфекции обычно заканчивается успехом. Большинство штаммов *N. meningitidis* являются чувствительными к пенициллину, который наиболее широко и часто используют в лечении МИ, но в разных странах все чаще появляются сообщения о случаях выделения штаммов со сниженной чувствительностью к пенициллину [4]. Снижение чувствительности, или приобретение умеренной устойчивости к пенициллинам, у менингококков обусловлено главным образом наличием изменений в структуре пенциллин-связывающего белка (PBP 2), кодируемого геном *penA* [5]. Устойчивость к рифампицину у *N. meningitidis* связана с мутациями в гене *rpoB,* кодирующем β-субъединицу РНК-полимеразы [6]. Резистентность к противомикробным препаратам может привести к неэффективному лечению или химиопрофилактике, поэтому должна быть определена незамедлительно.

Мультилокусное секвенирование-типирование (МЛСТ) является наиболее эффективным средством молекулярной эпидемиологии, поскольку позволяет определить кластеры и изучить вспышки инфекции, а также проследить глобальное распространение клональных вариантов патогена [7]. Характеристика антигенного разнообразия менингококков является дополнительным методом классификации и увеличивает дискриминирующую способность исследования эпидемиологически связанных штаммов с помощью МЛСТ.

Менингококковая инфекция является одной из лидирующих нейроинфекций в Беларуси, вызывающая инвалидизацию и смертность населения. Показатель заболеваемости МИ в последние годы варьирует от 2,8 (в 2006 г.) до 1,4 на 100 000 населения (в 2010 г.). Несмотря на то, что случаи МИ подлежат обязательной регистрации, в республике не проводится мониторинг уровней чувствительности/устойчивости менингококков к препаратм выбора.

Цели исследования: а) описать популяцию штаммов *N. meningitidis*, циркулирующих на территории Беларуси с использованием современных международно утвержденных методов молекулярной эпидемилогии, например, геносубтипирования (секвенирование *porA* гена), типирования FetA и МЛСТ; б) провести секвенирование генов *penA*, *rpoB* и *gyrA* с целью обнаружения мутаций, обуславливающих наличие сниженной чувствительности или резистентности к пенициллинам, рифампицину и ципрофлоксацину соответственно.

Материалы и методы исследований. Для изучения молекулярной эпидемиологии менингококков были отобраны 27 изолятов, выделенных от больных МИ — 19 штаммов (70,4%) и 8 — от контактных лиц (29,6%) в различных регионах страны в период 2006–2010 гг. Все изоляты были идентифицированы как *N. meningitidis* с использованием культуральных методов, тест-системы «API-NH» (BioMerieux, Франция), биологического автоматического анализатора Vitek 2 (BioMerieux, Франция), ПЦР с использованием набора «50R *Neisseria spp*., *Haemophilus spp*., *Streptococcus spp*.-Eph» (Амплисенс, Россия) и РТ-ПЦР *ctrA*, согласно ранее описанной методике [7]. Выделение ДНК от штаммов менингококков проводили с использованием набора «ДНК-Сорб-Б» (Амплисенс, Россия).

Геносубтипирование. Вариабельные участки (VRs) 1, 2 и 3 гена *porA* были амплифицированы и секвенированы, как описано в [8]. По полученным аминокислотным последовательностям участ-

ков VR1 и VR2 в базе данных *Neisseria meningitidis* PorA variable regions database (http://neisseria.org/perl/agdbnet/agdbnet.pl?file = poravr.xml) были прописаны номера геносубтипов менингококков, а номера последовательностей участка VR3 сверялись согласно базе данных PorA VR3 database (http://www.smprl.scot.nhs.uk/PorA_VR3.htm).

МЛСТ. Последовательности семи хаускипинг-генов менингококков (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* and *pgm*) были определены согласно методике, описанной M.C.J. Maiden с соавт. [7]. Номера аллелей и сиквенс-типов (СТ) были получены из базы данных *Neisseria* MLST (http://pubmlst.org/neisseria/).

Типирование FetA. Вариабельный участок гена *fetA* gene амплифицировали и секвенировали, как описано в [9]. Последовательности аллелей сравнивали с таковыми базы данных Neisseria FetA variable region database (http://neisseria.org/perl/agdbnet/agdbnet.pl?file = fetavr.xml).

Секвенирование генов резистентности. Секвенирование генрезистентности *penA, rpoB* и *gyrA* было проведено согласно ранее описанной методике [10].

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 обсуждение.

Характеристика исследованных изолятов менингококков. Анализ исследованных для секвенирования фрагментов генома штаммов в зависимости от возраста больных (n = 19) показал, что в возрастной структуре доминировали дети (57,9%, n = 11): из них штаммы от детей в возрасте 0–2 года составили 31,6% (n = 6), в возрасте 3–6 лет — 15,8% (n = 3), и в возрасте 7–14 лет — 10,5% (n = 2). Количество штаммов от взрослых больных составило 42,1% (n = 8).

Шесть из восьми изолятов, выделенных от контактных лиц, были выделены от взрослых людей (75%), а два штамма — от детей в возрасте 2 и 13 лет (25% от общего числа изолятов, выделенных от контактных лиц).

При анализе серогрупповой структуры исследованных изолятов показано, что серогруппа А менингококков выделялась в 7,4% случаев: от одного больного ребенка и одного взрослого больного. Серогруппа В выделялась в 59,3%: от детей — 37% и от взрослого населения — 22,2% (от общего числа исследованных). Менингококки серогруппы С составили 29,6% от общего числа, причем от взрослого населения выделялись 25,9%, и один штамм был выделен от ребенка. Также в выборке присутствовал один нетипируемый изолят, выделенный от контактного лица.

Геносубтипирование. При проведении субтипирования у 20 штаммов менингококков были определены последовательности трех вариабельных участков генома (VR1, VR2 и VR3) — всего определено 12 геносубтипов. Наиболее часто у штаммов определялись геносубтипы P1.5-1,2-2,36-2 (4 штамма, 20%) и P1.17,16-4,36 (4 штамма, 20%). Дважды были обнаружены штаммы, обладавшие следующими геносубтипами: P1.5-1,2-59,36-2 и P1.22,14,36 (частота встречаемости — 10%). Один вариант фрагмента VR2 ранее не был описан (аллель 4-33) и внесен в базу данных *Neisseria meningitidis* PorA variable regions database (http://pubmlst.org/neisseria/PorA/).

Нуклеотидные последовательности гена *fetA* были определены у 19 менингококков, причем 2 последовательности не были описаны ранее. Всего наблюдалось 11 известных вариантов фрагмента VR (n = 17), распределенных по 4 семействам (1, 3, 4 и 5).

МЛСТ. Было проведено секвенирование семи хаускипинг-генов у 24 менингококков, выделенных от больных менингитом (n = 17) и контактных лиц (n = 7) из разных регионов страны в период 2006–2010 гг.

Ген *abcZ* кодирует трансмембранный белок-переносчик, состоящий из трансмембранного и нуклеотид-связывающего доменов, относится к эволюционно древнему суперсемейству АТФ-связывающих кассетных транспортеров. При проведении секвенирования *abcZ*-гена (433 п.о.) у штаммов менингококков было определено 14 аллелей, 13 из которых присутствовали в базе данных МЛСТ. Последовательность одной аллели была внесена в базу данных, и ей был присвоен номер 451. Наиболее часто определяемыми были аллели 9 (25%) и 7 (12,5%), аллели 11, 12 и 16 выделялись дважды, остальные аллели были представлены единожды.

Ген *adk* кодирует фермент аденилатциклазу, осуществляющую расщепление АТФ на пирофосфат и цАМФ, играющий роль вторичного посредника в сигнальных путях. При проведении секвенирования *adk*-гена (465 п.о.) у штаммов менингококков было определено 8 аллелей, все аллели были описаны ранее в базе данных МЛСТ. Для гена наиболее часто определяемыми были аллели 6 (25%) и 5 (20,8%).

Ген *aroE* кодирует фермент шикимат дегидрогеназу, состоящий из $НАД^+$ связывающего и каталитического доменов, необходимых для синтеза ароматических аминокислот фенилаланина, тирозина и триптофана. При проведении секвенирования *aroE*-гена (490 п.о.) у штаммов менингококков было определено 9 аллелей, 7 из которых присутствовали в базе данных МЛСТ. Последовательности двух аллелей ранее в базе данных описаны не были, и им были присвоены номера 602 и 603. Наиболее часто определяемыми были аллели 6 (33,3%) и 9 (25%).

Ген *fumC* кодирует фермент цикла Кребса фумарат гидратазу, состоящий из 4 одинаковых субъединиц и катализирующий превращение фумарата путем его гидратации. При проведении секвенирования *fumC*-гена (465 п.о.) у штаммов менингококков было определено 13 аллелей, 12 из которых присутствовали в базе данных МЛСТ. Последовательность 1 аллели была внесена в базу данных, и ей был присвоен номер 541. Для гена наиболее часто определяемой была аллель 9 (20,8%).

Ген *gdh* кодирует фермент глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу пентозофосфатного пути и катализирует реакцию окисления глюкозо-6-фосфата с восстановлением НАДФ. При проведении секвенирования *gdh*-гена (501 п.о.) у штаммов менингококков было определено 12 аллелей. Последовательность одной аллели ранее в базе данных описана не была, и ей был присвоен номер 560. Наиболее часто у гена определялась аллель 249 (33,3%).

Ген *pdhC* кодирует субъединицу пируватдегидрогеназного комплекса — звена цикла трикарбоновых кислот. При проведении секвенирования *pdhC*-гена (480 п.о.) у штаммов менингококков было определено 11 аллелей. Последовательность одной аллели ранее в базе данных описана не была, и ей был присвоен номер 425. Наиболее часто определяемыми аллелями были 6 (33,3%), 18 (16,7%) и 22 (16,7%).

Ген *pgm* кодирует фермент фосфоглюкомутазу, который относится к классу трансфераз и осуществляет внутримолекулярный перенос фосфата при преобразовании глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат. При проведении секвенирования *pgm*-гена (450 п.о.) у штаммов менингококков было определено 12 аллелей. Новых аллелей гена pgm обнаружено не было. Наиболее часто определяемыми аллелями были 9 (25%) и 2 (20,8%).

Максимальное число аллелей (14 аллелей) выявлено в локусе *abcZ*. В локусе *fumC* было определено 13 аллелей, в локусах *pgm* и *gdh* — по 12 аллелей, в локусе *pdhC* — 11 аллелей, у *aroE* — 9 аллелей и у *adk* — 8 аллелей (таблица).

Таблица — Результаты секвенирования 7 хаускипинг-генов менингококков

Штаммы	Номер аллели							CT	Клональный комплекс
	abc Z	adk	aroE	fumC	gdh	pdhC	pgm		
1	9	6	9	9	249	6	9	3346	ST-41/44 complex/Lineage 3
27	9	143	9	9	249	6	9	8850	ST-41/44 complex/Lineage 3
30	7	8	10	19	10	1	2	18	ST-18 complex
32	25	5	4	3	21	13	244	8540	—
82	2	3	4	69	8	4	6	8849	ST-11 complex/ET 37 complex
83	24	5	6	17	560	18	2	8576	ST-103 complex
84	8	5	6	17	560	18	54	8734	ST-103 complex
121	451	17	6	19	1	22	8	8541	—
272	11	17	6	39	1	22	8	8853	—
275	179	3	4	361	18	22	131	8851	
281	9	143	9	9	249	6	9	8850	ST-41/44 complex/Lineage 3
295	207	6	9	37	249	6	74	9012	
299	11	5	6	37	5	425	2	8852	
331	9	6	9	37	249	6	9	8542	ST-41/44 complex/Lineage 3
340	12	17	6	39	377	22	8	5190	—
351	7	8	6	19	10	18	2	6347	ST-18 complex
361	9	6	9	7	249	6	9	8543	ST-41/44 complex/Lineage 3
362	12	2	243	3	13	15	16	8544	—
363	7	8	4	9	10	18	2	8545	ST-18 complex
364	6	6	603	58	249	11	347	8735	—
366	16	2	6	25	17	25	22	53	ST-53 complex
367	6	5	7	541	9	24	17	8577	ST-174 complex
373	9	6	602	9	249	6	9	8736	ST-41/44 complex/Lineage 3
375	4	18	15	5	5	6	9	8546	—

На основании проведенного секвенирования 7 хаускипинг-генов менингококков и ряда полученных аллельных профилей этих штаммов было определено 23 сиквенс-типа (СТ), 19 из которых ранее описаны не были.

Среди всех полученных СТ тринадцать распределились среди следующих клональных комплексов: ST 11/ET 37 complex (CT 8849), ST 41/44 complex Linage 3 (CT 3346, CT 8542, CT 8543, CT 8736 и CT 8850), ST-18 complex (CT 18, CT 6347 и CT 8545), ST 53 (CT 53), ST 103 (CT 8576 и CT 8734) и ST 174 (CT 8577). Все штаммы каждого комплекса обладают схожими сиквенс-типами. Следует отметить, что 6 штаммов принадлежали к клональному комплексу ST 41/44 complex Linage 3 и 1 штамм принадлежал к клональному комплексу ST 11/ET 37 complex, которые считаются гиперэндемичными в странах Европы. Остальные определенные СТ не относились к известным клональным комплексам.

***Секвенирование генов penA, rpoB* и *gyrA*.** Из 22 изолятов *N. meningitidis* у 5 (23%) была определена мозаичная структура гена *penA,* обуславливающая сниженную чувствительность к пенициллинам. Всего было определено 22 аллели гена *penA* (77% аллелей дикого типа), среди которых наиболее часто выделялась аллель *penA1 (*36%).

При секвенировании генов *rpoB* и *gyrA* у изолятов (n = 20) не было обнаружено мутаций в генах, обуславливающих резистентность к рифампицину и ципрофлоксацину соответственно. У шести изолятов были описаны 4 новых аллели гена *rpoB* (аллели дикого типа): аллели *rpoB61* и *rpoB62* были определены дважды (10%), аллели *rpoB63* и *rpoB64* — единожды.

Менингококковый менингит в Беларуси наиболее часто возникает у детей, особенно в возрасте 0–2 года, и вызывает серьезные неврологические дефекты, осложенения, а также иногда и летальный исход. Серогруппа В является доминирующей в популяции патогена, циркулирующей в стране.

В работе описаны результаты молекулярной характеристики штаммов *N. meningitidis* в Беларуси, полученные с помощью использования современных международных методов молекулярного типирования, таких как геносубтипирование и МЛСТ. Описаны СТ, принадлежащие к известным клональным комплексам, которые представили 58% от всех определенных СТ. Наличие большого количества различных СТ в популяции менингококков республики свидетельствует о генетическом разнообразии патогена, причем в популяции циркулируют как широкораспространенные панъевропейские варианты (клональные комплексы ST 41/44 complex Linage 3 и ST 11/ET 37 complex), так и впервые описанные варианты (например, CT 8851 и CT 8853), не относящиеся к известным клональным комплексам, и, вероятно, имеющие анцестральное происхождение.

Также проведено секвенирование генов *penA*, *rpoB* и *gyrA* с целью детекции мутаций, обуславливающих резистентность к пенициллинам, рифампицину и ципрофлоксацину соответственно. Таких мутаций обнаружено не было, но были определены 5 штаммов менингококков, обладающих мозаичной структурой гена *penA*, ouславливающих сниженную чувствительность к пенициллину. Мониторинг чувствительности и/или устойчивости менингококков к препаратам выбора является необходимым для борьбы с инфекцией, поскольку позволит избежать неэффективного лечения заболевания или проведения санации бессимптомного носительства.

Полученные данные отражают необходимость проведения эпидемиологического мониторинга МИ наравне с мониторингом резистентности менингококков в Беларуси, а также должны быть учтены возможности внедрения вакцинации населения против менингококковой инфекции. Мониторинг миграции патогенных вариантов в стране, а также получение важных эпидемиологических данных является необходимым элементом в борьбе с инфекцией и требует использования международных методов молекулярного типирования.

Выводы:

1. В Беларуси создана система биологического и молекулярно-генетического мониторинга за популяцией *N. meningitidis*, циркулирующих среди населения.

2. Определены нуклеотидные последовательности гена *fetA*, распределенные по 4 семействам. Две последовательности (аллели F1-125 и F5-113) были впервые выявлены в данном исследовании. При проведении геносубтипирования у штаммов менингококков были определены последовательности трех вариабельных участков белка PorA — VR1, VR2 и VR3. Один вариант фрагмента VR2 ранее не был описан (аллель 4-33).

3. На основании проведенного секвенирования 7 хаускипинг-генов менингококков и ряда полученных аллельных профилей этих штаммов, было определено 23 сиквенс-типа, 19 из которых ранее описаны не были (82,6%). Также были определены некоторые ранее не описанные аллели хаускипинг-генов.

4. Определены доминирующие сиквенс-типы, циркулирующие на территории республики, и их распределение в клональные комплексы. Показано, что в популяции также циркулируют штаммы, принадлежащие к клональным комплексам ST 41/44 complex Linage 3 и ST 11/ET 37 complex, которые считаются гиперэндемичными в странах Европы.

Литература

1. Stephens, D.S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitides* / D.S. Stephens // Vaccine. — 2009. — Vol. 27, (suppl. 2). — B71–B77.

2. Peltola, H. Meningococcal disease: still with us / H. Peltola. — Rev. Infect. Dis. — 1983. — Vol. 5, N 1. — P. 71–91.

3. Frasch, C.E. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes / C.E. Frasch, W.D. Zollinger, J.T. Poolman. Rev. Infect. Dis. — 1985. — Vol. 7. — P. 504–510.

4. Polymorphism of *Neisseria meningitidis penA* gene associated with reduced susceptibility to penicillin / A. Antignac [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. — 2001. — Vol. 47. — P. 285–296.

5. Target gene sequencing to characterize the penicillin G susceptibility of *Neisseria meningitidis* / M.K. Taha [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. — 2007. — Vol. 51, N 8. — P. 2784–2792.

6. Molecular characterization of rifampin-resistant *Neisseria meningitidis* / P.E. Carter [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. — 1994. — Vol. 38. — P. 1256–1261.

7. Maiden, M.C.J. Meningococcal typing / M.C.J. Maiden, I.M. Feavers // J. Med. Microbiol. — 1994. — Vol. 40. — P. 157–158.

8. Direct and rapid identification and genogrouping of meningococci and *porA* amplification by LightCycler PCR / P. Mölling [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol. 40, N 12. — P. 4531–4535.

9. Thompson, E.A. Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component / E.A. Thompson, I.M. Feavers, M.C. Maiden // Microbiology. — 2003. — Vol. 149, (Pt 7). — P. 1849–1858.

10. Antibiotic susceptibility and characteristics of *Neisseria meningitidis* isolates from the African meningitis belt 2000–2006 — phenotypic and genotypic perspectives / S.T. Hedberg [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. — 2009. — Vol. 53. — P. 1561–1566.

Поступила 11.11.2011

FIRST MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *NEISSERIA MENINGITIDIS* IN BELARUS

Glazkova S.[1], Thulin S.[2], Titov L.[1], Domeika M.[3], Unemo M.[2]

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;
[2]Swedish Reference Laboratory for Pathogenic Neisseria, Örebro, Sweden;
[3]Uppsala University Hospital, Uppsala, Sweden

It is essential with prompt treatment of meningococcal infection, as well as use of chemoprophylaxis genetic diagnostics is increasingly replacing culture for diagnosis and, accordingly, genetic methods for antimicrobial susceptibility testing are essential. In the study 27 *N. meningitidis* strain*s*, isolated from patients and contacts, were examined. Total number of 23 different MLST STs, 19 of which were not previously reported, 12 different genosubtypes (one not previously described) and 13 divergent FetA types (two not previously reported) were identified. Finally, according to the sequencing, five isolates (23%) contained a decreased susceptibility to penicillins, however, no isolate displayed any resistance mutations causing a decreased susceptibility or resistance to rifampicin or ciprofloxacin. Nevertheless, seven not previously depicted *rpoB* wild type sequences were found. Enhanced information of the molecular epidemiology as well as presence of decreased susceptibility or resistance to antimicrobials used for treatment and chemoprophylaxis of meningococcal infection is crucial in Belarus.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, genosubtyping, MLST.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ МЕНИНГОКОККОВОГО НОСИТЕЛЬСТВА СРЕДИ ОРГАНИЗОВАННЫХ ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА В ПЕРВОМАЙСКОМ РАЙОНЕ Г. МИНСКА В 2011 ГОДУ

Белова Е.Ю., Бирулина М.Г., Зенова О.В.

Центр гигиены и эпидемиологии Первомайского района г. Минска, Беларусь

Резюме. За период январь–май 2011 г. проведена работа по изучению распространения менингококкового носительства среди организованных детей дошкольного возраста в Первомайском районе г. Минска в учреждениях разной специализации. На данном эпидемическом этапе носителей менингококка среди данного контингента выявлено не было. В учреждении закрытого типа (детский дом) в ходе расширенного обследования (дети старше 7 лет) выявлен бактерионоситель менингококка серогруппы С. Не установлено различий в распространении носительства менингококков среди здоровых детей и детей с хроническими заболеваниями верхних дыхательных путей, получающих регулярные профилактические процедуры в учреждениях санаторного типа.

Ключевые слова: бактерионосители, менингококковая инфекция, организованные дети.

Ведение. Одним из критериев эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией является слежение за циркуляцией возбудителя заболевания среди населения. Носительство менингококков распространено широко и подвержено колебаниям.

Попав во входные ворота — на слизистую ротоглотки человека — менингококк осуществляет колонизацию эпителия. Биологической сущностью колонизации является создание плацдарма для дальнейшей атаки, то есть закрепление на слизистой, размножение и создание биопленки. С помощью пилий менингококк прочно адгезируется к эпителию и размножается на нем. Колонизация продолжается в течение различного времени (от нескольких часов до нескольких недель), протекает бессимптомно и трактуется как здоровое носительство [1].

Число носителей в популяции, равно как и характеристики носимых штаммов, значительно варьируют (от 1 до 70%) в зависимости от эпидемической обстановки, изучаемого контингента и других факторов [2].

Цель. В рамках существующей системы эпиднадзора оценить эпидемиологический ареал распространения актуальных для г. Минска серотипов возбудителей менингококковой инфекции (В и С) среди детского организованного населения. По возможности определить влияние регулярных профилактических мероприятий на носительство патогенной флоры.

Материалы и методы. В 2010 г. была подготовлена и в 2011 г. реализована «Программа изучения распространения менингококкового носительства среди организованных детей Первомайского района г. Минска». Бактериологическое обследование на носительство менингококков проведено в 5 детских дошкольных учреждениях разной специализации: санаторного типа (для детей с патологией верхних дыхательных путей, получающих регулярные оздоровительные процедуры: ингаляции, магнитотерапия, тепловые процедуры для верхних дыхательных путей, массаж, фитонапитки) — 40% от числа обследованных в 2 учреждениях, общего образовательного типа — 36% — в 2 учреждениях, детского дома — 24% — в 1 учреждении (дети данного закрытого учреждения были привиты против менингококков групп А и С в 2009 г.). Обследование проводилось в два этапа — в январе–феврале и в апреле–мае 2011 г. Всего бактериологически обследовано на носительство менингококков 549 детей: 0–2 года — 48 (9%), 3–5 лет — 318 (58%), 6–7 лет — 126 (23%), старше 7 лет — 57 (10%).

Бактериологическое обследование проведено в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13.02.2006 № 81 «Об утверждении инструкции о методах микробиологической диагностики менингококковой инфекции и бактериальных менингитов».

Результаты. Среди бактериологически обследованных организованных детей дошкольного возраста (до 7 лет — 492 ребенка), посещающих детские учреждения Первомайского района, носителей менингококка не выявлено.

В ходе расширенного по возрасту обследования в учреждении закрытого типа (детский дом) среди детей старше 7 лет выявлен бактерионоситель менингококка серогруппы С.

Обсуждение. Бактерионосительство менингококка очень распространено, в него вовлечено не менее 10% населения. При наличии эпидемического подъема это количество возрастает многократно.

Причем, в некоторых случаях бактерионосительство продолжается на протяжении месяцев. Процессу генерализации инфекции способствует нарушение местного иммунитета. Одним из факторов риска является инфицирование респираторными вирусами, содержащими нейроминидазу, причем в большей степени эта особенность характерна для менингококка серогрупп B, C, W135 [3].

Первый этап обследования проводился в период сезонного подъема заболеваемости острыми респираторными и менингококковой инфекциями, гриппом. В обследуемых коллективах регистрировалась групповая заболеваемость острыми респираторными инфекциями (январь–февраль 2011 г.). Носителей менингококков выявлено не было.

Как видно из представленных данных, организованные дети до 7 лет на данном этапе не являются эпидемиологически значимой группой по формированию бактерионосительства менингококка.

Возможной причиной отсутствия носителей менингококков среди детей с патологией верхних дыхательных путей являются регулярные профилактические процедуры.

В ходе расширенного по возрасту обследования выявлен бактерионоситель менингококка группы С (ребенок 10 лет) среди организованных детей закрытого учреждения (детский дом). Носитель не явился источником инфекции для окружающих детей. Вероятная основная причина — профилактическая иммунизация вакциной «Менинго А+С» детей данного учреждения в 2009 г. (охват иммунизацией составил 100%).

Заключение

1. Среди бактериологически обследованных детей дошкольного возраста носителей менингококков выявлено не было.

2. Не установлено различий в распространении носительства менингококков среди потенциально здоровых детей и детей с хроническими заболеваниями верхних дыхательных путей, получающих регулярные профилактические процедуры в учреждениях санаторного типа.

3. Выявленный бактерионоситель (менингококк серогруппы С, ребенок 10 лет) не явился источником инфекции для окружающих, ранее привитых детей в закрытом детском учреждении (детский дом).

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам микробиологической лаборатории государственного учреждения «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии» Левшиной Н.Н., Строгановой Р.А., Лалаеву Ю.А. за проведение лабораторных исследований.

Литература

1. Костюкова, Н.Н. Современные представления о механизмах патогенного действия менингококка / Н.Н. Костюкова, В.А. Бехало // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2005. — № 3. — С. 40–43.

2. Платонов, А.Е. Вакцинопрофилактика менингококковой инфекции в мире и в России / А.Е. Платонов, С.М. Харит, О.В. Платонова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2009. — № 5. — С. 32–40.

3. Карпов, И.А. Менингококковая инфекция / И.А.Карпов // Здравоохранение. — 2010. — № 2. — С. 47–50.

Поступила 23.07.2011

RESULTS OF THE STUDY OF MENINGOCOCCAL CARRIAGE AMONG ORGANIZED PRESCHOOL CHILDREN IN PERVOMAISKY DISTRICT OF MINSK IN 2011

Belova E.Y, Birulina M.G., Zenova O.V.

Centre of Hygiene and Epidemiology of Pervomaisky District of Minsk, Belarus

For the period of January-May 2011 the study of the prevalence of meningococcal carriage among organized preschool children has been carried out in the institutions of different specializations in Pervomaisky district of Minsk. At this epidemic stage meningococcal carriers have not been identified among this contingent. In closed-type institutions (orphanage) in the course of an extended survey (children older than 7 years) a bacteria carrier of meningococcus of serogroup C has been identified. No difference in the spread of meningococcal carriage among healthy children and children with chronic upper respiratory airways, receiving regular preventive procedures in the institutions of sanatorium type, has been established.

Keywords: bacteria carriers, meningococcal infection, organized children.

ВЫЯВЛЕНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В БЕЛАРУСИ

Самойлова Т.И.[1], Залевская О.С.[1], Кулакова М.Н.[1], Яшкова С.Е.[2], Веденьков А.Л.[2]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;

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

Резюме. В статье представлены результаты изучения зараженности иксодовых клещей видов *Ixodes ricinus* и *Dermacentor pictus* вирусом клещевого энцефалита (КЭ) в период эпидсезона 2011 г. в Республике Беларусь.

Ключевые слова: клещи рода *Ixodes*, зараженность, вирус клещевого энцефалита, Беларусь.

Введение. Для оценки эпидситуации и изучения закономерностей циркуляции вируса клещевого энцефалита (КЭ) в природных очагах Республики Беларусь необходимы ежегодные исследования членистоногих-переносчиков на их зараженность — выявление антигенов вируса в иксодовых клещах. 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 [1–3].

В данной работе приведены результаты исследования иксодовых клещей, собранных на территории Беларуси в 2011 году, на выявление антигена вируса КЭ с применением ИФА [1].

Материал и методы. Материалом для исследования являлись иксодовые клещи, представленные в наших сборах двумя видами — *Ixodes ricinus* и *Dermacenter reticulates*. Переносчики были собраны на территориях всех областей республики в 2011 г. Для проведения исследований в ИФА было взято 1013 экз. (109 биопроб) клещей *I. ricinus* и 332 экз. (32 биопробы) клещей *D. reticulatus* из природных очагов республики.

Поступивший в лабораторию экологии и эпидемиологии арбовирусных инфекций РНПЦ эпидемиологии и микробиологии полевой материал перед постановкой ИФА подвергали первичной обработке. Иксодовых 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 суспензии исследовали методом ИФА на выявление в них антигена вируса КЭ [1]. При этом использовали диагностические иммуноферментные тест-системы Института вирусологии им. Д.И. Ивановского (Москва, Россия) согласно инструкции производителя.

Результаты и обсуждение. Исследование переносчиков методом ИФА позволило обнаружить антиген вируса КЭ в клещах *I. ricinus* в 16,5%, а в *D. reticulatus* — в 15,6% в целом по Республике Беларусь (таблица).

Таблица — Характеристика зараженности иксодовых клещей антигеном вируса клещевого энцефалита в Беларуси по ИФА

Области	Иксодовые клещи по видам					
	Ixodes ricinus			*Dermacentor reticulatus*		
	биопроб/экз.	кол-во полож.	% полож.	биопроб/экз.	кол-во полож.	% полож.
Витебская	20/173	2	10,0	0/0	0	0
Могилевская	11/118	1	9,1	9/92	1	11,1
Гродненская	20/189	5	25,0	0/0	0	0
Минская	20/183	3	15,0	0/0	0	0
Брестская	20/238	5	25,0	0/0	0	0
Гомельская	3/33	0	0,0	18/209	4	22,2
Минск	15/79	2	13,3	5/31	0	0
Всего по РБ	109/1013	18	16,5	32/332	5	15,6

Как видно из таблицы, наиболее высокие показатели выявления антигена вируса КЭ в клещах *I.ricinus* были обнаружены в Гродненской (25%) и Брестской (25%) областях республики. Выявление антигенов по Гродненской области было отмечено в Волковысском и Слонимском районах, а по Брестской — в Брестском, Пружанском и Каменецком районах.

По Минской области антиген вируса КЭ был выявлен в 15 % случаев. Зараженные вирусом КЭ клещи были обнаружены в Минском и Молодечненском районах. А по г. Минску антиген вируса КЭ выявили в клещах, собранных на территории Октябрьского (ул. Стебенева) и Первомайского (ДОЛ «Барок») районов.

Что касается *D. reticulatus*, то их зараженность вирусом КЭ составила по Гомельской области 22,2%, а по Могилевской — 11,1%.

Таким образом, подводя итоги проведенным исследованиям, можно заключить, что вирус КЭ широко циркулирует на территории Республики Беларусь, о чем свидетельствует выявление антигена вируса в клещах, собранных на территории всех областей республики, а также выделение изолятов из положительных в ИФА биопроб вируса КЭ.

Литература

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

2. Мельникова, О.В. Вирусологический мониторинг природных очагов клещевого энцефалита в Прибайкалье на основании индивидуального исследования иксодовых клещей: автореф. дис. …канд. биол. наук / О.В. Мельникова.— Томск, 1995. — 25 с.

3. Львов, Д.К. Стратегия и тактика профилактики клещевого энцефалита на современном этапе / Д.К. Львов, В.И. Злобин // Вопр. вирусол. — 2007. — № 5. — С. 26–30.

Поступила 10.11.2011

INVESTIGATION OF IXODE TICKS INFECTED WITH TICK-BORNE ENCEPHLITIS VIRUS IN BELARUS

Samoilova T.I.[1], Zalevskaya O.S.[1], Kulakova M.N.[1], Yashkova S.E.[2], Vedenkov A.L.[2],

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus

In the paper the results obtained on study of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor pictus* infected with tick-borne encephalitis virus in Belarus for the epidemic period of 2011 have been presented.

Keywords: ticks of the genus *Ixodes*, infection, tick-borne encephalitis virus, Belarus.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ БУНЬЯВИРУСА ТЯГИНЯ В ЭТИОЛОГИИ СЕЗОННЫХ НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ЛИХОРАДОК В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Самойлова Т.И.[1], Яшкова С.Е.[2], Веденьков А.Л.[2]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;
[2]Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь

Резюме. Проведенные исследования позволили показать этиологическую роль вируса Тягиня в возникновении сезонных недифференцированных лихорадок и выявить его циркуляцию в природных очагах Беларуси.

Ключевые слова: вирус Тягиня, сем. *Bunyaviridae,* циркуляция, Беларусь, этиология, сезонные недифференцированные лихорадки.

Введение. Наряду с вирусами клещевого энцефалита (КЭ) и Западного Нила (ЗН) эпидемиологическую значимость представляет также возбудитель из серогруппы Калифорнийского энцефалита (СКЭ) — вирус Тягиня, который широко циркулирует в природных очагах Республики Беларусь и на сопредельных с ней территориях, а также в других странах ближнего и дальнего зарубежья [1–17].

При этом вирусы из семейства *Bunyaviridae* являются возбудителями заболеваний, описанных исследователями из России, а так же других европейских стран [18–20]. Эпидситуация по лихорадочным заболеваниям неясной этиологии в Беларуси в последние годы становится все более напряженной. Ежегодно в нашей стране отмечается весенне-летний подъем заболеваемости сезонными недифференцированными лихорадками, среди которых могут быть заболевания арбовирусной этиологии [1–4]. Вместе с тем, возбудители сезонных недифференцированных лихорадок малоизучены и арбовирусные инфекции проходят под другими диагнозами (ОРВИ, острые бронхиты, пневмонии неясной этиологии, серозные менингиты и др.) [1–4].

В связи с вышеизложенным, целью данного исследований являлось изучение роли вируса Тягиня из семейства *Bunyaviridae* в этиологии сезонных недифференцированных лихорадок в период массовой активности кровососущих членистоногих.

Материал и методы. Материалом для исследований служили сыворотки крови от больных людей с различными недифференцированными лихорадками, взятыми в эпидсезон в период массовой активности кровососущих членистоногих, а также кровососущие комары, собранные на территории Беларуси в течение 2011 г.

На наличие антител к вирусу Тягиня из серогруппы Калифорнийского энцефалита взято и исследовано 189 сывороток крови от больных с диагнозами неясной этиологии (ОРВИ, ОРЗ, лихорадки неясной этиологии, острые вирусные менингиты неясной этиологии, пневмонии неясной этиологии, острые серозные менингоэнцефалиты и др.).

Для обнаружения антигена вируса Тягиня в кровососущих членистоногих собрано 13915 экз. (196 биопроб) кровососущих комаров 3-х родов — *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*. Собранных переносчиков после видового определения раскладывали по биопробам и хранили при –20ºС до момента их исследования. В одну биопробу брали от 50 до 200 экз. комаров одного и того же рода, с одной и тоже стации с учетом места и времени сбора [21].

Антиген вируса Тягиня в переносчиках выявляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих диагностических тест-систем Института вирусологии им. Д.И. Ивановского (Москва, Россия). Сыворотки крови также исследовали методом ИФА с помощью диагностических тест-систем Института вирусологии им. Д.И. Ивановского (Москва, Россия).

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований сывороток крови больных с различными недифференцированными диагнозами в 9,0% случаев обнаружены антитела к вирусу Тягиня (таблица).

Таблица — Данные выявления антител в сыворотках крови лихорадящих больных к вирусу Тягиня в 2011 г.

Области	Кол-во исслед. образцов сывороток крови	Предварительные диагнозы	Положительных к вирусу Тягиня	
			число	%
1	2	3	4	5
Витебская	30	Лихорадка неясной этиологии, ОРВИ, ОРЗ, Лайм-боррелиоз, менингоэнцефалит, мышечные боли и боли в суставах, вирусный менингит, полинейропатия	1	3,3
Могилевская	21	Лихорадка неясной этиологии, ОРВИ, ОРЗ, длительный субфибрилитет, аллергическая экзантема, менингоэнцефалит, грипп	1	4,8
Гродненская	26	Лихорадка неясной этиологии, длительный субфибриллитет, симптоматика Лайм-боррелиоза, ОРВИ, ОРЗ, мышечные и головные боли, мигрирующая эритема	3	11,5
Минская	25	Лихорадка неясной этиологии, ОРВИ, ОРЗ, острый гайморит и острый отит, острый бронхит, церебральный арахноидит, менингоэнцефалит	3	12,0
Брестская	29	Лихорадка неясной этиологии, ОРВИ, ОРЗ, лептоспироз, длительная лихорадка	4	13,8

Продолжение табл.

1	2	3	4	5
Гомельская	28	Лихорадка неясной этиологии, ОРЗ, ОРВИ, лептоспироз, пневмония, субфибрилитет неясной этиологии, менингоэнцефалит, острый бронхит, серозный менингит	3	10,7
г. Минск	30	Длительный субфибрилитет, лихорадка неясной этиологии, ОРВИ, артралгия, Лайм-боррелиоз	2	6,7
Всего	189		17	9,0

Как видно из таблицы, антитела к вирусу Тягиня выявлены в сыворотках крови 17 больных с различными диагнозами неустановленной этиологии: лихорадка неясной этиологии, ОРВИ, ОРЗ, длительный субфибрилитет, пневмония неясной этиологии, длительная лихорадка, Лайм-боррелиоз, аллергическая экзантема, лептоспироз и др.). Наиболее высокий процент выявления антител к вирусу Тягиня отмечен в сыворотках по Брестской области — 13,8 %. По Минской области антитела к вирусу Тягиня выявлялись у больных в 12% случаев, по Гродненской — в 11,5 %, а по остальным областям процент выявления антител составлял: по Витебской — 3,3; по Могилевской — 4,8; по Гомельской — 6,7; по г. Минску — 10,7.

Следует отметить, что вирус Тягиня из серогруппы Калифорнийского энцефалита наиболее широко распространен в природных очагах Беларуси и вероятность обнаружения антител к нему в сыворотках крови больных с неустановленными диагнозами в эпидсезон с максимальной численностью переносчиков наиболее высока. Об этом говорят данные, полученные при исследовании сывороток крови больных людей с различными недифференцированными диагнозами (лихорадки неясной этиологии, ОРВИ, ОРЗ, длительный субфибрилитет, аллергическая экзантема, лептоспироз, Лайм-боррелиоз и др.).

В результате ранее проведенных нами исследований в кровососущих комарах и мошках были обнаружены антигены и выделены изоляты вируса Тягиня. А в сыворотках крови птиц, крупного рогатого скота и людей выявлены антитела вируса Тягиня [3, 5].

В период массовой активности переносчиков вируса Тягиня — кровососущих комаров в 2011 г. из каждой области были собраны и исследованы на зараженность их вирусом Тягиня 13915 экз. (196 биопроб) кровососущих комаров 3-х родов: *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*. Проведенные исследования кровососущих комаров позволили обнаружить антиген вируса Тягиня в 12,8% случаев по республике. Наиболее высокий процент выявления антигена отмечен в Гомельской — 16,7%, (Мозырский и Буда-Кошелевский районы), Брестской — 14,8% (Ивацевичский и Малоритский районы) и Могилевской — 13,1% (Шкловский и Осиповичский районы) областях. В Гродненской области (Свислочский и Зельвенский районы) процент обнаружения антигена составил 12,5 в Минской (Смолевичский район) — 10,3, в Витебской (Шумилинский и Шарковщинский районы) — 7,1 и в г. Минске (Октябрьский и Первомайский районы) — 10,5.

Таким образом, на основании проведенных исследований показано, что при диагностике лихорадок неясной этиологии, имеющих выраженный сезонный характер, высокий процент составляют заболевания, вызываемые вирусом Тягиня. В циркуляции этого возбудителя на территории Беларуси основную роль играют кровососущие комары синантропных и полусинантропных родов: *Anopheles* и *Culex,* которые постоянно обитают рядом с человеком, нападают на него и могут вызывать заболевания арбовирусной этиологии.

Литература

1. Новые арбовирусные инфекции, выявленные в Беларуси: метод. рекомендации / Т.И. Самойлова [и др.] // Минск, 1998. — 23 с.

2. Самойлова, Т.И. Изучение циркуляции новых для Беларуси арбовирусов // Принципы и перспективы диагностики новых и вновь появляющихся инфекционных заболеваний: ст. и тез. докл. междунар. науч.-практ. конф., Смолевичи, 27-28 февр., 1997 г. — Минск, 1997. — С. 81–82.

3. Самойлова, Т.И. Арбовирусы в Республике Беларусь (полевые и экспериментальные исследования): автореф. дис. … д-ра биол. наук: 03.00.06; 14.00.30 / Т.И. Самойлова; НИИ эпидемиологии и микробиологии. — Минск, 2003. — 40 с.

4. Выделение и идентификация вируса Тягиня из серогруппы Калифорнийского энцефалита в Республике Беларусь / Т.И. Самойлова, В.И. Вотяков, А.С. Петкевич, Н.К. Климко, А.А. Михайлова, С.Е. Яшкова, А.Л. Веденьков // Достижения медицинской науки Беларуси: рец. науч.-практ. ежегодник. — Минск: ГУ РНМБ, 2006. — Вып. 11. — С. 92.

5. Выделение вируса Тягиня из комаров, отловленных в Душанбе / В.П. Булычев [и др.] // Мед. паразитол. и паразитар. болезни. — 1985. — № 4. — С. 81–83.

6. Выделение вируса Тягиня из комаров Anopheles hyrcanus и иммунологическая структура населения к вирусу Тягиня в Таджикистане / В.П. Булычев [и др.] // Экология вирусов: сб. науч. тр. — М., 1975. — С. 113–117.

7. Выделение вируса Тягиня из комаров в Арташанском районе Армянской ССР / В.А. Закарян [и др.] // Экология вирусов: сб. науч. тр. — М., 1980. — Вып. 3. — С. 100–102.

8. Изоляция Тягиня-подобного вируса (Bunyaviridae, Bunyavirus, комплекс Калифорнийского энцефалита) на севере о. Сахалин / Д.К. Львов [и др.] // Вопр. вирусол. — 1987. — Т. 32, № 5. — С. 588–590.

9. Изоляция буньявируса Тягиня в Заполярье / С.Д. Львов [и др.] // Вопр. вирусол. — 1985. — № 6. — С. 736–740.

10. Циркуляция вирусов комплексов Калифорнийского энцефалита и Буньямвера (Bunyaviridae, Bunyavirus) на северо-востоке Русской равнины / С.Д. Львов [и др.] // Вопр. вирусол. — 1991. — № 1. — С. 34–36.

11. Природные очаги вирусов серогруппы Калифорнийского энцефалита в различных ландшафтных зонах средней и западной Сибири / С.Д. Львов [и др.] // Итоги науки и техники. ВИНИТИ. Сер. Вирусол. — М., 1992. — Т. 27. — С. 30–38.

12 Bardos, V. Biological and antigenic variants among Tahyna virus, strains isolated in Czechoslovakia / V. Bardos, J. Pesko // Arch. Virol. — 1981. — Vol. 68, N 1. — P. 65–71.

13. Bishop, D.H.L. Casals J. Bunyaviridae / D.H.L. Bishop, C.H. Calisher, J. Casals // Intervirology. —1980. — Vol. 14. P. 125–143.

14. Izolation of Tahyna virus from bifting midges (Diptera, Ceratopogonidae) in Czecho-Slovakia / J. Halouzka [et al.] // Acta. Virol. — 1991. — Vol. 35, N 3. — P. 247–251.

15. Labuda, M. Experemental model of transmission of Tahyna virus in Aedes aegypti mosquites / M. Labuda, F. Ciampo, D. Cozuch // Acta. Virol. — 1983. — Vol. 27, N 3. — P. 245–250.

16. Biological profile of a virus belonging to California encephalitis complex isolated in Karelian Autonomous Soviet Socialist Republic / D.K. Lvov [et al.] // Acta. Virol. — 1989. — Vol. 33, N 4. — P. 355–360.

17. Mackenstein, H. Isolation of Tahyna-virus (Bunyaviridae) from mosquitoes collected in two different European natural foci / H. Mackenstein, J. Pilaski // Zbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. — 1984. — Vol. 257, N 1. — P. 152.

18. Клинико-лабораторная характеристика случаев заболеваний, связанных с вирусами комплекса Калифорнийского энцефалита, у жителей Москвы / Л.В. Колобухина [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. — 1989. — № 10. — С. 68–73.

19. Значение вирусов антигенного комплекса Калифорнийского энцефалита в патологии / Л.В. Колобухина [и др.]// Клинич. мед. — 1989. — Т. 67, № 9. — С. 61–64.

20. Демихов В.Г., Чайцев В.Г. Невролгическая характеристика заболеваний, вызываемых вирусами Инко и Тягиня// Вопр. вирусол. — 1995. — № 1. — С. 21–25.

21. Методические рекомендации по лабораторным и полевым исследованиям арбовирусов // Итоги науки и техники. ВИНИТИ. Сер. Вирусол. — М., 1991. — Т. 25.

Поступила 14.11.2011

STUDY OF THE ROLE OF TAHYNA BUNYAVIRUS IN ETIOLOGY OF SEASONAL UNDIFFERENTIATED FEVERS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Samoilova T.I.[1], Yashkova S.E.[2], Veden'kov A.L.[2],

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus

Investigations conducted allowed to reveal circulation of Tahyna viruse from *Bunyaviridae* family in Belarus and show its etiological role in emerging of seasonal undifferentiated fevers in patients in 2011.

Keywords: Tyhyna viruse, *Bunyaviridae* family, circulation, Belarus, etiology, seasonal undifferentiated fevers.

РОЛЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В КАЧЕСТВЕ РЕЗЕРВУАРА И ПЕРЕНОСЧИКА КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Мишаева Н.П.[1], Дракина С.А.[1], Стегний В.А.[1], Веденьков А.Л.[2], Яшкова С.Е.[2], Володкович О.И.[3], Семижон О.А.[3]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;
[2]Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья;
[3]Минский городской центр гигиены и эпидемиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Авторами впервые изучена инфицированность превалирующих в Беларуси иксодовых клещей (*Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus*) патогенными агентами бактериальной природы,

ранее не регистрировавшихся в республике. Установлено, что клещи являются резервуарами и переносчиками не только клещевого энцефалита и Лайм-боррелиоза, но и таких возбудителей, как анаплазма, бабезия, эрлихии, коксиелла, риккетсии и др.

Ключевые слова: иксодовые клещи, возбудители инфекций, клещевые микст-инфекции.

Введение. В свете последних данных литературы иксодовые клещи могут быть хранителями и переносчиками одновременно нескольких возбудителей вирусной, бактериальной и протозойной природы и вызывать у человека как моно-, так и смешанные инфекции, протекающие более тяжело по сравнению с моноинфекциями [1–2].

Развитие туризма, рост парка личных автомашин делают доступными для населения самые отдаленные уголки республики, а хозяйственная деятельность человека (освоение торфяников, осушение болот, освоение лесов и развитие дачно-садоводческих кооперативов) изменяет структуру природных очагов клещевых инфекций и увеличивает риск заболевания человека клещевыми инфекциями как при посещении эндемичных по природно-очаговым инфекциям территорий, так и при работе на дачных участках. При этом нельзя исключить заражения человека несколькими инфекциями. Поскольку микст-инфекции протекают более тяжело, изучение их приобретает особую актуальность [3–11].

Цель работы — изучить зараженность лесных и луговых видов клещей рода *Ixodidae* патогенными для человека возбудителями и оценить риск развития смешанных клещевых инфекций.

Материалы и методы. Материалом для исследований служили 620 особей наиболее массовых видов клещей (*Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus*), собранных в различных регионах республики. Учитывая, что в последние годы резко возросла численность клещей и их зараженность в окрестностях крупных городов, в зону исследований был включен г. Минск. Клещи проверялись на присутствие в них анаплазм, эрлихий, бабезиий, риккетсий, вируса клещевого энцефалита (КЭ) и других патогенов методом ПЦР.

Результаты и обсуждение. В таблице представлены данные Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья по заболеваемости населения Беларуси КЭ и Лайм-боррелиозом (ЛБ) — инфекциями, которые официально зарегистрированы в республике. Как видно, заболеваемость Лайм-боррелиозом в десять раз превышает таковую клещевым энцефалитом.

Таблица — Заболеваемость клещевым энцефалитом и Лайм-боррелиозом в республике за период 2006–2010 гг.

Годы	Клещевой энцефалит		Лайм-боррелиоз	
	Число случаев	Показатель на 100 тыс. населения	Число случаев	Показатель на 100 тыс. населения
2006	108	1,11	878	9,07
2007	82	0,85	647	6,71
2008	66	0,68	632	6,57
2009	88	0,91	850	8,81
2010	86	0,9	862	9,04

В связи с тем, что у лихорадящих больных, подвергшихся нападению клещей, в сыворотках крови часто не выявляются антитела ни к КЭ, ни к ЛБ, было высказано предположение, что эти больные переносят не зарегистрированную в республике инфекцию клещевого генеза. Для проверки этого предположения собранные клещи были исследованы на зараженность их бактериальными и протозойными инфекциями молекулярно-биологическими методами.

Самая высокая распространенность инфицированных клещей была обнаружена в Брестской (46,3%), а самая низкая — в Витебской области (10,5%). В других регионах паразитофорность переносчиков составила: Гомельская область — 37,4%, Минская область — 34,3%, Гродненская — 34,3%, Могилевская — 32,3% (рисунок 1). Разнообразие возбудителей было самым высоким в Гомельской области (обнаружены все возбудители) и самым низким в Минской области (обнаружены боррелии и вирус КЭ).

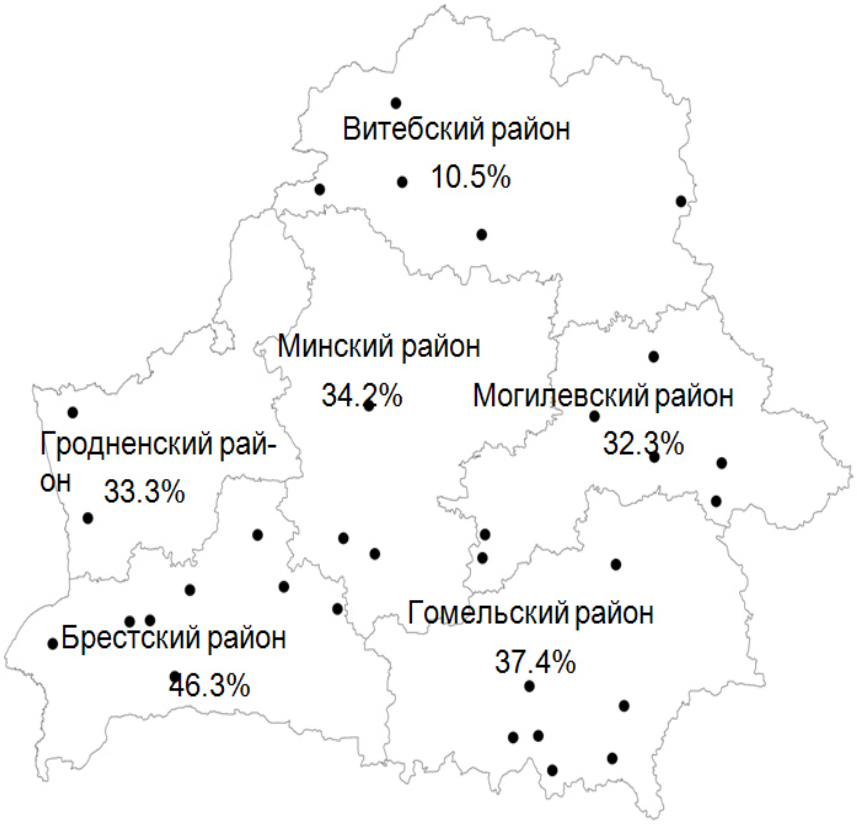


Рисунок 1 – Зараженность клещей *I. ricinus* возбудителями вирусных, бактериальных и протозойных инфекций в различных областях республики (точками указаны места сбора клещей)

Ниже представлены данные мониторинговых исследований по существованию паразитарной системы «иксодовые клещи — возбудители инфекций» в современных условиях изменения климата и активной хозяйственной деятельности человека в республике. Исследования проведены по общепринятой схеме: изучение зараженности клещей патогенными для человека возбудителями инфекций на территориях мегаполисов и в прилегающих к ним парковых рекреационных зонах, служащих местами массового отдыха трудящихся (базы отдыха, санатории и т.д.), а также в садово-дачных товариществах, где городские жители проводят практически весь весенне-летний сезон. Основное внимание исследователи обычно уделяют изучению загрязнения почв, состояния лесных насаждений, заселенности их мышевидными грызунами и их паразитами. Неизученными остаются механизмы воздействия антропогенного пресса на биологию кровососущих членистоногих и функционирование их как переносчиков болезней человека.

Наблюдения за численностью и распространением иксодовых клещей показали, что эти кровососы в республике встречаются не только в лесных массивах, но в пригородах больших городов и даже в самих городах. Так, за последние 10 лет в республике возросло в десятки раз число обращений в медицинские учреждения с жалобами на присасывание клещей. В г. Минске показатель присасывания клещей в 2010 г. составил 535,4 на 100 тыс. населения и только 297,2 — в целом по республике. Нападение клещей горожане отмечали при посещении парка Челюскинцев и Ботанического сада (по 14 человек), лесного массива по ул. Калиновского и Тикоцкого (20 человек), в Чижовке (25 человек), по ул. Герасименко (36 человек), в Степянке (50 человек).

Заболеваемость в г. Минске ЛБ за этот период возросла значительно. Например, в 2005 г. было зарегистрировано 142 случая Лайм-боррелиоза, а в 2010 г. — 264 (в 1,9 раза больше). При этом показатель заболеваемости в г. Минске в 1,6 раза выше, чем в целом по республике (соответственно 14,2 и 9,0% случаев на 100 тыс. населения). Особенно высокая заболеваемость Лайм-боррелиозом отмечена в Октябрьском (23,2 случая на 100 тыс. населения) и Центральном (16,1 случаев) районах г. Минска. Среди заболевших 88,3% человек отмечали укус клеща, среди них 78,8% снимали клещей самостоятельно и лишь 21,2% — в лечебно-профилактических учреждениях города.

На рисунке 2 представлены результаты инфицирования клещей *I. ricinus* разными видами боррелий: из 42 клещей 29 особей содержали по 2 и 3 возбудителя.

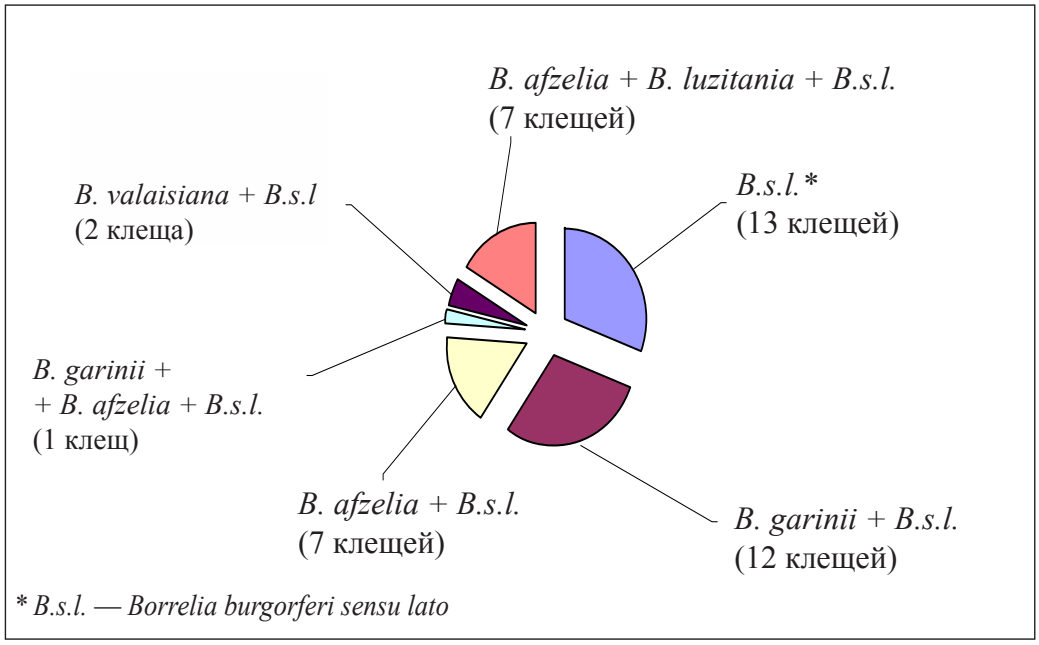


Рисунок 2 — Зараженность клещей *I. ricinus* разными видами боррелий

Установлено, что на эндемичных по КЭ и ЛБ территориях в иксодовых клещах соотношение зараженности клещей вирусом КЭ и боррелиями составляет от 1:3 до 1:8, чем и объясняется превышение показателей заболеваемости населения ЛБ по сравнению с КЭ.

Как видно из представленных данных, в современных условиях в мегаполисах и вокруг них эпидобстановка по клещевым инфекциям становится неблагоприятной. Следовательно, изучение паразитарной системы «иксодовые клещи — возбудители инфекций» приобретает все большую актуальность.

Исследования выполнены в рамках проекта В10-195 при поддержке БРФФИ.

Литература

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

2. Алексеев, А.Н. Функционирование паразитарной системы в условиях усиливающегося антропогенного пресса / А.Н. Алексеев, Е.В. Дубинина, О.В. Юшкова. — СПб., 2008. — 146 с.

3. Дубинина, Е.В. Экология, строительство и некоторые паразитологические проблемы больших городов / Е.В. Дубинина, А.Н. Алексеев, Г.А. Ефремова // Города России: проблемы строительства, инженерного обеспечения, благоустройства и экологии: сб. ст. XIII междунар. науч.-практ. конф. — Пенза, 2011. — С. 38–43.

4. Малеев, В.В. Обзор Европейских рекомендаций по диагностике клещевых бактериальных инфекций в Европе / В.В. Малеев // Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотер. — 2005. — Т. 7, № 2. — С. 130–153.

5. Мишаева, Н.П. Клещевые нейроинфекции в зоне туризма и местах массового отдыха в Беларуси / Н.П. Мишаева, С.О. Вельгин, Н.И. Ерофеева// Здравоохранение. — 2009. — № 12. — С. 19–22.

6. Клещевые эрлихиозы — новые для Беларуси бактериальные инфекции, патогенные для человека / Н.П. Мишаева, И. Головлева, С.Е. Яшкова, И.И. Протас // Современные аспекты патогенеза, клиники, диагностики, лечения и профилактики протозоозов, гельминтозов и арахноэнтомозов человека, животных и растений: сб. науч. тр. VII Междунар. науч.-практ. конф. — Витебск, 2010. — С. 86–91.

7. Мишаева, Н.П. Гранулоцитарный анаплазмоз человека в Республике Беларусь / Н.П. Мишаева, И.И. Протас, В.В. Щерба // Здравоохранение. — 2010. — № 11. — С. 19–21.

8. Эпидемиологическая ситуация по клещевым нейроинфекциям в Республике Беларусь в условиях глобального потепления / Н.П. Мишаева, Т.И. Самойлова, Н.С. Верещако, С.О. Вельгин // Актуальные проблемы природной очаговости болезней: материалы Всерос. конф. с междунар. участием, г. Омск, 2009. — Национальные приоритеты России. — 2009. — № 2 (спец. вып.). — С. 53–54.

9. Мишаева, Н.П. Зараженность иксодовых клещей белорусской популяции патогенными для человека микроорганизмами / Н.П. Мишаева, В.А. Стегний // Достижения медицинской науки Беларуси: рец. науч.-практ. ежегодник. — Минск: ГУ РНМБ, 2010. — Вып. 15. — С. 23.

10. Семенов, А.В. Многообразие заражения патогенами популяций клещей *Ixodes persulcatus* на территориях с сильным антропогенным прессом: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.19 / А.В. Семенов; Зоол. ин-т РАН. — М., 2003. — 21 с.
11. Alekseev, A. Enhancement of risk of tick-borne infection: environmental and parasitological aspects of the problem / A. Alekseev, H. Dubinina // J. Med. Entomol. — 2008. — Vol. 45, No. 4. — P. 812–815.

Поступила 01.08.2011

THE ROLE OF TICKS AS A RESERVOIR AND VECTORS OF TICK-BORNE INFECTIONS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Mishaeva N.P.[1], Drakina S.A.[1], Stegniy V.A.[1], Vedenkov A.L.[2], Jashkova S.E.[2], Volodkovich O.I.[3], Semizhon O.A.[3]

[1]Republican research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health;
[3]Minsk Municipal Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus

In Belarus ticks *Ixodes ricinus* L. and *Dermacentor reticulates* are reservoirs and vectors of tick-borne encephalitis virus, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *B. luzitaniae*, *B. valaisiana, B. burgdorferi s.l., Anaplasma phagocytophylum, Ehrlichia spp., Babesia spp.* Tick-borne mixed infections are an important medical and social problem for Belarus, whose importance has been increasing under the influence of global warming and anthropogenic pressing on ecosystems.

Keywords: ixodes ticks, infection agents, tick-borne mixed infections.

SURVEY OF POST-LYME DISEASE SYMPTOMS

Sprudzāns G.[1], Krūmiņa A.[2], Karelis G.[1], Gintere S.[3], Vīksna L.[2], Logina I.[1]

[1]Riga Stradins University, Department of Neurology and Neurosurgery;
[2]Riga Stradins University, Department of Infectology and Dermatology;
[3]Riga Stradins University, Department of Family Medicine, Riga, Latvia

Abstract. The analysis of the clinical symptoms of patients with post-Lyme Borreliosis disease was done. The most frequent complaints of the patients were uncomfortable sensory symptoms in extremities (52.4%; $p = 0.012$), joint pain (57.4%; $p = 0.623$), fatigue (46.5%; $p = 0.165$) and muscle pain (34.6%; $p = 0.672$). Reduced memory functions, poor concentration and multitasking difficulties had been reported as the most typical neurocognitive symptoms. There were no significant differences observed in this study in comparison with data from USA and other European countries regarding the most frequent complaints of post-Lyme disease.

Keywords: chronic Lyme disease, post-Lyme disease, post-treatment chronic Lyme disease.

Introduction. Part of the patients can develope persistent or relapsed non-specific symptoms after Lyme disease despite that they have received the appropriate infectious disease treatment. If there is no other explanation, it can be defined as post-Lyme disease or post – treatment chronic Lyme disease, according to scientific literature [1].

The most typical clinical symptoms of post–treatment chronic Lyme disease are fatigue, joint pain, muscle pain, headache, neck stiffness, parasthesias, sleep disturbances, impaired memory, decreased concentration, lasting longer than 6 month after applied antibacterial treatment [2-4].

According to literature post-Lyme disease syndrome is more common among patients with disseminated forms of Lyme Borreliosis (LB), clinically severe disease course or patients who have received delayed antibacterial treatment [2, 3].

The exact mechanism of post-Lyme syndrome pathogenesis is unknown and is considered as multifactorial. Potential initiators could be persistent B. Burgdorferi infection, other additional persistent tick-born infection, autoimmune mechanisms or post-infection fatique syndrome.

It has been hypothesized by Steere et al. that B. Burgdorferi may trigger immunologic and neurohormonal processes in the brain that cause persistent pain, fatigue and neurocognitive disorders in despite of applied antibacterial therapy [5]. In many patients these non-specific symptoms may be associated with natural response of immune system after antibacterial treatment course.

Various results of post-Lyme syndrome analysis were published in literature including treatment of this condition. Summary from studies is that the use of antibacterial treatment for post-Lyme syndrome is not recommended. The proposed treatment is usually symptomatic, using combination of non-steroiodal anti-inflamatory medications and antidepressants [4, 6]. However there are several reports on patients with chronic LB treated with Ceftriaxon, and their clinical symptoms, e.g., fatique and pain were reduced after treatment course. Patients not treated with antibacterial drugs did not experienced significant reduction of their clinical symptoms within the period of 6 and more months [4, 7].

Our study was aimed to conduct the analysis of the epidemiological – clinical symptoms and consequences of the patients with post-Lyme syndrome.

Material and methods. The design of the study was the survey of patients with clinically and/or serologically confirmed LB disease treated in the Latvian Infectology Center from 2004–2007 selected by retrospective analysis of their medical records. A stantardized study questionnaire was used. These questionnaires were sent to 218 patients, 101 responses received (response rate only 46.3%). Profile of respondent LB patients – 74 female and 27 male within the age range 21–84 (mean age – 56 years). The median time since onset or diagnosis of LB was 3-7 years.

Out of 101 patients enrolled in the study, 50 were the patients with confirmed first (early) stage of LB, 41 – with confirmed second stage and 10 – with third (late) stage of LB. For only 25 patients the diagnosis of LB was confirmed only clinically, for 76 patients – clinically and serologically.

The disseminated LB forms were diagnosed in 67 patients, i.e., in 33 patients – arthralgias/arthritis, in 12 – early neuroborreliosis (isolated monolateral *n. facialis* neuropathy in 2, aseptic meningitis in 6 patients, cranial and/or spinal meningoradiculoneuritis in 4, early peripheral polyneuropathy in 15 patients, atrophical acrodermatitis in 4, carditis – in 2 and late cerebral neuroborreliosis (chronic encefalopathy) in 1 patient.

All patients had received the antibacterial therapy: 50 patients were treated with Doxicycline in dose of 100 mg two times daily, 47 patients – Ceftriaxone 2 g daily, 3 patients (pregnant women) – Amoxicillin 500 mg 3 times daily a day and 1 patient – Penicillin 4 million units per day.

Results of the study. After LB diagnosis had been confirmed and treatment applied 63 (62.3%) inquired patients were consulted repeatedly after acute disease phase. For 52 (51.4%) patients it was done ambulatory as an outpatient care, 19 (18.8%) patients were rehospitalized due to health disorders.

From all cochort of polleed patients the following persistent post-Lyme disease complaints were reported: fatigue – 47 patients (46.5%), joint pain – 58 (57.4%), muscle pain – 35 (34.6%), headache – 31 (30.6%), joint swelling – 23 (22.7%), reduced memory functions – 38 (37.6%), poor concentration – 22 (21.7%), difficulties in formulating ideas – 18 (17.8%), difficulties in word finding – 21 (20.7%), difficulties in judgement – 12 (11.8%), difficulties in naming objects – 8 (7.9%), sleep disturbances – 30 (29.7%), nervousness – 32 (31.6%) and uncomfortable sensory symptoms in extremities (***uncomfortable*** feelings of coldness and numbness) – 53 (52.4%) patients.

The most frequent post-Lyme disease symptoms in the patients with disseminated stage (form) (n = 41) were**:** joint pain – in 29 patients, uncomfortable sensory symptoms in extremities – in 22, fatigue – in 20, muscle pain – in 18 patients and joint swelling – in 15 patients. The most common cognitive disorders were memory impairment – in 14 patients, nervousness – in 12, insomnia – in 12, difficulties in word finding – in 10, and difficulties in formulating ideas – in 9 patients.

The patients with late (third) stage of LB (n = 10) had the following persistent post-Lyme disease complaints: joint pain – 7 patients, uncomfortable symptoms in extremities – 6 patients, muscle pain – 5 patients, joint swelling and headache – 3 patients. As regards cognitive disorders 2 patients had difficulties in word finding and memory impairment.

27 (26.7%) from the patients enrolled in the study reported their health disorders occured during the first year after the treatment, 26 patients (25.7%) – upon completion of in-patient treatment, 21 patients (20.7%) – after 1 year, 8 patients (7.9%) within 6 months after diagnosis of disease and 5 patients (4.9%) were not aware of their complaints' occurence time.

79 LB patients (78.2%) reported that they still suffer from some of the above mentioned health disorders, 5 patients (4.9%) got rid of their health disorders within the first year, but 2 patients (1.9%) – after 1 year.

56 patients (55.4%) reported tasking medication on regular basis due to post – Lyme disease health disorders: 19 patients (18.8%) had used pain medication, 16 patients (15.8%) – medication for memory problems, 15 patients (14.8%) – insomnia (sleep) medications and 4 patients (3.9%) reported using antidepressants.

16 patients (15.8%) had to repeat the antibiotic treatment: 4 of these patients were originally diagnosed with the first stage of LB, 10 patients – the second stage and 2 patients – the third stage of the disease.

Serologic investigations of 45 LB patients (44.5%) were performed repeatedly. At the time the questionnaires were filled out 6 patients (5.9%) were not employed due to post-Lyme disease, 7 patients (6.9%) had been granted the status of a disabled person, 45 patients (44.5%) were not employed due to other reasons and 49 patients (48.5%) continued their profesional activities employment.

The most frequent concomitant diseases mentioned in the questionnaires by the patients were rheumatologic disease (n = 27), chronic cardiac failure (congestive heart failure) (n = 24), thyroid disease (n = 13), diabetes mellitus (n = 6), anaemia (n = 6), oncological disease (n = 6), depression (n = 5), post cerebral infarction (n = 4), miocardial infarction (heart attact) (n = 3), severe head trauma (n = 2), other disease (n = 16) and no other disease confirmed (n = 28).

Discussion. According to data available from literature Lyme disease causes neurologic and musculoskeletal manifestations. The present study is one of the first ones in Latvia related to this subject, and according to the aim of the study patients complaints of post-Lyme disease were analyzed.

Part of the patients that have received the appropriate Lyme disease treatment can develope persistent or relapsed non-specific symptoms known as post-Lyme syndrome or referred to as post – treatment chronic Lyme disease or chronic Lyme disease according different definitions [1].

The most frequent symptoms of post-Lyme syndrome are fatique, joint pain, muscle pain, headache, neck stiffness, parasthesia, sleep disturbances, impaired memory, poor concentration, all of these symptoms lasting longer than 6 month after applied antibacterial treatment [1-4]. From our present study 62.3% of the patients were consulted once again after LB diagnosis had been confirmed and treatment applied, but the rehospitalization due to post-Lyme disorders was needed for 18.8% of the patients. That indicates the chronic course and/or progression of LB.

The analysis of the patients' complaints associated with post-Lyme syndrome showed that the most frequent were complaints related to the musculoskeletal system – joint pain (57.4%; $p = 0.623$), fatigue (46.5%; $p = 0.165$) and muscle pain (34.6%; $p = 0.672$). In comparison, the results from five studies carried out in USA with enrolled 504 post-Lyme disease patients and 530 healthy control subjects showed that fatigue and all three musculoskeletal symptoms (joint pain, muscle pain and swollen joints) were more frequently observed among LB patients than in control group ($p < 0.00001$ and 0.002). There were 4 out of 6 neurocognitive symptoms, i.e., memory problems, poor concentration, difficulties in formulating ideas and difficulties in word finding, observed more frequently among LB patients than in control group ($p < 0.00001$ and 0.007). There were no significant differences between LB patients and control group as regards the rest two neurocognitive symptoms (difficulties in judgement and difficulties in naming objects) [8, 9].

In our study the most frequently observed neurocognitive symptoms were memory problems, poor concentration, difficulties in formulating ideas, difficulties in naming objects, difficulties in judgement and our results correspond to the reported literature data.

There are several contradictions between our study results and the data obtained in USA. The only method we used was the questionnaire, there were no control group, but within three of the studies carried out in USA the objective evaluation of patients was done and in two studies neurocognitive tests were used for evaluation of menthal condition. However there were differences among the results of these studies as well. More significant difference of symptoms between the patients and the control group was observed in the studies where the patients with neurological symptoms in acute phase of disease and delayed treatment were enrolled or in the studies where there were no children enrolled [8, 9].

In our study the second most frequent of the reported complaints in the patients group were uncomfortable symptoms in extremities or paresthesia. In the scientific literature this symptom was not analyzed.

According to the scientific literature the incidence of post-Lyme syndrome is higher in patients with disseminated forms of Lyme disease, early stage severe infection or in cases of delayed antibacterial treatment, but it is not related to the duration of the treatment course [1]. When analyzing the complaints of the patients with the disseminated forms of LB in our study the correlation between the dissemination rate and the amount of complaints was found, although the confidence was not statistically significant ($rs = 0.192$; $p = 0.055$; $n = 101$).

The question remains open about a duration of antibacterial treatment in cases of persistent non-specific symptoms. The results of the questionnaire showed that 15.8% of the patients in our country had repeatedly undergone antibacterial treatment. The patients answers were incomplete, thus the necessity of therapy, used antibacterial medication and duration of course were not determined. According to the scientific literature data, the antibacterial therapy is not recommended in case of post-Lyme syndrome [4].

It is considered that non-steroidal anti-inflammatory medications and antidepressants should be used for the treatment of non-specific symptoms [8]. In the present study more than half (55.4%) of the LB patients mentioned in their responds – they had to take medication on regular basis due to post-Lyme disease health disorders. The most frequently used drugs had been pain killers relievers (18.8%) and medication for memory improvement (15.8%), but 3.9% of the patients had taken antidepressants.

The prognosis or expected outcome for the patients who have received early antibiotic therapy during the first stage of the disease is usually good. More attention should be paid to the patients with disseminated forms of the disease.

When analyzing the social status of the patients with post-Lyme disease we found that 6.9% of these patients had been granted the status of a disabled person and 5.9% were not employed due to post-Lyme disease health disorders. This points the need for educating health care professionals and patients in order to identify early symptoms and start the treatment timely. There is currently no vaccine available to prevent from infection with Lyme disease however the role of an individual non-specific prophylaxis in the disease prevention should not be underestimated.

Although repeated serological investigations are not usually focused on the evaluation of the results of the LB therapy due to the fact that specific IgG antibodies in high titers may persist for years after adequate antimicrobial therapy, the results of our study show that the repeated serological investigations of almost half (44.5%) of the patients were performed in order to control the disease.

In future the topicality of the post-Lyme syndrome will probably increase, the knowledge on the mechanism of LB progression and the treatment methods will grow, allowing professionals to choose the most appropriate medical and psychological approach to the patient.

Conclusions. In Latvia the most frequent complaints of the Lyme disease patients were uncomfortable symptoms in extremities, fatigue, joint pain, muscle pain, memory problems, poor concentration and difficulties in word finding.

The complaints did not differ from relevant symptoms analyzed in the studies performed in other countries.

References

1. Cairns, V. Post-Lyme borreliosis syndrome: a meta — analysis of reported symptoms / V. Cairns, J. Godwin / Int. J. Epidemiol. — 2005. — Vol. 34. — P. 1340–1345.

2. Long-term follow-up of patients with culture-confirmed Lyme disease / J. Nowakowski [et al.] // Am. J. Med. — 2003. — Vol. 115, N 2. — P. 91–96.

3. Symptoms of post-Lyme syndrome in long-term outcome of patients with neuroborreliosis / D. Picha [et al.] // Scand. J. Infect. Dis. — 2006. — Vol. 38, N 8. — P. 747–748.

4. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis / A. Mygland [et al.] // Eur. J. Neurol. — 2010. — Vol. 17. — P. 8–16.

5. Steere, A.C. The emergence of Lyme disease / A.C. Steere, J. Coburn, L. Glickstein // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 113. — P. 1093–1101.

6. Nau, R. Lyme disease — current state of knowledge / R. Nau, H.J. Christen, H. Eiffert // Dtsch. Arztebl. Int. — 2009. — Vol. 106, N 5. — P. 72–82.

7. A randomized, placebo-controlled trial of repeated IV antibiotic therapy for Lyme encephalopathy / B.A. Fallon [et al.] // Neurology. — 2008. — Vol. 70, N 13. — P. 992–1003.

8. Musculoskeletal and neurologic outcomes in patients with previously treated Lyme disease / N.A. Shadick [et al.] // Ann. Int. Med. — 1999. — Vol. 131. — P. 919–926.

9. Vazquez, M. Long-term neuropsychologic and health outcomes of children with facial nerve palsy attributable to Lyme disease / M. Vázquez, S.S. Sparrow, E.D. Shapiro // Pediatrics. — 2003. — Vol. 112, N 2. — P. 93–97.

Поступила 06.08.2011

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИЕХ СИМПТОМОВ И ПОСЛЕДСТВИЙ БОЛЕЗНИ ЛАЙМА

Спрудзанс Г.[1], Круминя А.[2], Карелис Г.[1], Гинтере С.[3], Виксна Л.[2], Логина И.[1]

[1]Рижский университет им. П. Страдиня, кафедра неврологии и нейрохирургии;
[2]Рижский университет им. П. Страдиня, кафедра инфектологии и дерматологии;
[3]Рижский университет им. П. Страдиня, кафедрасемейной медицины, Рига, Латвия

В рамках выполнения научно-исследовательской работы проведен анализ симптомов у больных, переболевших болезнью Лайма в Латвии. У больных чаще отмечалась парастезия конечностей

(52,4%; p = 0,012), боли в суставах (57,4%; p = 0,623), усталость (46,5%; p = 0,165), а также мышечные боли (34.6%; p = 0,672). Самые частые нейрокогнетивные жалобы: ухудшение памяти, нарушения внимания, трудно сосредоточиться, трудно выразить свои мысли и суждения, предметы называет описательно. Приведенный анализ симптомов переболевших болезнью Лайма в Латвии не отличается от такого же анализа в других странах.

Ключевые слова: хроническая болезнь Лайма, болезнь Лайма, лечение хронической болезни Лайма.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ПО ЛИХОРАДКЕ КУ В НЕКОТОРЫХ СТРАНАХ ЕВРОПЫ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Самойлова Т.И., Аблова Т.А., Петкевич А.С.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Лихорадка Ку является широко распространенным во всем мире инфекционным зооантропонозным заболеванием домашних, диких животных, птиц и человека, вызываемым облигатной внутриклеточной бактерией *Coxiella burnetii* с разнообразными механизмами передачи возбудителя. Недавние крупные вспышки заболевания в Нидерландах (2007–2010) вызвали серьезные опасения в Европейском союзе относительно рисков, связанных с лихорадкой Ку. В результате были подготовлены научно обоснованные отчеты по оценке этих рисков и разработаны совместные действия органов здравоохранения и ветеринарии, обязательные для осуществления на национальных и локальных уровнях стран-членов. В статье приведен краткий обзор этих мероприятий с учетом анализа значимости данного заболевания для Беларуси.

Ключевые слова: лихорадка Ку, Q-коксиеллез, эпидемиология, диагностика, Европа.

Введение. Лихорадка Ку (или Q-коксиеллез) распространена практически во всех странах мира, в том числе и на сопредельных с Республикой Беларусь территориях [1–3]. Болезнь впервые описана в Австралии в 1935 г. среди рабочих скотобоен и получила свое название (Q-fever) в 1937 г. в силу существования многих неясностей (по первой букве английского слова query — запрос), первоначально связанных с ее этиологией и эпидемиологией [4]. Лихорадка Ку обнаружена практически у всех диких и домашних животных, включая членистоногих, птиц, грызунов, кошек, собак, но поражает главным образом людей, крупный рогатый скот, овец и коз [5–9].

Поскольку в нашей стране заболевание впервые зарегистрировано в 1955 г. [10], **целью** работы было изучение опыта эпидемиологического надзора по заболеванию на сопредельных территориях и в странах Европейского союза (ЕС). В качестве источника информации использовалась доступная литература.

Этиология. Возбудитель болезни *Coxiella burnetii* представляет собой грамотрицательную облигатную внутриклеточную бактерию, адаптированную к активному размножению в фаголизосомах фагоцитов. Исторически бактерия была классифицирована в семейство *Rickettsiaceae* [1, 2, 4], однако филогенетические исследования, основанные главным образом на анализе последовательности 16s рРНК, показали, что род *Coxiella* далек от рода *Rickettsia* класса альфа-протеобактерий, и в настоящее время *C. burnetii* отнесена к семейству коксиелл (*Coxiellaceae*) порядка легионелл (*Legionellales)* класса гамма-протеобактерий [11]. Полученные результаты полного секвенирования генома *C. burnetii* подтверждают ее систематическое положение [12]. Но коксиеллез по-прежнему продолжают изучать риккетсиологи.

В отличие от риккетсии, *C. burnetii* обладает способностью производить небольшие, плотные, очень устойчивые спороподобные формы. Эта способность объясняется существованием в цикле развития *C. burnetii* разных вариантов клеток, обнаруженных в исследованиях *in vitro*: варианты больших клеток (large-cell variants, LCV), мелкоклеточные варианты (small-cell variants, SCV), а также небольшие плотные клетки (small dense cells, SDC) размером 0,2 мкм в ширину и от 0,5 до 2 мкм или от 0,4 до 0,7 мкм в диаметре [13]. Варианты SDC и SCV представляют собой небольшие морфологические варианты бактерий, приспособленные для выживания вне клетки как инфекционные частицы — свойство, играющее большую роль для персистенции в окружающей среде и передачи [7, 14].

Другой важной характеристикой является то, что *C. burnetii* имеет две антигенные формы: патогенной фазы I, выделенные от зараженных животных или людей, и ослабленной фазы II, полученные повторными лабораторными пассажами *in ovo* (на куриных эмбрионах) или *in vitro* (на культуре клеток). Изменения основной иммуногенной детерминанты — липополисахарида (ЛПС) — происходит во время серийных пассажей: от клеток фазы I с полной длиной О-цепей ЛПС; в промежуточные фазы с уменьшением О-цепей ЛПС в длину; а затем в клетки фазы II с усеченными ЛПС. В настоящее время разработаны коммерческие тесты, позволяющие определять антитела к *C. burnetii* обеих фаз, что дает возможность выявлять этап и форму инфекции. Также разработаны инактивированные вакцины против лихорадки Ку, но из них эффективны только полученные из антигена возбудителя фазы I [7, 15]. В целом, геномы изолятов *C. burnetii* широкого спектра биологически и географически разнообразных источников являются высоко консервативными, но наблюдается некоторый полиморфизм, такой как перестановки синтенических блоков [16, 17]. Эта пластичность генома может способствовать проявлению различных фенотипов и представляет большой интерес для методов генотипирования.

Возбудитель лихорадки Ку отнесен к потенциальному агенту биологического терроризма, поскольку: 1) чрезвычайно устойчив к воздействию физико-химических факторов и длительно сохраняется в окружающей среде в спорообразном состоянии; 2) обладает высокой патогенностью для людей (1–10 бактерий достаточно для инфицирования человека) аэрогенным путем; 3) полиморфизм клинических проявлений заболевания затрудняет диагностику и своевременную этиотропную терапию; 4) агент можно быстро распространить на большие расстояния (в сухую ветреную погоду — до 5 км) [1, 20].

Эпидемиологические аспекты. Домашние жвачные животные считаются основными резервуарами для *C. burnetii* и болезнь у них чаще всего связана со спорадическими или вспышечными абортами и рождением мертвого, а также слабого потомства, с последующим выздоровлением. Овцы, козы и коровы являются в основном субклиническими носителями, но могут высвобождать бактерии с различными выделениями и экскрементами. Существуют четкие эпидемиологические и экспериментальные доказательства того, что инфекция передается преимущественно аэрогенным путем при вдыхании высохших аэрозольных частиц при контакте с инфицированными животными, их репродуктивными тканями, или другими продуктами животного происхождения (шерсть, кожа, пух и др.) [1, 2, 18, 19]. Кошки, собаки, кролики, птицы и даже мухи могут быть вовлечены в инфицирование человека [5–9]. Заражение человека может происходить алиментарно через потребление контаминированных молочных продуктов, но четких данных, подтверждающих заражение через пищу, нет [7, 14]. Наконец, членистоногие, главным образом клещи, могут участвовать в передаче коксиеллеза (трансмиссивная передача), риск связан в основном с дикими животными (укусы, зараженная пыль от высушенных экскрементов). Лихорадка Ку крайне редко, но может передаваться от человека к человеку, поскольку заражение возможно во время родов, при половых контактах или переливании крови. У животных вертикальная и половая передача может встречаться, но их значимость не выяснена [1, 2, 7, 14].

У человека лихорадка Ку протекает в острой, хронической или субклинической форме, диагностика зачастую затруднена в связи с полиморфизмом клинических проявлений. Острая форма обычно протекает как неспецифическое гриппоподобное заболевание, иногда с пневмонией или гранулематозным гепатитом, а около 50% случаев — бессмптомно, довольно быстро проходит после соответствующей терапии антибиотиками. Основным клиническим проявлением хронической лихорадки Ку является эндокардит у пациентов с вальвулопатиями, сосудистыми инфекциями, гепатитом или синдромом хронической усталости. Хроническая форма заболевания требует длительной антибактериальной терапии (от нескольких месяцев до 2 лет и более) в сочетании с серологическим мониторингом. При отсутствии соответствующего лечения антибиотиками, осложнения хронической формы могут быть тяжелыми и даже привести к смертельному исходу. Кроме того, данная инфекция может спровоцировать у беременных женщин воспаление плаценты и привести к преждевременным родам, сдерживанию роста плода, спонтанному аборту или даже смерти плода. Хроническое заболевание, скорее всего, развивается у лиц с ослабленным иммунитетом [7, 14, 18].

Инфекция, будучи эндемичной для многих регионов мира, приводила к спорадическим или взрывным вспышкам. Вспышки заболевания людей, как правило, носили временный характер и редко превышали 300 острых случаев [7, 14]. Самая крупная зарегистрированная вспышка лихорадки Ку, о которой когда-либо сообщали, возникла в 2007 г. в Нидерландах, где в последующие годы пик заболеваемости в период с февраля по сентябрь увеличивался, и географический район посте-

пенно расширялся. За четырехлетний период 2007–2010 гг. в стране было зарегистрировано более 4000 случаев заболевания среди людей, включая несколько смертельных случаев [7, 14, 20, 21].

Лихорадка Ку является эндемичным заболеванием практически для всех стран Европы. Серологические исследования, проведенные в период 1970–2009 гг. выявили, что 10–30% сельского населения в разных частях Европы имеют антитела к *C. burnetii*. Наблюдаемая серопревалентность была выше у фермеров, работающих с крупным рогатым скотом и овцами, и самая высокая — у лиц, находящихся в контакте с животными продуктами от родов или абортов. Другими группами высокого риска инфицирования являются ветеринары и персонал научно-исследовательских лабораторий, работающих с животными [7, 14]. В последние годы регистрировались довольно большие вспышки среди людей в городах и других жилых районах в нескольких странах ЕС (Болгария, Германия и Нидерланды) и в Хорватии, в большинстве случаев они были связаны с небольшими хозяйствами жвачных животных. Это подчеркивает тот факт, что лихорадка Ку может представлять реальную угрозу для здоровья населения, в частности и для городского, а также указывает на необходимость усиления отчетности и контроля этой возникшей проблемы. Как показали вспышки лихорадки Ку в Нидерландах 2007–2010 гг., она может затронуть большое количество людей [7, 14, 20, 21].

На рисунке 1 приведены данные по заболеваемости лихорадкой Ку в странах ЕС на основе ежегодных эпидемиологических отчетов, представленных на сайте Европейского центра контроля за инфекционными заболеваниями (http://ecdc.europa.eu).

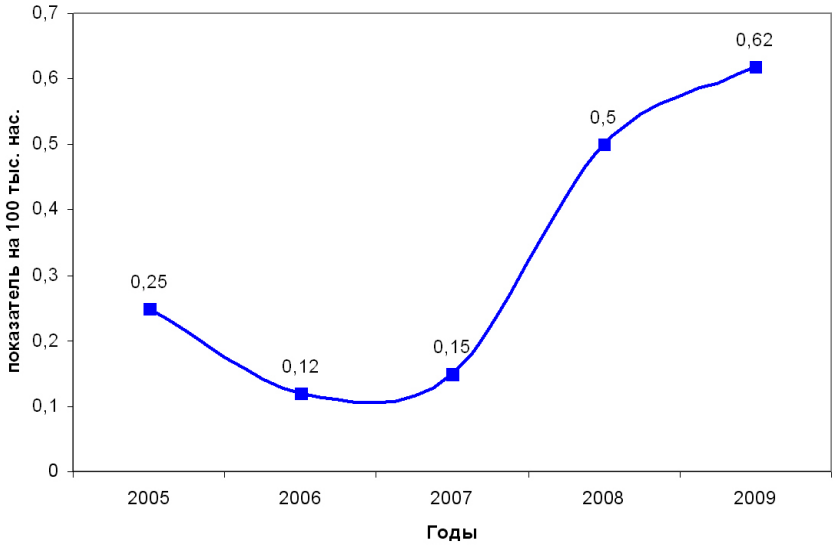
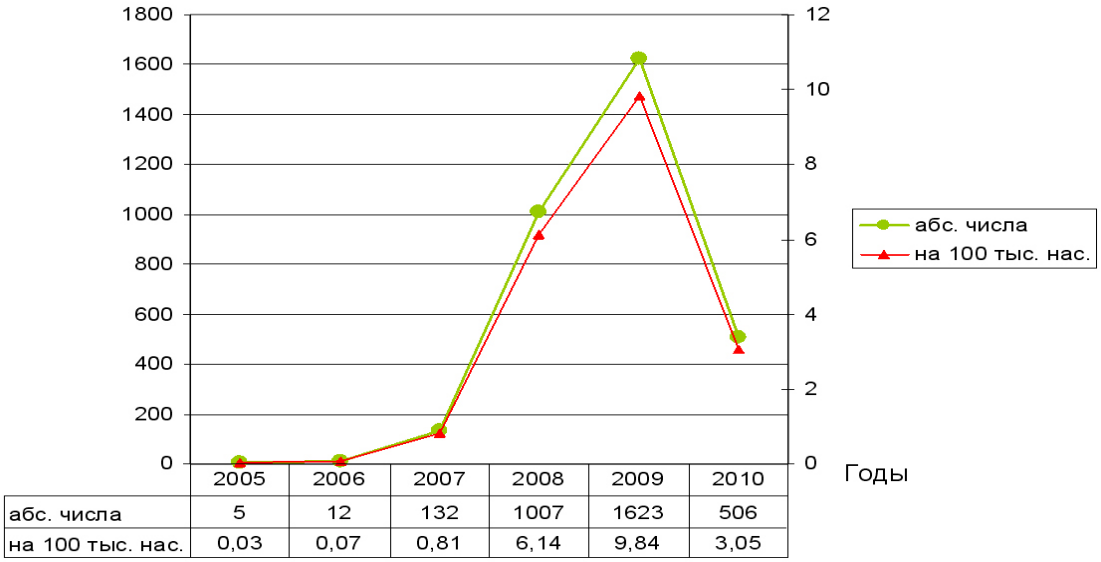


Рисунок 1 — Динамика показателей заболеваемости лихорадкой Ку в странах Европейского союза за последние годы

В 2009 г. общий для ЕС показатель подтвержденных случаев составил 0,62 на 100 тыс. населения, при этом в Нидерландах он был самым высоким (9,8) и составил 82% от всех подтвержденных случаев заболевания в связи со вспышкой.

Динамика показателей заболеваемости лихорадкой Ку в Нидерландах за последние годы представлена на рисунке 2. Данные приведены на основе ежегодных эпидемиологических отчетов, представленных на сайте Европейского центра контроля за инфекционными заболеваниями (http://ecdc.europa.eu) и с сайта Компьютизированной системы информации по инфекционным болезням CISID (http://data.euro.who.int/cisid).



	2005	2006	2007	2008	2009	2010
абс. числа	5	12	132	1007	1623	506
на 100 тыс. нас.	0,03	0,07	0,81	6,14	9,84	3,05

Рисунок 2 — Динамика показателей заболеваемости лихорадкой Ку в Нидерландах за последние годы

В соседних странах — России, Украине и Польше — санитарно-эпидемиологический надзор по лихорадке Ку осуществляется с середины 50-х гг. прошлого века. Так, в Российской Федерации обязательная регистрация заболевания введена с 1957 г., когда было сообщено о 1271 случае при показателе относительной заболеваемости 1,0 на 100 тыс. населения [1]. В последующие 50 лет заболеваемость находилась в пределах минимально 26 (1999 г.) и максимально — 770 случаев (1960 г.) ежегодно. По официальным данным, за 1957–2007 гг. более чем в 50 субъектах страны было зарегистрировано 12 354 случая коксиеллеза, большинство из них приходятся на Поволжский, Западно-Сибирский и Центрально-Черноземный регионы. На всей территории страны имеются отдельные эндемические очаги, отмечена неравномерность территориального распределения заболеваемости, что связано как со степенью активности природных и антропургических (хозяйственных) очагов, так и со степенью активности их выявления. При этом по своим социально-экономическим последствиям коксиеллез в России занимает одно из первых мест среди нозологических форм зоонозных инфекций, имеющих большое значение для краевой патологии [1, 6, 15].

В Украине установлено, что ландшафтно-географические и зоопаразитологические особенности страны создают предпосылки формирования природных очагов лихорадки Ку, которые выявлены на территориях 13 областей. В западном регионе страны выявлена значительная иммунная прослойка населения в отношении этого заболевания, особенно среди животноводов (22,6–30%), где выявлялся и высокий уровень инфицированности сельскохозяйственных животных (12–25%). В Крыму также ежегодно регистрируются спорадические заболевания лихорадкой Ку у людей [1, 2].

Ниже приведены данные по заболеваемости лихорадкой Ку в России и Украине за последние 3 года (таблица).

Таблица — Сведения о заболеваемости лихорадкой Ку в России и Украине, 2008–2010 гг.

Годы	Россия[1]		Украина[2]	
	абс. число	на 100 тыс. населения	абс. число	на 100 тыс. населения
2008	17	0,01	7	0,02
2009	124	0,09	—	—
2010	190	0,13	6	0,01

Примечания:

1. [1]Данные с сайта Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора — http://www.fcgsen.ru

2. [2]Данные с сайта Компьютизированной системы информации по инфекционным болезням CISID — http://data.euro.who.int/cisid

3. — нет данных.

В Польше с 1956 по 2009 гг. регистрировалось несколько вспышек коксиеллеза среди людей. Эпидемиологические исследования источника инфекции выявили, что они были связаны с импортированными животными или их продуктами. Инфекцию выявляли с использованием серологических методов, однако в некоторых случаях удалось подтвердить ее выделением штаммов *C. burnetii.* Использование молекулярных методов генотипирования позволило выявить родство польских штаммов со штаммами из Австрии и Германии [3].

В Республике Беларусь до настоящего времени эпизоотическая и эпидемиологическая ситуация по лихорадке Ку не изучена, хотя вспышка ее была зарегистрирована в 1955 г. среди работников Витебского коврово-плюшевого комбината. Тогда серологически было выявлено 2 случая заболевания из 52 обследованных пациентов с невыясненным диагнозом, а в ходе эпидемиологического расследования еще у 7 из 24 обследованных рабочих кожевенного завода было обнаружено наличие антител к лихорадке Ку [10]. Учет заболеваемости до настоящего времени не внесен в официальную статистическую форму. Специфические средства защиты животных в республике также не разработаны. Оздоровление хозяйств осуществляют в соответствии с санитарными и ветеринарными правилами, утвержденными в 2002 г. [19].

До сих пор еще нет достаточно знаний о факторах возникновения вспышек коксиеллеза среди животных и людей. Это свидетельствует о том, что название «лихорадка Ку», которое предложил австралийский врач Э. Деррик больше 70 лет назад, все еще ему соответствует. Эксперты считают, что существует некоторая зависимость между волнами возникновения абортов у коз и овец в хозяйствах и резким увеличением числа случаев заражения людей.

Диагностические аспекты. В последние годы наблюдается очевидная гиподиагностика инфекции из-за полиморфизма клинических проявлений и позднего появления специфических антител в крови пациентов.

Лабораторная диагностика коксиеллеза в связи с разнообразием клинических проявлений и отсутствием патоанатомических признаков основана на серологических методах исследования. Для этих целей применяют традиционно используемые реакции, такие как реакция связывания комплемента (РСК), метод флуоресцентного анализа (МФА), непрямой метод флуоресцинирующих антител (нМФА), твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА), а также более современные методы — хемилюминесцентный иммуноанализ (ХЛИА), флуоресцентный иммуноферментный анализ с временным разрешением (ФИАВР), точечный твердофазный иммуноанализ (ДОТ-ТИФА). Разрабатываются диагностические тест-системы на основе моноклональных антител к антигену коксиелл Бернета. У многих больных в гемограмме выявляют лейкопению с нейтропенией, лимфо- и моноцитоз, умеренное увеличение СОЭ. В практической деятельности преимущественно применяют РСК в парных сыворотках крови; специфичность этой реакции достаточно высокая. Диагностические титры антител (1:16–1:32) появляются не ранее конца 2-й или на 3-й недели болезни. Наличие специфических антител класса IgG свидетельствует о недавней инфекции *C. burnetii* или экспозиции в прошлом. ТИФА является предпочтительным по практическим соображениям и как имеющий более высокую чувствительность.

При поражениях легких необходимо дифференцировать заболевание прежде всего с туберкулезом легких, поскольку в ряде случаев инфильтраты при лихорадке Ку могут располагаться в верхних отделах легких и напоминать туберкулезные. В первые дни заболевания пневмония при коксиеллезе протекает со скудными клиническими проявлениями (отсутствие кашля, мокроты, болей в грудной клетке, одышки, притупления перкуторного звука и влажных хрипов). Однако уже в этот период можно наблюдать значительные изменения в лёгких при рентгенологическом обследовании. При других формах заболевания его следует отличать от гриппа, брюшного тифа и паратифов, острого и подострого бруцеллеза, безжелтушного лептоспироза и сепсиса.

Идентификация агента. Поскольку *C. burnetii* являются облигатными внутриклеточными бактериями, их можно выделить путем инокуляции образцов в обычные культуры клеток, желтушные мешки куриных эмбрионов или лабораторных животных. Заражение лабораторных животных (морских свинок, мышей, хомяков) подходит в тех случаях, когда требуется выделение агента из тканей, фекалий, молока или проб окружающей среды, загрязненных различными микроорганизмами.

Бактерий можно визуализировать в окрашенных образцах ткани или мазках влагалищной слизи с помощью иммерсионного микроскопа. В силу своей кислотоустойчивости бактерии могут быть окрашены несколькими способами: по Стемпу, модифицированным по Цилю-Нильсену, Хименесу, Гимза и модифицированным Костера. Из-за отсутствия специфичности положительные результаты позволяют свидетельствовать о наличии лихорадки Ку.

Для визуальной детекции возбудителя современные методы иммуногистохимического окрашивания, *in situ* гибридизации или полимеразной цепной реакции (ПЦР) являются более специфичными и чувствительными по сравнению с классическими методами окрашивания. ПЦР считается наиболее полезным и надежным тестом для скрининга больших количеств и различных типов образцов для диагностики лихорадки Ку. Два описанных недавно метода, основанных на ПЦР типировании –анализ локусов, содержащих тандемные повторы (multiocus variable number tandem repeat analysis, MLVA) и секвенирование межгенных участков (multispacer sequence typing, MST) – позволяют типировать *C. burnetii* без необходимости ее выделения [3, 7, 12, 14, 16, 17].

Оценка рисков по лихорадке Ку. В связи с крупнейшими вспышками в Нидерландах Европейским центром по контролю и профилактике заболеваний (ECDC) при сотрудничестве с Европейским управлением по безопасности пищевых продуктов (EFSA) были подготовлены научно обоснованные заключения по определению масштаба, распределения, влияния и значимости инфекции, вызываемой коксиеллами *Coxiella burnetii*, для домашних жвачных животных и людей. Эксперты из Нидерландов, Франции, Германии, Великобритании и Соединенных Штатов особо оценили такие риски, связанные с лихорадкой Ку, как:

- возможность передачи коксиеллеза через кровь;
- влияние на здоровье острой и хронической форм лихорадки Ку;
- риски для беременных женщин;
- возможность трансграничного распространения заболевания.

И как следствие оценки рисков обсуждался вопрос необходимости совершенствования системы эпидемиологического надзора в европейском регионе по данному заболеванию.

Оценка проводилась в соответствии с принципами доказательной методологии, определяя условия поиска по каждому вопросу, критерии включения и исключения выявленных исследований и оценки качества доказательств [7, 14]. Были сделаны следующие ниже заключения.

Возможность передачи коксиеллеза через кровь. Поскольку *Coxiella burnetii* является облигатной внутриклеточной бактерией, она может передаваться через кровь и ткани. Риск такой передачи низок (в литературе встретился только один зарегистрированный случай). Во время вспышки должны быть определены эндемичные районы и рассмотрены меры предосторожности, например, активный надзор среди реципиентов крови и тканей, отбор доноров и скрининг крови и тканевых продуктов. Для путешественников, вернувшихся из области в течение срока инкубационного периода и с бессимптомной бактериемией (5–7 недель), должна быть установлена отсрочка от донорства крови до конца этого периода. Реципиентам крови особенно высокого риска, например, пациентам с пороками клапанов сердца, необходимо назначать курс лечения антибиотиками. Донорам, которые перенесли острую форму коксиеллезной инфекции, следует отказаться от сдачи крови в течение двух лет от даты подтвержденного излечения. Целесообразность применения таких мер должна быть тщательно продумана от негативного воздействия, которые они могут оказать на кровоснабжение в данном регионе, т.е. должна быть разработана стратегия по риску снабжения.

Влияние на здоровье острой и хронической форм лихорадки Ку. Острая лихорадка Ку, как правило, протекает в виде мягкого, самоограниченного гриппоподобного заболевания, но иногда проявляется пневмония, гепатит и другие симптомы. Обычно его можно успешно вылечить двухнедельным курсом приема доксициклина.

Хроническая лихорадка Ку является серьезным осложнением острой инфекции и развивается приблизительно у 2% острых симптоматических случаев, а смертность может варьировать от 5 до 50%. Хроническая лихорадка Ку вызывает эндокардиты в группах риска у людей с предыдущими заболеваниями клапанов сердца, искусственными клапанами или сосудистыми трансплантатами. Пациенты с раком или пониженным иммунитетом также находятся в группе повышенного риска. Хроническая лихорадка Ку требует длительного лечения (не менее одного года), а в некоторых случаях с применением более одного антибиотика и необходимостью хирургической замены поврежденных клапанов сердца.

Эффективное обнаружение и лечение острой лихорадки Ку является наилучшей стратегией для предотвращения хронических случаев. В литературе описаны три возможных подхода: 1) повышение осведомленности специалистов здравоохранения и общественности относительно групп риска; 2) активное серологическое обследование известных групп риска для раннего выявления и лечения острой коксиеллезной инфекции; 3) проведение эхокардиографии у пациентов с острой лихорадкой Ку для активного выявления случаев и принятия дальнейших мер.

Существует необходимость инициировать хорошие перспективные когортные исследования и контролируемые испытания (при этической возможности) с целью получения более надежных данных в области общественного здравоохранения по предотвращению и ликвидации вспышек лихорадки Ку, а также по диагностике и лечению острых и хронических заболеваний на клиническом уровне.

Риски для беременных женщин. Данные о лихорадке Ку при беременности очень ограничены и поступают в основном из наблюдений и научных исследований на домашних и экспериментальных животных, исследований по серопревалентности, историй болезни. Риск для беременных женщин с тяжелыми последствиями от лихорадки Ку по сравнению с риском для общего (женщин) населения не может быть определен на основе имеющихся в настоящее время доказательств. Сообщается о нескольких случаях заражения коксиеллезом во время беременности, приведших к неблагоприятным исходам. В некоторых случаях *C. burnetii* были найдены в плаценте и в эмбриональной ткани. Коксиеллы также были выявлены в человеческом грудном молоке, но ни один случай передачи грудному ребенку не был подтвержден.

Беременным женщинам рекомендуется не посещать хозяйства в пострадавших районах. ECDC не рекомендует отказываться от грудного вскармливания за исключением случаев хронических заболеваний, требующих длительного лечения матери.

Возможность трансграничного распространения заболевания. Имеющиеся данные свидетельствуют о дальности распространения *C. burnetii* аэрогенным путем до 5 км от источника инфекции. Риск распространения инфекции, следовательно, ограничен районами, близкими к источникам вспышки. Активный надзор и выявление случаев заболевания острой лихорадки Ку в потенциальных группах риска (например, беременные женщины, пациенты с искусственными клапанами сердца и сосудистыми заболеваниями) на местном уровне и в течение определенного периода времени является осуществимым и эффективным методом для выявления острых инфекций. В районах, прилегающих к эпидемической зоне (≤5 км от источника), должна быть начата информационная кампания среди медицинских работников. Если есть угроза распространения в другие государства-члены, ответственные государственные органы здравоохранения должны информировать своих трансграничных коллег. Обмен информацией между медицинскими и ветеринарными органами, а также предпринимаемые ими совместные меры будут способствовать скорейшей ликвидации вспышки.

Для совершенствования эпидемиологического надзора по лихорадке Ку в странах ЕС приняты соответствующие директивы, координирующие совместные мероприятия ECDC и EFSA для мониторинга и отчетности о случаях лихорадки Ку у животных и людей. Своевременное уведомление о возможных случаях в органы здравоохранения и регулярный (трансграничный) обмен данными может помочь в предотвращении вспышек.

Профилактические аспекты. Вакцинацию следует рассматривать как средство долгосрочного контроля, учитывая при этом, что эффективность ее не может наблюдаться в краткосрочной перспективе. Безопасная и эффективная вакцина может стать лучшим способом снижения проблемы вспышек лихорадки Ку.

Для профилактики заболевания у людей были предложены три типа вакцин против коксиеллеза: живые ослабленные вакцины, субъединичные вакцины и цельноклеточные.

В России в середине прошлого века была создана живая аттенуированная вакцина М-44, однако от нее пришлось отказаться из соображений безопасности, недавно была разработана комбинированная инактивированная вакцина КВК на основе коксиелл штамма Луга-1, обладающая безопасностью и высокой эффективностью согласно данным испытаний на ограниченной группе людей [15].

На животных были проведены предварительные клинические испытания субъединичных вакцин, но пока их иммуногенность ограничена. Поэтому эти вакцины не доведены до стадии клинических испытаний [7].

Инактивированная формалином цельноклеточная вакцина против лихорадки Ку, произведенная и запатентованная в Австралии, в настоящее время является единственной вакциной, которую ECDC считает подходящей и рекомендует к применению и в Европе для определенных групп риска, но не для всеобщей вакцинации. Это связано с высокой реактогенностью вакцины у лиц, которые ранее были инфицированы *C. burnetii*, поэтому до вакцинации необходимо проводить тестирование. Исследования по разработке вакцин нового поколения должны стать приоритетными [7].

Заключение. Таким образом, учитывая сложившуюся эпидситуацию по лихорадке Ку в сопредельных странах и странах ЕС, можно констатировать, что она не воспринимается медицинскими и ветеринарными сообществами в качестве серьезной угрозы для здоровья населения. Тем не менее, возбудитель *C. burnetii* может приводить к изнурительным и потенциально опасным хроническим инфекциям людей. В этой связи с учетом опыта соседних стран и, особенно, стран ЕС, в Республике Беларусь назрела необходимость поэтапной разработки системы мониторинга данной инфекции а именно: 1) разработать и внедрить в практику здравоохранения и ветеринарной службы отечественные диагностические тест-системы на основе ИФА и ПЦР; 2) внести учет заболеваемости в официальные статистические формы; 3) оценить распространенность заболевания среди людей и животных (в первую очередь, среди мелких домашних жвачных — коз, овец); 4) организовать обучение отечественных специалистов в профильных учреждениях Российской Федерации или странах ЕС; 5) определить национальную референс лабораторию по данному заболеванию с целью координации и согласованности дальнейших действий по контролю коксиеллеза в европейском регионе.

Литература

1. Лобан, К.М. Лихорадка Ку / К.М. Лобан, Ю.В. Лобан, Е.Л. Лукин // Риккетсиозы человека: руководство для врачей. — М.; СПб., 2002. — 476 с.

2. Эпизоотологический та эпидемиологический мониторинг Ку-риккетсиоза в Украине / В.А. Лукьянчук [и др.] // Ветеринарная наука — производству: науч. тр. — Минск, 2005. — Вып. 38. — С. 327–329.

3. Molecular epidemiology of Q fever in Poland / T. Chmielewski // Pol. J. Microbiol. — 2009. — Vol. 58, N 1. — P. 9–13.

4. Burnet, M. Derrick and the story of Q fever / M. Burnet // Med. J. Aust. — 1967. — Vol. 2, N 24. — P. 1067–1068.

5. Arricau-Bouvery, N. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? / N. Arricau-Bouvery, A. Rodolakis // Vet. Res. — 2005. — Vol. 3. — P. 327–349.

6. Коксиеллез (Q-лихорадка): современные представления о возбудителе заболевания и его роли в инфекционной патологии человека / А.М.-Б. Камара [и др.] // Мед. новости. — 2009. — № 15. — С. 8–11.

7. EFSA (European Food Safety Authority). Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on Q Fever [Electronic resource] // EFSA J. — 2010. — Vol. 8, N 5: 1595. — 114 pp. — doi:10.2903/j.efsa.2010.1595. — Mode of access: www.efsa.europa.eu. — Date of access: 31.08.2011.

8. Serological evidence of Coxiella burnetii infection in dogs in a regional centre / A. Cooper [et al.] // Austral. Vet. J. — 2011. — Vol. 89, N 10. — P. 385–387.

9. *Coxiella burnetii* in wild-caught filth flies / M.P. Nelder [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2008. — Vol.14, N 6. — P. 1002–1004.

10. Кособуцкий, Л.А. Некоторые данные о лихорадке Ку в Белоруссии / Л.А. Кособуцкий, М.М. Тимофеева // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 1958. — № 8. — С. 80–81.

11. Drancourt, M. Genus I. Coxiella / M. Drancourt, D. Raoult // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Eds.: D.J. Brenner [et al.]. — East Lansing, MI, USA, 2005: Springer-Verlag. — Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. — P. 237–241.

12. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen Coxiella burnetii / R. Seshadri [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — Vol. 100. — P. 5455–5460.

13. Heinzen, R.A. Developmental biology of Coxiella burnettii / R.A. Heinzen, T. Hackstadt, J.E. Samuel // Trends Microbiol. — 1999. — Vol. 7, N 4. — P. 149–154.

14. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control. Panel with Representatives from the Netherlands, France, Germany, United Kingdom, United States of America. Risk assessment on Q fever [Electronic resource] // ECDC Technical Report. — 2010. — 40 pp. — doi:10.2900/28860. — Mode of access: www.ecdc.europa.eu. — Date of access: 31.08.2011.

15. Токаревич, Н.К. Академик РАМН И.В. Тарасевич — руководитель разработки комбинированной инактивированной вакцины против Ку-лихорадки (коксиеллеза) / Н.К. Токаревич // Вестн. РАМН. — 2008. — № 7. — С. 19–24.

16. Comparative genomics reveal extensive transposonmediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus Coxiella / P.A. Beare [et al.] // Infect. Immun. — 2009. — Vol. 77. — P. 642–656.

17. *Coxiella burnetii* genotyping / O. Glazunova [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2005. — Vol. 11. — P. 1211–1217.

18. Q fever: epidemiology, diagnosis, and treatment / J.D. Hartzell [et al.] // Mayo Clin. Proc. — 2008. — Vol. 83, N 5. — P. 574–579.

19. Состояние здоровья населения в связи с влиянием микробиологического фактора среды обитания человека. Лихорадка Ку (Коксиеллез): санитарные правила и ветеринарные правила: утв. постановл. М-ва здравоохр. Респ. Беларусь и М-ва сельского хоз-ва и продов. Респ. Беларусь 31.12.2002 № 153/36.

20. Oyston, P.C.F. Q fever: the neglected biothreat agent / P.C.F. Oyston, C. Davies // J. Med. Microbiol. — 2011. — Vol. 60, Pt. 1. — P. 9–21.
21. Delsing, C.E. Q fever in the Netherlands from 2007 to 2010 / C.E. Delsing, B.J. Kullberg, C.P. Bleeker-Rovers // Neth. J. Med. — 2010. — Vol. 68, N 12. — P. 382–387.

Поступила 10.11.2011

EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE ON Q FEVER IN SEVERAL EUROPEAN COUNTRIES TODAY

Samoilova T.I., Ablova T.A., Petkevich A.S.

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

Q fever (or Coxiellosis) is a common worldwide infectious zoonosis in domestic and wild animals, birds and humans caused by obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii* with different mechanisms of transmission. A recent large outbreak in the Netherlands (2007-2010) caused serious concerns about the risks posed by Q fever for humans and animals in the European Union. As a result, the main evidence-based joint actions to stop outbreaks have developed by health authorities together with veterinary authorities required for implementation at the national and the local levels. The article gives a brief overview of these activities, taking into account the analysis of the significance of the disease in Belarus.

Keywords: Q fever, Coxiellosis, epidemiology, diagnosis, Europe.

О ВОЗНИКНОВЕНИИ И УГАСАНИИ СЛУЧАЕВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ЮЖНЫХ РЕГИОНОВ КЫРГЫЗСТАНА

Жолдошев С.Т., Тойчуев Р.М., Алдашева С.А.

Институт медицинских проблем, Противочумное отделение, Ош, Кыргызстан

Резюме. В работе приведены данные эпидемиологического анализа заболеваемости сибирской язвой на территории Кыргызской Республики за период 1990 по 2010 гг. Выявлены особенности многолетней динамики заболеваемости, проведен анализ эпидемической ситуации в стационарно неблагополучных по сибирской язве населенных пунктах.

Ключевые слова: сибирская язва, заболеваемость, динамика, эпидемиологический анализ, профилактика, Кыргызстан.

Введение. В настоящее время регистрируются случаи заболеваний сибирской язвой, и они часто связаны с тем, что сведения о местах захоронения животных, павших от сибирской язвы в прошлом, недостаточны, поэтому иногда происходит непосредственное инфицирование людей от почвы, особенно в условиях интенсивного антропогенного преобразования природы [1–3]. Территория Кыргызской Республики является стационарно неблагополучной по сибирской язве [4, 5]. Определяется это животноводческой ориентацией хозяйства, чему благоприятствуют природно-климатические условия.

Сибирская язва — протекающее остро инфекционное заболевание людей и животных, опасность которого обусловлена не только тяжестью клинического течения, но и возможностью формирования стойких почвенных очагов. Периодические проявления эпидемической активности местных почвенных очагов и возникновение заболеваний людей и животных вследствие заноса инфекции с других территорий требуют разных подходов в проведении противоэпидемических мероприятий [6, 7].

Целью работы явилось изучение особенностей эпидемического и эпизоотического процесса и совершенствования противоэпидемических мероприятий по сибирской язве.

Материалы и методы. Основой для настоящей работы служили отчетные данные Республиканского департамента Госсанэпиднадзора, Республиканского центра карантинных и особо опасных инфекций, Республиканского департамента государственной ветеринарии, противочумного отделения, южного регионального управления государственной ветеринарии Кыргызской Республике за 1990–2010 гг.

Результаты и обсуждение. Основным источником заражения человека сибирской язвой являются инфицированные больные, трупы погибших животных и объекты животного происхождения (внутренние органы, кровь, мясо и кости, шкуры и др.) во время убоя и вскрытия животных. Поддержанию заболеваемости сибирской язвой способствуют в основном природные сибиреязвенные почвенные очаги при высокой устойчивости в них споровых форм возбудителей.

Отмечен рост заболеваемости населения особенно в постсоветский период. За последние 20 лет в области выявлено 49 случаев эпизоотии сибирской язвы, в том числе 34 случая у крупного рогатого скота. Как установлено, в области постоянные очаги расположены в основном в зоне предгорий, а вспышки чаще зарегистрированы в зоне долин. Вспышки встречаются в основном среди крупного рогатого скота (КРС), хотя объем вакцинации животных нарастает, заболеваемость сохраняется. В Кыргызстане всего учтено 1237 сибиреязвенных очагов, из них найдено 58% и лишь 47,5% забетонировано. На территории Южного региона республики сконцентрировано более 53% учтенных сибиреязвенных очагов. В республике в течение 20 лет постсоветского периода зарегистрировано 347 случаев заболевания людей сибирской язвой с пределами колебания от 1 до 73 случаев с выраженной тенденцией к росту. Заболеваемость увеличилась более чем в 4,1 раза по сравнению с аналогичным 20-летним предшествующим периодом с приростом на 169 случаев. Отмечена выраженная приуроченность случаев заболевания к определенным территориям. Так, в последние годы более 92% случаев заражения сибирской язвой диагностированы на территории Южного региона. В 1997 г. — году максимального подъема заболеваемости — зарегистрировано 73 случая, или 24,4% всех учтенных случаев за 20-летний период наблюдения. Территориальная приуроченность случаев сибирской язвы проявляется формированием очагов инфекции в пределах районов области и микроочагов в последних. В 1997 г. в Ошской области очаги сибирской язвы диагностированы в 4 районах и в г. Ош в восьми существующих административных территориях. Всего зарегистрировано 62 случая сибирской язвы, из них в Араванском районе — 16, Каракульджинском и Карасуйском районах — по 12, Узгенском районе — 17 и в г. Ош — 4. В Араванском районе 16 случаев диагностированной сибирской язвы были выявлены в 2 населенных пунктах в 6 сформировавшихся микроочагах; в с. Ачи 5 случаев диагностированы в одном микроочаге, в с. Араван 11 были распределены в 5 микроочагах. В 6 микроочагах источником заражения был крупный рогатый скот, в одном — источник не установлен.

В Карасуйском районе 12 случаев сибирской язвы были диагностированы в 3 населенных пунктах; в с. Кашкар-Кишлак сформировано 4 микроочага, в 3 из которых источником заражения послужил крупный рогатый скот и в одном — лошадь (5 больных). В Каракульджинском районе 12 случаев сибирской язвы выявлены в 2 населенных пунктах — с. Тоготой и с. Октябрь. В первом из них сформировались 2 микроочага по 3 случая в каждом, а в с. Октябрь — 3 микроочага с 1, 2 и 3 больными. Источником заражения во всех случаях был вынужденно забитый КРС.

В Узгенском районе диагностировано 18 случаев сибирской язвы, выявленных в 4 населенных пунктах — с. Бозала, с. Октябрь, с. Чимбай и с. Кызылбайрак. В с. Бозалы 9 случаев сибирской язвы были выявлены в 2 микроочагах с 4 и 5 случаями, в с. Октябрь — 1 микроочаг с 5 случаями и в с. Чимбай — 1 очаг с 2 случаями. В этих очагах источником инфекции послужил КРС, в с. Кызылбайрам источником послужила инфицированная шкура вынужденно забитой коровы. В Жалалабадской области зарегистрировано 11 случаев в 2 районах (Ноокенский — 9 и Сузакский — 2), в Ноокенском в 2 микроочагах: г. Кочкората — 7 случаев и г. Кызылкия — 2 случая, источник инфекций — КРС. Основной причиной заболевания населения сибирской язвой послужил вынужденный забой больных сельскохозяйственных животных (КРС, лошадь) на территории индивидуальных домовладений без соблюдения санитарно-ветеринарных и противоэпидемических требований, что отразилось негативно на возрастной структуре заболевших. Приходиться констатировать заболеваемость сибирской язвой у 2 детей в возрасте 3 и 5 лет с опасной локализацией карбункула — на лице, и среди детей школьного возраста (8–14 лет) в 5 случаях, в 2 из которых сибиреязвенный карбункул обнаружен на лице. Наиболее высока была заболеваемость сибирской язвой среди лиц трудоспособных возрастных групп 20–29 лет (27,4%), 30–39 лет (27,4%), 40–49 лет (21,9%). Вовлечены в эпидемический процесс лица в возрасте 60 лет (1 случай) и старше 70 лет (3 случая). Среди больных сибирской язвой женщины составили 28,9%, среди заболевших наибольшая доля приходится на неработающих (более 40%), работников по уходу за животными (более 23%), учащихся (более 13%), встречаются спорадические случаи среди служащих, ветеринарных работников, арен-

даторов, пенсионеров. Диагностировалась сибирская язва у большинства больных по данным клиники и эпидемиологического анамнеза, у 21 больного (28,8%) диагноз подтвержден лабораторно выделением культур *Bac. anthracis*. Локализация сибиреязвенных карбункулов у больных во многом определялась характером контакта с инфицированным объектом, чаще всего определялась локализация на одной и обеих кистях рук (52 случая — 72,2%), из них получены при убое 38,3%, разделке туш — 9,6%, при контакте с мясом и внутренними органами — 17,8%, в процессе приготовления пищи (3 случая — 4,1%) и в 1 случае — при контакте и со шкурой, с положительным результатом на сибирскую язву в реакции Асколи. Довольно часто отмечена локализация карбункула в области предплечья — 10 (13,7%), из них при убое — 2, разделке туши — 5, при контакте с мясом и внутренними органами — 2 и в процессе приготовления пищи — 1. В 8 случаях карбункул был выявлен в области лица (13,7%), в том числе полученные при контакте с мясом — 3 случая, при разделке туш — 3, при приготовлении пищи — 2, при обработке внутренних органов — 1 и в одном случае источник не установлен. В одном случае сибиреязвенный карбункул формировался в области бедра (убой) и в одном случае на голени при невыясненном источнике. При эпидемиологическом расследовании случаев сибирской язвы в анализируемом материале установлены недостатки в работе ветеринарных работников; в 1997 г. ими учтено всего 9 случаев сибирской язвы среди животных, из них КРС — 8 и лошадь — 1, а по нашим данным в 27 случаях источником заражения был КРС, по одному случаю — лошадь и шкура коровы. Установлены недостатки в работе медицинских работников в части своевременного выявления и госпитализации больных в целях адекватного лечения. Диагноз ставился по мере их обращения за медицинской помощью. Учтены в первые 3 дня от начала заболевания 15 случаев (27,5%), на 4–5 день — 28 (38,4%), в отдельных случаях больные выявлялись позже 16–17 дней. Эти данные указывают на отсутствие должного активного надзора при сибирской язве. В то же время в основном больные госпитализированы в день постановки диагноза. Однако в отдельных случаях больные госпитализировались на 3–9 день.

Проведенный анализ позволил выявить, что в области отмечается прямая коррелятивная связь между вспышками сибирской язвы, плотностью населения, поголовьем скота, площадями, используемыми под пастбища (41% площадей Ошской области используется под пастбища). В области отмечается отрицательная корреляционная связь между числом вспышек заболеваемости сибирской язвой и среднегодовым количеством осадков. Подъем заболеваемости кожной формой сибирской язвы у животных возрастает при сочетании высокой температуры воздуха с минимальным количеством осадков и низкими показателями относительной влажности воздуха — в сухую погоду вероятность инфицирования спорами сибирской язвы в несколько раз выше.

Заключение. Таким образом, имеет место отчетливо выраженная неравномерность территориального распределения неблагополучных по сибирской язве пунктов и различие в их эпизоотологической и эпидемиологической активности на территории страны. Проведено районирование территории южных регионов Кыргызстана (в разрезе районов и областей) по степени риска заражения возбудителем сибирской язвы людей и восприимчивых животных.

Литература

1. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики / Г.Г. Онищенко [и др.]. — М., 1999. — 447 с.

2. Черкасский, Б.Л. Закономерность территориального распространения и проявление активности стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов / Б.Л. Черкасский // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 1999. — № 2. — С. 48–52.

3. Оценка потенциальной эпидемиологической значимости почвенных очагов сибирской язвы в зоне водохранилищ / Б.Л. Черкасский [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 1998. — № 1. — С. 13–17.

4. Сибирская язва в в Кыргызской Республике / Д.Ш. Гайбулин [и др.] // Материалы IV съезда гигиенистов, эпидемиологов, паразитологов и инфекционистов Кыргызской Республики. — Бишкек, 2002. — С. 151–155.

5. Бектурдиев, К.Б. Эпидемиология сибирской язвы в Кыргызской Республике / К.Б. Бектурдиев, В.С. Тойгонбаева, Т.Г. Самсонова // Здравоохранение Кыргызстана. — 2008. — № 1. — С. 23–24.

6. Утепбергенова, Г.А. Клинико-эпидемиологические проявления, рациональные подходы к диагностике и лечению синдрома первичного кожного аффекта: автореф. дис. …д-ра мед. наук. — Алматы, 2010. — 47 с.

7. Перспективы применение генотипирования *Bacillus anthracis* в эпидемиологическом анализе / О.И. Цыганкова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2006. — № 1. — С. 24–28.

Поступила 16.07.2011

THE ORIGIN AND EXTINCTION OF ANTHRAX CASES IN SOUTHERN REGIONS OF KYRGYZSTAN

Zholdoshev S.T., Toychuev R.M., Aldasheva S.A.

Institute of Medical Problems, Anti-Plague Department, Osh, Kyrgyzstan

The paper presents the epidemiological analysis of the anthrax morbidity in the territory of the Republic of Kyrgyzskoy between 1990 and 2010. The features of many years, the annual dynamics of morbidity for the period under review, as well as an analysis of permanently disadvantaged on anthrax points were revealed.

Keywords: anthrax, morbidity, dynamics, epidemiological analysis, prevention, Kyrgyzstan.

THE UK NATIONAL ME/CFS OBSERVATORY: THE BALANCE SHEET AFTER THREE YEARS

Pheby D.

Visiting Professor of Epidemiology, Buckinghamshire New University, Uxbridge Campus, 106, Oxford Road, Uxbridge, Middlesex, UB8 1NA, United Kingdom

Abstract. Three years research activity by the National ME/CFS Observatory, a consortium of three English universities, is described. The results of three projects of qualitative social research are reported, and three epidemiological research projects. There are two ongoing projects, a services database and a disease register, and the project has spawned two new infrastructure initiatives, a biobank, which will shortly commence operations, and a post mortem tissue archive, which is still at the stage of a research proposal. The Observatory has achieved its objectives of extending scientific knowledge of ME/CFS, and setting up infrastructure facilities to support a more coherent research strategy for the future.

Keywords: myalgic encephalomyelitis, chronic fatigue syndrome, observatory, United Kingdom.

Introduction. The UK National ME/CFS Observatory project has now completed three years of research, sponsored by the charity Action for ME, and funded by the Big Lottery Fund. It was established in order to fill gaps in scientific knowledge of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS), and also to create infrastructure facilities enabling a more coherent approach to research into ME/CFS in the future.

The research undertaken has been in the areas of epidemiology and qualitative social research. Four papers have been published in peer-reviewed scientific journals, and another paper has been accepted for publication. Several others are in preparation.

Qualitative Social Research. The qualitative social research was undertaken at the University of East Anglia. Two papers have been published. The first of these was a systematic review of the needs for support in managing illness and maintaining social inclusion expressed by people with ME/CFS [1]. Structured searches were carried out on Medline, AMED, CINAHL, EMBASE, ASSIA, CENTRAL, and other health, social and legal databases from inception to November 2007, to identify primary research and personal ('own') stories expressing the needs of people with ME/CFS. Study inclusion, data extraction and risk of bias were assessed independently in duplicate. Expressed needs were tabulated and a conceptual framework developed through an iterative process.

32 quantitative and qualitative studies, including the views of over 2500 people with ME/CFS with mainly moderate or severe illness severity, met the inclusion criteria. The major themes which emerged were the need:

to make sense of symptoms and gain diagnosis,
for respect and empathy from service providers,
for positive attitudes and support from family and friends,
for information on ME/CFS,
to adjust views and priorities,
to develop strategies to manage impairments and activity limitations, and
to develop strategies to maintain/regain social participation.

Although the studies were heterogeneous, there was consistent evidence that substantial support is needed to rebuild lives. Gaining support depends - most importantly - on the ability of providers of health and social care, colleagues, friends and relatives, and those providing educational and leisure services, to understand and respond to those needs.

The second qualitative research study [2] explored the nature of professional 'best practice' in working with people with ME/CFS. The views and experiences of health care practitioners (HCPs), who had been judged by people with ME/CFS themselves to have been particularly helpful and effective, were sought. Qualitative semi-structured interviews following a topic guide were carried out with six health care practitioners. Interviews were audiorecorded, transcribed and subject to thematic analysis. Five main themes were developed:

Diagnosis,

Professional perspectives on living with ME/CFS,

Interventions for treatment and management,

Professional values and support for people with ME/CFS and their families, and

Health professional roles and working practices.

Key findings related to the diagnostic process, especially the degree of uncertainty which may be shared by primary care physicians and patients alike, the continued denial in some quarters of the existence of ME/CFS as a condition, the variability, complexity, and serious impact of the condition on life and living, the onus on the person with ME/CFS to manage their condition, supported by HCPs, the wealth of often conflicting and confusing information on the condition and options for treatment, and the vital role of extended listening and trustful relationships with patients. The study concluded that, while professional frustrations were clearly expressed about the variability of services both in primary and specialist care and continuing equivocal attitudes to ME/CFS as a condition, there were also strong positive messages for people with ME/CFS where the right services are in place. Many of the findings from these practitioners, which were seen by their patients as helping them more effectively, accord with the existing literature in identifying the particular importance of listening skills, respect and trust in establishing a therapeutic relationship which recognises key features of the patient trajectory and promotes effective person-centred management of this complex condition. These findings indicate the need to build such skills and knowledge more systematically into professional training informed by the experience of specialist services and those living with the condition.

Services Database. The need identified in the preceding study for the right services to be in place was also addressed by a third study within the field of social research. This used a snowballing technique to identify the range of services of all types available to people with ME/CFS in localities throughout England. The aim was to increase access to existing services for adults with ME/CFS in England through production of an open-access database for people with ME/CFS, their carers, and health and social care professionals. Information was obtained on existing health, social care, legal, financial and educational services for adults with ME/CFS, and this was supplemented by an internet search. The resulting database consisted of 324 entries, of which 102 are about NHS services, 107 support groups (for people with ME/CFS and/or their carers), 61 other voluntary or charitable organisations, and 71 private companies (some entries offer aspects of several categories). The database, which is searchable by county and service type, is currently maintained by Action for ME, and can be accessed at www.afme.org.uk/.

As well as increasing access to services for adults with ME/CFS, the database is also a research tool, enabling patterns of service provision to be identified, as well as gaps in services. For example, the NHS entries enable an overall assessment of the pattern of NHS services. 43% of NHS services offered cognitive behavioural therapy and 31% graded exercise therapy, while 85% offered a mixed programme of several therapies. An area that requires more attention is the provision of domiciliary (home-based) diagnosis, management and reassessment, with fewer than 30% offering domiciliary options.

Epidemiology. The epidemiological studies involved all three participating centres, viz. the London School of Hygiene and Tropical Medicine, the University of East Anglia, and the University of Hull. A descriptive epidemiological study estimated the prevalence and incidence of ME/CFS in a sample of 143,000 individuals aged 18 to 64 years [3] . Case ascertainment involved: i) electronic search for chronic fatigue cases; ii) direct questioning of general practitioners (GPs) on cases not previously identified by the search; iii) clinical review of identified cases according to CDC-1994 [4], Canadian [5] and Epidemiological Case (ECD) Definitions [6]. Clinical presentation, prevalence and incidence were studied. Our estimated mini-

mum prevalence rate of ME/CFS was 0.2% for cases meeting any of the study case definitions. The prevalence of cases conforming to the CDC-1994 definition was 0.19%, and 0.11% for the Canadian definition. The ECD identified a prevalence of only 0.03%, so we were unable to validate it for use in epidemiological research. The overall estimated minimal yearly incidence was 0.015%. The highest rates were found in London and the lowest in East Yorkshire.

All cases conforming to the Canadian criteria also met the CDC-1994 criteria but tended to manifest greater symptom severity than CDC-1994-positive cases who did not meet the Canadian criteria. The number of people with chronic fatigue who do not meet specific criteria for ME/CFS is higher still. Both groups have high levels of need for service provision, including health and social care. We suggest the use of both the CDC-1994 and Canadian criteria for ascertainment of ME/CFS cases, enabling advantage to be taken of the sensitivity of the former and the specificity of the latter. Careful clinical phenotyping of study participants should also be carried out. This combination if used systematically will enable international comparisons, minimisation of bias, and the identification and investigation of distinct sub-groups of patients with possibly distinct aetiologies and pathophysiologies, standing a better chance of translation into effective specific treatments.

An analytical epidemiological study aimed to investigate the functional status and well being of people with ME/CFS and their lay carers, and to compare them with people with other chronic conditions. We used a cross sectional design to study 170 people aged between 18 and 64 years with well characterized ME/CFS, and 44 carers, using SF-36 v2. Mean physical and mental domains scores (scales and component summaries) were calculated and compared internally and externally with reference standards for the general population and for population groups with 10 chronic diseases.

All scores were in general lower than those for on groups with 10 chronic diseases. We found that SF-36 scores in people with ME/CFS were significantly reduced, especially within the physical domain (mean norm-based Physical Component Summary (PCS) score = 26.8), but also within the mental domain (mean norm-based score for Mental Component Summary (MCS) = 34.1). The lowest and highest scale scores were for "Role-Physical" (mean = 25.4) and "Mental Health" (mean = 36.7) respectively. All scores were in general lower than those for the general population and disease-specific norms for other diseases. Carers of those with ME/CFS tended to have low scores in relation to population norms, particularly within the mental domain (mean = 45.4). We concluded that ME/CFS is disabling, and has a greater impact on functional status and well being than other chronic diseases such as cancer. The emotional burden of ME/CFS is felt by lay carers as well as by people with ME/CFS. We suggest the use of generic instruments such as SF-36, in combination of other objective outcome measurements, to describe patients and assess treatments.

Disease Register. The main infrastructure outcome of the National ME/CFS Observatory project was the establishment of a Disease Register for ME/CFS [8]. While not aiming for comprehensive population coverage, this pilot register sought to recruit participants with ME/CFS in an unbiased way from a large population base. Those recruited are constituting a cohort for long-term follow-up to shed light on prognosis, and a sampling frame for other studies, enabling for example intervention studies to be carried out on groups of people with ME/CFS who are representative of the ME/CFS population, and thus produce results applicable to the whole ME/CFS population or particular subgroups of interest within it.

Potential subjects were identified in the same population base as that used for the descriptive epidemiological study outlined above. Patients with unidentified chronic fatigue were identified in GP databases using a READ-code based algorithm, and conformity to certain case definitions for ME/CFS determined. 510 patients with unexplained chronic fatigue were identified. 265 of these conformed to one or more case definitions. 216 were invited to join the register; 160 agreed. 96.9% of participants conformed to the CDC 1994 (Fukuda) definition. As before, the Canadian definition defined more precisely a subset of these. Conformity to case definitions was similar to that outlined above in respect of the descriptive epidemiological study. One-year follow-up of 50 disease register subjects showed little change in pain or fatigue scores. There were some changes in conformity to case definitions.

New Infrastructure Resources. Our experience of the Disease Register led us to consider what additional infrastructure resources might be useful in enhancing the scope and quality of ME/CFS research. We concluded that two additional facilities, both of which could be linked to the Disease Register, would be of benefit. These were a biobank, storing blood samples, and a post mortem tissue archive. Participants in the Disease Register could be asked to contribute blood samples upon recruitment, and also to make an advance declaration of willingness to donate neurological and other tissues for research after death.

A pilot study of the biobank is about to begin, funded by Action for ME, the ME Association, and ME Research UK. This will be based at the London School of Hygiene and Tropical Medicine, and use existing biobanking facilities at University College London.

A study was undertaken to ascertain the feasibility of developing a national post-mortem ME/CFS tissue bank in the UK, in order to enhance studies on aetiology and pathogenesis, including cell and tissue abnormalities associated with the condition [9]. This study combined various qualitative methods, ie, key informant interviews, focus group discussions with people with ME/CFS, and a workshop with experts in ME/CFS or in tissue banking. The results suggested that the establishment of the post-mortem ME/CFS tissue bank would be both desirable and feasible, as well as acceptable to the possible tissue donors, provided that certain issues, technical, ethical and legal, were explicitly addressed. It would, of course, take many years for a sufficient number of post mortem specimens from people with ME/CFS to be obtained in the UK for this to be a useful resource for research. This project would therefore be much more realistically pursued at a European level.

Conclusion. As a result of the Observatory project, there have been marked changes in the ME/CFS research environment in the UK. We are in the process of establishing the infrastructure facilities that we have identified as being a necessary prerequisite to the development of a coherent corpus of scientific knowledge of ME/CFS. The Medical Research Council has also begun to take ME/CFS seriously, having convened an Expert Group to develop research strategy, and having also published a call for research proposals in this area, together with the funds to support this. We have also completed important research which fills gaps in our knowledge. The National ME/CFS Observatory remains in being as a community of scientific interest, and will continue to undertake work in this area.

References

1. The expressed needs of people with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: a systematic review / M. Drachler [et al.] // BMC Public Health. — 2009. — Vol. 9. — P. 458–472.

2. Chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (ME/CFS) in adults: a qualitative study of perspectives from professional practice / S.M.C. Horton [et al.] // BMC Family Pract. — 2010. — Vol. 10. — P. 89–91.

3. Prevalence and incidence of myalgic encephalomyelitis/ chronic fatigue syndrome (ME/CFS) in three regions of England: a repeated cross-sectional study in primary care / L.C. Nacul [et al.] // BMC Med. — Vol. 9, N 1. — P. 91. — doi:10.1186/1741-7015-9-91.

4. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study / K. Fukuda [et al.] // Ann. Intern. Med. — 1994. — Vol. 121, N 12. — P. 953–959.

5. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: clinical working case definition, diagnostic and treatment protocols / B.C. Carruthers [et al.] // J. Chronic Fatigue Syndrome. — 2003. — Vol. 11, N 1. — P. 7–36.

6. The development of an epidemiological definition for myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome / T. Osoba [et al.] // J. Chronic Fatigue Syndrome. — 2007. — Vol. 14, N 4. — P. 61–84.

7. The functional status and well being of people with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and their carers / L.C. Nacul [et al.] // BMC Public Health. — 2011. — Vol. 11. — P. 402–412.

8. A disease Register for ME/CFS: report of a pilot study / D. Pheby [et al.] // BMC Res. Notes. — 2011. — Vol. 4. — P. 139–146.

9. Exploring the feasibility of establishing a disease specific post-mortem tissue bank in the UK — a case study in ME/CFS / E.M. Lacerda [et al.] // J. Clin. Pathol. — 2010. — Vol. 63. — P. 1032–1034.

Поступила 25.07.2011

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР НАДЗОРА ЗА МИАЛГИЧЕСКИМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТОМ/СИНДРОМОМ ХРОНИЧЕСКОЙ УСТАЛОСТИ: ИТОГ ПО ИСТЕЧЕНИИ ТРЕХ ЛЕТ

Д. Феби

Бакингемширский новый университет, Миддлсекс, Великобритания

Резюме. Описывается итог деятельности по истечении трех лет научно-исследовательского Национального центра надзора за миалгическим энцефаломиелитом/синдромом хронической усталости (МЭ/СХУ), состоящего из консорциума трех английских университетов. Приведены результаты трех проектов по исследованию социального качества и трех проектов по эпидемиологическим исследованиям. Осуществляются два текущих проекта по предоставлению услуг базы данных и регистра заболеваний, а также возникли две новые инициативные инфраструктуры — биобанк, который вскоре начнет осуществлять свою деятельность, и архив образцов тканей от умерших больных, который пока находится на стадии исследовательского предложения. Национальный центр достиг

своей цели по расширению научных знаний о МЭ/СХУ, а также созданию инфраструктуры, обеспечивающей поддержку более согласованной исследовательской стратегии на будущее.

Ключевые слова: миалгический энцефаломиелит, синдромом хронической усталости, эпидемиологический надзор, Великобритания.

ДЕМЕНЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ

Капитулец С.П.[1], Докукина Т.В.[2], Недзьведь М.К.[3], Шилов Г.Н.[2], Махров М.В.[2], Матвейчук И.В.[2]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;
[2]РНПЦ психического здоровья;
[3]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Резюме. В работе проведен ретроспективный анализ архивного материала и текущей заболеваемости деменциями разного генеза в Республике Беларусь за 2004–2010 гг. Установлено госпитализаций по поводу F00 МКБ-10 (болезнь Альцгеймера — БА) — 1105, F01 (сосудистая деменция — СД) — 3575, F02.1 (болезнь Крейтцфельдта-Якоба — БКЯ) — 0. Отношение числа установленных диагнозов деменций альцгеймеровского и сосудистого типов было приблизительно одинаковым как среди госпитализированных (F00:F01 = 1:3,2), так и среди умерших (F00:F01 = 1:3,6). Показано, что пожилой возраст является главным фактором риска развития деменции: на каждые десять лет после 60-летнего возраста показатель риска смерти от БА и СД увеличивается примерно в 2–3 раза, возрастая с 13 и 31 случая в возрастной группе 60–69 лет до 33 и 170 случаев после 80 лет соответственно. Отмечены половые различия в заболеваемости деменциями — женщины чаще страдают от БА после 60-летнего возраста и СД, в особенности после 80 лет.

Ключевые слова: деменция, болезнь Альцгеймера, сосудистая деменция, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, ретроспективный анализ.

Введение. Накопление амилоида и амилоидоподобных фибрилл в центральной нервной системе является основным патоморфологическим признаком многочисленных разновидностей дементных состояний человека, так называемых «конформационных» болезней, связанных с нарушением свертывания белка. С молекулярных позиций патологическое изменение конформации белка(ов) как основной фактор риска приводит к избыточному накоплению амилоидных структур в тканях мозга еще до наступления симптомов [1]. Конформационно-измененные белки, объединяясь между собой, образуют в итоге амилоидные бляшки и нейрофибриллярные клубки вне и внутри нервных клеток [2]. Как правило, это вызывает дезинтеграцию и коллапс транспортной системы нейрона [3], приводя сначала к нарушению биохимической передачи сигналов между клетками, а затем и к гибели самих клеток [4].

В настоящее время к группе конформационных заболеваний относят более 40 разновидностей дементных состояний человека, наиболее известными из которых являются болезнь Альцгеймера (БА), сосудистые деменции (СД) и трансмиссивные губкообразные энцефалопатии, в частности — болезнь Крейтцфельдта-Якоба (БКЯ) [5]. В целом, это медленно прогрессирующие нейродегенеративные заболевания, чаще возникающие у людей старше 65 лет [5, 6]. Они характеризуются ослаблением интеллектуальных способностей человека, эмоциональным обеднением его поведения, затруднением использования прошлого опыта, неизбежным фатальным исходом и представляют собой синдром, к которому может приводить целый ряд различных по этиологии и патогенезу заболеваний головного мозга (наследственные, инфекционные, ятрогенные).

Для всех типов деменции заболеваемость в мире находится на уровне 10–15 новых случаев на 1000 населения, из которых на долю БА приходится 5–8 случаев, что составляет приблизительно половину от общего числа ежегодных диагнозов [7, 8]. Общемировая заболеваемость БА в 2006 г. оценивалась в 26,6 млн. человек, а к 2050 г. число больных может вырасти вчетверо [9]. Заболеваемость БКЯ отмечается значительно реже: в среднем 1 случай на 1 млн. населения, или приблизительно 1,5 тысячи заболеваний в год [5].

В настоящее время достоверная статистика по заболеваемости и распространенности дементных состояний различного генеза в Республике Беларусь отсутствует. Национальный регистр

по нейродегенеративным заболеваниям не создан. Эпидемиологические исследования в последние два десятилетия не проводились. Косвенными показателями заболеваемости и распространенности дементных состояний в республике могут служить данные РНПЦ психического здоровья о госпитализациях за 2004–2010 гг. с диагнозами F00 МКБ-10 и F01 МКБ-10 и результаты совместных исследований РНПЦ эпидемиологии и микробиологии и Белорусского государственного медицинского университета за 1980–2010 гг. по выявлению больных БКЯ (F02.1 МКБ-10).

Цель и задачи исследования. Провести ретроспективный анализ архивного материала и текущей заболеваемости населения Республики Беларусь с деменциями различного генеза (по данным РНПЦ эпидемиологии и микробиологии и РНПЦ психического здоровья).

Материалы и методы. Работу с архивными материалами проводили с использованием электронных баз данных Республиканской клинической психиатрической больницы (2004–2009 гг.), РНПЦ психического здоровья (2009–2010 гг.) и РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (1980–2010 гг.). Клинический диагноз БА и СД ставили на основании истории пациента (анамнеза жизни), истории его родственников и клинических наблюдений (наследственный анамнез), при этом учитывались характерные неврологические и нейропсихологические признаки и исключались альтернативные диагнозы. Для верификации заболеваний и дифференциальной диагностики от других разновидностей деменции использовали сложные методы медицинской визуализации — электроэнцефалографию, компьютерную томографию и магнитно-резонансную томографию. Диагноз БКЯ подтверждали посмертно при гистологическом и биохимическом анализе тканей мозга.

Основные результаты и обсуждение. В РНПЦ эпидемиологии и микробиологии с 1980 г. клинико-морфологическими и гистологическими исследованиями ткани мозга посмертно было выявлено 22 случая болезни Крейцфельда-Якоба (F02.1 МКБ-10), из них у 12 диагноз был подтвержден лабораторно (таблица 1).

Таблица 1 — Клинические формы БКЯ (по данным РНПЦ эпидемиологии и микробиологии за 1980–2010 гг.)

Диагноз по МКБ-10	Клинический диагноз	Количество больных, абс. число / %
F02.1-	Деменция при болезни Крейтцфельда-Якоба (А81.0)	
	Прогрессирующая деменция (преимущественно кортикальная)	10 / 45,5
	Панэнцефалитическая (преимущественно экстрапирамидная)	5 / 22,7
	Мозжечковая (атактическая)	5 / 22,7
	Амиотрофическая	2 / 9,1
Всего		22

В последние годы дополнительно сообщено о 20 новых спорадических случаях БКЯ, верифицированных на основании патоморфологических исследований ткани ЦНС (данные представлены д.м.н., проф. М.К. Недзведем).

Ретроспективный анализ данных РНПЦ психического здоровья за 2004–2010 гг. показал, что госпитализаций по поводу F00 МКБ-10 (болезнь Альцгеймера) и F01 МКБ-10 (сосудистая деменция) было 4680, причем деменции альцгеймеровского типа составили 1105 случаев (23,6%), сосудистые деменции — 3575 случаев (76,4%). Случаев госпитализаций с диагнозом F02.1 МКБ-10 (болезнь Крейтцфельда-Якоба) в течение указанного периода не выявлено (таблица 2).

Таблица 2 — Количество госпитализаций пациентов с деменциями разного генеза (по данным РНПЦ психического здоровья за 2004-2010 гг.)

Диагноз по МКБ-10	Клинический диагноз	Количество пациентов, абс.ч / %
1	2	3
F00.-	Деменция при болезни Альцгеймера (G30.-)	
F00.0	Деменция при болезни Альцгеймера с ранним началом (G30.0)	242 / 21,9
F00.1	Деменция при болезни Альцгеймера с поздним началом (G30.1)	583 / 52,8
F00.2	Деменция при болезни Альцгеймера, атипичная или смешанного типа (G30.8)	256 / 23,2
F00.9	Деменция при болезни Альцгеймера неуточненная (G30.9)	24 / 2,1
Всего		1105

Продолжение табл. 2

1	2	3
F01.-	Сосудистая деменция	
F01.0	Сосудистая деменция с острым началом	447 / 12,5
F01.1	Мультиинфарктная деменция	1389 / 38,9
F01.2	Подкорковая сосудистая деменция	158 / 4,4
F01.3	Смешанная корковая и подкорковая сосудистая деменция	1399 / 39,1
F01.8	Другая сосудистая деменция	128 / 3,6
F01.9	Сосудистая деменция неуточненная	54 / 1,5
Всего		3575
F02.1-	Деменция при болезни Крейтцфельда-Якоба (A81.0)	0
Всего		0

Среди деменций альцгеймеровского типа наиболее часто ставился диагноз F00.1 (деменция при болезни Альцгеймера с поздним началом) — 583 пациента (52,8%), F00.2 (деменция при болезни Альцгеймера атипичная или смешанного типа) — 256 (23,2%) и F00.0 (деменция при болезни Альцгеймера с ранним началом) — 242 (21,9%).

В нозологической структуре деменций сосудистого типа преобладали диагноз F01.3 (смешанная корковая и подкорковая деменция) — 1399 пациентов (39,1%) и F01.1 (мультиинфарктная деменция) — 1389 (38,9%), остальные формы встречались реже: F01.0 (сосудистая деменция с острым началом) — 447 (12.5%), F01.0 (подкорковая сосудистая деменция) — 158 (4,4%), F01.8 и F01.9 (другая сосудистая деменция и неуточненная) — 128 (3,6%) и 54 (1,5%) соответственно.

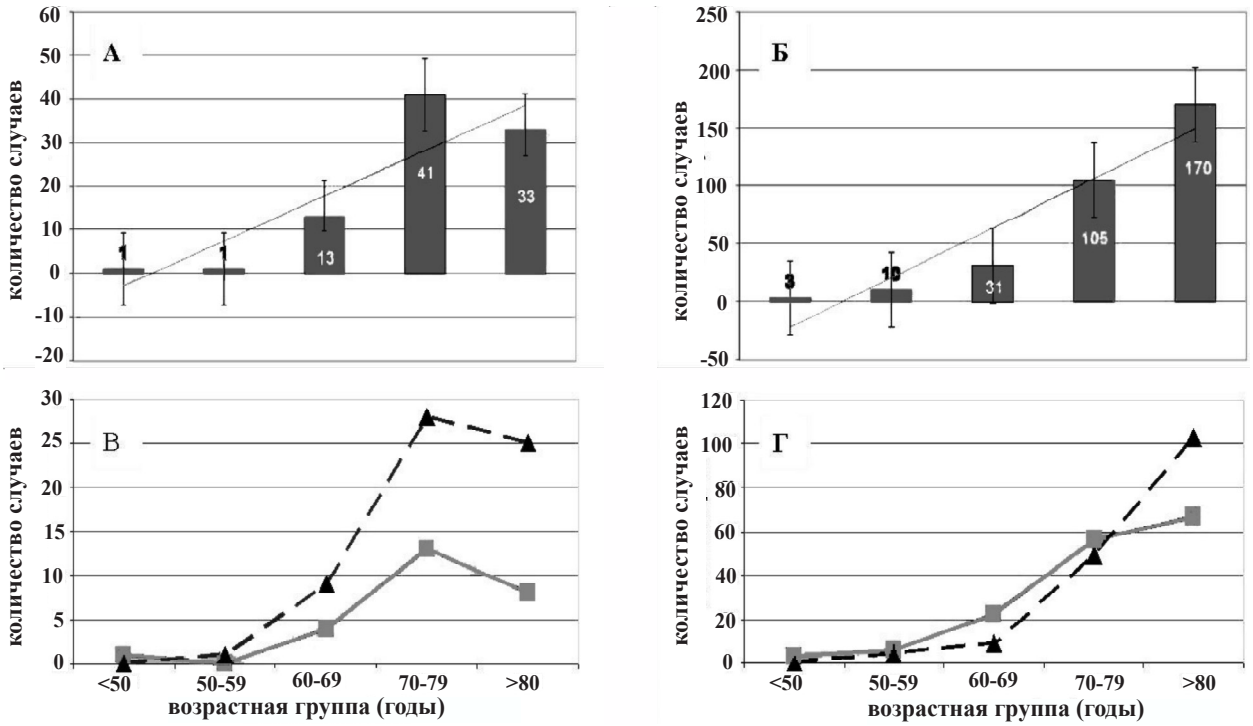
За наблюдаемый период было проанализировано 408 медицинских карт пациентов, находившихся на лечении и впоследствии умерших в стационаре, с диагнозами раздела F00 МКБ-10 (деменции альцгеймеровского типа) — 89 пациентов, и с диагнозами раздела F01 МКБ-10 (сосудистые деменции) — 319 медицинских карт.

Динамика убыли пациентов с деменциями разного генеза представлена на рисунке 1.

* — данные за 6 мес.

Рисунок 1 — Динамика убыли пациентов с диагнозами F00 МКБ-10 (болезнь Альцгеймера) и F01 МКБ-10 (сосудистая деменция) за 2004–2011 гг. (по данным РНПЦ психического здоровья)

При этом деменция при болезни Альцгеймера с ранним началом (F00.0) установлена в 11 случаях, деменция при болезни Альцгеймера с поздним началом (F00.1) — в 52 случаях, деменция при болезни Альцгеймера атипичная или смешанного типа (F00.2) — в 22 случаях, деменция при болезни Альцгеймера неуточненная (F00.9) — в 4 случаях. В возрасте до 60 лет смерть наступила у 2 пациентов, 60–70 лет — у 13, 70–80 лет — у 41, 80 лет и более — у 33. Мужчин было 26, женщин — 63 (рисунок 2, А и В).



А, В — болезнь Альцгеймера, Б, Г — сосудистая деменция. Показана линия тренда с отображением планок погрешностей для выделенного ряда диаграммы с использованием стандартных ошибок; ■ — мужчины, ▲ — женщины

Рисунок 2 — Возрастная и половая характеристики убыли пациентов с диагнозами F00 МКБ-10 (болезнь Альцгеймера) и F01 МКБ-10 (сосудистая деменция) за 2004–2011 гг. (по данным РНПЦ психического здоровья)

Сосудистая деменция (F01) установлена у 319 умерших в стационаре. Случаев смерти при сосудистой деменции с острым началом (F01.0) отмечено 39, мультиинфарктной деменции (F01.1) — 118, подкорковой сосудистой деменции (F01.2) — 23, смешанной корковой и подкорковой сосудистой деменции (F01.3) — 131, другой сосудистой деменции (F01.8) и сосудистой деменции неуточненной (F01.9) — 6 и 2 случая соответственно. Мужчин было 154, женщин — 165. В возрасте до 60 лет смерть наступила у 13 пациентов, 60–70 лет — у 31, 70–80 лет — у 105, 80 лет и более — у 170 (рисунок 2, Б и Г).

Соотношение числа установленных диагнозов деменций альцгеймеровского и сосудистого типов было приблизительно одинаковым как среди госпитализированных (F00:F01 = 1:3,2), так и среди умерших (F00:F01 = 1:3,6).

Деменции, как правило, обуславливают синдром хронического или прогрессирующего характера, при котором имеются нарушения высших корковых функций, включая память, мышление, ориентировку, понимание, счет, способность к обучению, язык и суждения. В настоящее время накопленные данные по заболеваемости и частоте распространенности дементных состояний различного генеза среди разных возрастных групп в Республике Беларусь неполные, отличаются от показателей общей мировой статистики в сторону преобладания доли сосудистых деменций. Приведенные выше соотношения по числу умерших и по числу пролеченных в стационаре резко отличаются от показателей в Европе, где на долю альцгеймеровских деменций приходится не менее 50% [6–9].

Опыт комплексных исследований зарубежных исследователей [7, 8] дает основание полагать, что как деменции альцгеймеровского типа (F00.0-), так и сосудистые деменции (F01.0-) и деменции при болезни Крейтцфельда-Якоба (F02.1-), а также деменции при других болезнях, классифицированных в других рубриках МКБ-10, не рассмотренные в данной работе (например, F02.0* — деменция при болезни Пика (G31.0), F02.2* — деменция при болезни Гентингтона (G10), F02.3* — деменция при болезни Паркинсона (G20) и др.), должны выявляться в Республике Беларусь значительно чаще. Не исключена также возможность выявления т.н. «инфекционных» форм дементных состояний.

Связано это, в первую очередь, с тем, что пациенты с деменцией могут наблюдаться как у невролога, так и психиатра, либо у обоих специалистов параллельно. С другой стороны, дифференциальная диагностика дементных состояний до сих пор вызывает затруднения, поскольку клиническая картина зачастую носит смешанный характер.

Выводы:

1. Пожилой возраст является главным фактором риска развития деменции, что отражается в статистике: на каждые десять лет после 60-летнего возраста показатель риска смерти от БА и СД увеличивается примерно в 2–3 раза, возрастая с 13 и 31 случая в возрастной группе 60–69 лет до 33 и 170 случаев после 80 лет соответственно. Существуют и половые различия — женщины чаще страдают от болезни Альцгеймера после 60 лет и сосудистой деменцией, в особенности после 80 лет;

2. Выяснение истинной картины по заболеваемости и распространенности дементных состояний в Беларуси, установление особенностей их этиопатогенеза, возможно более ранняя лабораторная и дифференциальная диагностика актуальны для практического здравоохранения страны, поскольку определяют методику лечения, фармакологические препараты, способы профилактики, реабилитации и многие другие социально-значимые аспекты.

Литература

1. Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein / T. Polvikoski [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1995. — Vol. 333, N 19. — P. 1242–1247.

2. Goedert, M. Tau proteins and neurofibrillary degeneration / M. Goedert, M.G. Spillantini, R.A. Crowther // Brain Pathol. — 1991. — Vol. 1, N 4. — P. 279–286.

3. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies / K. Iqbal [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. — 2005. — Vol. 1739, N 2–3. — P. 198–210.

4. Chun, W. The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death / W. Chun, G.V. Johnson // Front. Biosci. — 2007. — Vol. 12. — P. 733–756.

5. Prusiner, S.B. Shattuck lecture — Neurodegenerative diseases and prions / S.B. Prusiner // N. Engl. J. Med. — 2001. — Vol. 344, N 20. — P. 1516–1526.

6. Brookmeyer, R. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset / R. Brookmeyer, S. Gray, C. Kawas // Am. J. Public Health. — 1998. — Vol. 88, N 9. — P. 1337–1342.

7. Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain / F. Bermejo-Pareja [et al.] // J. Neurol. Sci. — 2008. — Vol. 264, N 1–2. — P. 63–72.

8. Incidence of dementia, Alzheimer's disease, and vascular dementia in Italy. The ILSA Study / A. Di Carlo [et al.] // J. Am. Geriatr. Soc. — 2002. — Vol. 50, N 1. — P. 41–48.

9. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease / R. Brookmeyer [et al.] // Alzheimer's and Dementia. — 2007. — Vol. 3, N 3 — P. 186–191.

Поступила 15.08.2011

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF DEMENTIA IN BELARUS

Kapitulets S.P.[1], Dokukina T.V.[2], Nedzvedz M.K.[3], Shilov G.N.[2], Mahrov M.V.[2], Matveichuk I.V.[2]

[1]Republican Research &Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Republican Research & Practical Center of Mental Health;
[3]Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The paper is devoted to retrospective analysis of various type of dementia in Belarus for 2004-2010: Alzheimer's disease (AD) – 1105 cases, vascular dementia (VD) – 3575, Creutzfeldt-Jacob disease (CJD) – 0. The number ratio of the established AD and VD diagnoses was approximately identical among both hospitalized (1:3,2) and died (1:3,6) patients. It was shown, that advanced age was a primary risk factor of dementia development: after 60 years old the parameter of death risk from AD and VD increased for each ten years approximately 2-3 times. Sexual distinctions in development of dementia were noted: women suffer from AD after 60 years old and from VD after 80 years old.

Keywords: dementia, Alzheimer's disease, vascular dementia, Creutzfeldt-Jakob disease, retrospective analysis.

АНАЛИЗ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО БОЛЕЗНИ АУЕСКИ СВИНЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Ероховец Н.Ф.

Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского, Минск, Беларусь

Резюме. Статья посвящена анализу эпизоотической ситуации по болезни Ауески свиней в Республике Беларусь. Проведен выборочный мониторинг свинокомплексов четырех областей, являющихся благополучными по болезни Ауески свиней, где вакцинация против этого заболевания не проводится. Установлено, что из 16 обследованных хозяйств в 6 заболевание протекает в латентной форме.

Ключевые слова: болезнь Ауески, свиньи, эпизоотическая ситуация, Беларусь.

Введение. В настоящее время болезнь Ауески наносит значительный ущерб странам с развитым свиноводством. По данным Международного эпизоотического бюро (МЭБ) [1], за период с 1967 по 2010 гг. это заболевание регистрировали в 75 странах Европы, Азии, Латинской Америки. Оно встречается на всех континентах кроме Австралии. В течение этого периода постоянно продолжается процесс оздоровления стран и возникновения инфекции в новых странах. Тем не менее отмечена тенденция к уменьшению напряженности эпизоотической ситуации в мире [2–4].

Аналогичная ситуация наблюдается и в нашей республике, однако оценить реальную эпизоотию болезни Ауески свиней на территории нашей страны практически невозможно. Причин этому несколько: это и широкомасштабное проведение иммунизаций немаркированными вакцинами, и отсутствие проведения целенаправленного мониторинга в свиноводческих хозяйствах и в дикой фауне, и применение в ветеринарных лабораториях ограниченного числа методов диагностирования.

На протяжении последних лет регистрируют ежегодно по одному неблагополучному пункту по болезни Ауески свиней, что связано в первую очередь, с отсутствием ярко выраженных характерных клинических признаков у свиней. Все чаще наблюдают хроническое и латентное течение болезни, что характерно для этого вируса [5, 6].

Если провести анализ статистических данных развития эпизоотической ситуации по болезни Ауески (таблица 1), то явно просматривается, что пик стадии подъема эпизоотии приходится на период 1950–1955 гг., и затем идет плавная стадия угасания эпизоотического процесса. И в последующие периоды вплоть до настоящего никогда не наблюдалось устойчивого подъема эпизоотического процесса при относительном равновесии в обозначенных пятилетних периодах, что свидетельствовало об эффективности принимаемых противоэпизоотических мероприятий.

Таблица 1 — Некоторые показатели эпизоотической ситуации болезни Ауески свиней в Республике Беларусь

Периоды времени, годы	Ежегодно выявлялось неблагополучных пунктов (М)	Ежегодно выявлялось клинически больных свиней (М)	Вакцинировано, тыс. особей
1950–1955	308 ± 80	2534	—
1955–1960	148 ± 30	1866	—
1960–1965	78 ± 30	2439	302,0
1965–1970	52 ± 15	1881	234,0
1970–1975	39 ± 22	2286	1344,9
1975–1980	11 ± 4	119	2410,1
1980–1985	6 ± 1	170	2568,8
1985–1990	3 ± 1	161	2477,0
1990–1995	4 ± 1	132	941,8
1995–2000	3	—	865,1
2000–2005	3	—	1785,0
2005–2010	1	—	790,0

Основными мерами борьбы с указанной эпизоотией в 1950–1960 гг. были общие ветеринарно-санитарные, направленные на выявление больных животных, их изоляцию и убой с последующей дезинфекцией животноводческих помещений. Статистические данные показывают на значительное уменьшение ареала эпизоотии в этот отрезок времени. Но по тем же данным видно, что в 1960–1970 гг. комплекс организационно-хозяйственных и ветеринарно-санитарных мероприятий в борьбе

с болезнью Ауески свиней оказался недостаточным. В этот период не удавалось купировать эпизоотию в местах ее возникновения. Ветеринарная организация республики по рекомендациям БелНИВИ и с его участием включили в комплекс противоэпизоотических мероприятий специфические меры профилактики — сухую вирусвакцину ГНКИ против болезни Ауески свиней. Первоначально (1960–1965 гг.) указанная вакцина применялась для вакцинации условно здорового поголовья в неблагополучных очагах. В последующие сроки (1975–1985 гг.) вакцина применялась для предупреждения распространения эпизоотии, т.е. вакцинировалось здоровое поголовье благополучных хозяйств.

К сожалению, принимаемые меры оказались недостаточными для искоренения этой инфекции. У переболевших свиней болезнь Ауески переходит в латентную форму, при которой вирус может пожизненно персистировать в организме животных, кроме этого резервуаром инфекции остаются дикие кабаны, поэтому болезнь продолжает оставаться одной из серьезных проблем во многих странах мира, в том числе и на территории нашего государства.

По данным результатов исследований, проведенных в ветеринарных лабораториях страны, за 2010 г. исследовано 1792 пробы сыворотки крови от свиней на наличие антител к данному заболеванию, при этом выявлено 19,5% положительных проб. Кроме этого, исследовано 60 материалов от павших и больных животных методом постановки биопробы на кроликах. Был выявлен 1 положительный случай в одном из свиноводческих хозяйств Дрогичинского района Брестской области.

Целью нашего исследования являлось выборочное обследование свиноводческих хозяйств на наличие антител у животных группы откорма к вирусу болезни Ауески для прогнозирования эпизоотической ситуации по этому заболеванию и планирования потребности в средствах специфической профилактики. Рассматриваемые хозяйства являются благополучными по болезни Ауески, и вакцинация против данной инфекции не проводится.

Материалы и методы. Из хозяйств 16 районов 4 областей (Гродненской, Минской, Витебской и Могилевской) было получено 139 проб крови от поросят 4–6-месячного возраста, находящихся на откорме. Сыворотки крови получали стандартным методом. Поступившие пробы крови выдерживали при +37 °С в течение 60 минут, после чего отделяли сгусток крови от стенок пробирки и выдерживали пробы в течение 24 часов при +4 °С. Образовавшуюся сыворотку отбирали в стерильные пробирки и использовали для дальнейших исследований.

Антитела к вирусу болезни Ауески-gB, определяли с помощью диагностической иммуноферментной тест-системы ID Screen AUJESZKY-gB Competition (ID VET innovative diagnostics) конкурентным методом иммуноферментного анализа (ELISA). Набор предназначен для анализа сыворотки крови и плазмы свиней на наличие антител класса IgG к вирусу Ауески-gB как инфицированных естественным образом, так и привитых животных. Тест проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору. Проведение анализа считали валидированным, если значение оптической плотности отрицательного контроля не ниже 0,7 и отношение оптической плотности положительного контроля к оптической плотности отрицательного контроля было меньше 0,3 ($ОП К^{+}/ОП К^{-} < 0,3$). Для каждой исследуемой пробы рассчитывали процент конкуренции (%S/N). Положительными считали пробы, имеющие процент конкуренции меньший либо равный 40%.

Результаты и обсуждение. Результаты мониторинга болезни Ауески в Гродненской, Минской, Могилевской и Витебской областях представлены в таблице 2. Данные мониторинга показали, что антитела к вирусу болезни Ауески выявлены у 52 особей из 130 обследованных, т.е. в 40,0% случаев. Процент серопозитивных сывороток колебался от 0 до 55,8. Графические результаты представлены на рисунке.

Таблица 2 — Результаты мониторинга болезни Ауески в некоторых областях Республики Беларусь в 2010 г.

Области	Болезнь Ауески			
	Число обследованных районов	Количество проб	Количество положительных проб	
			абс.	%
Витебская	3	21	7	33,3
Гродненская	6	52	29	55,8
Минская	6	47	16	34,6
Могилевская	1	10	0	0
ВСЕГО	16	130	52	40,0

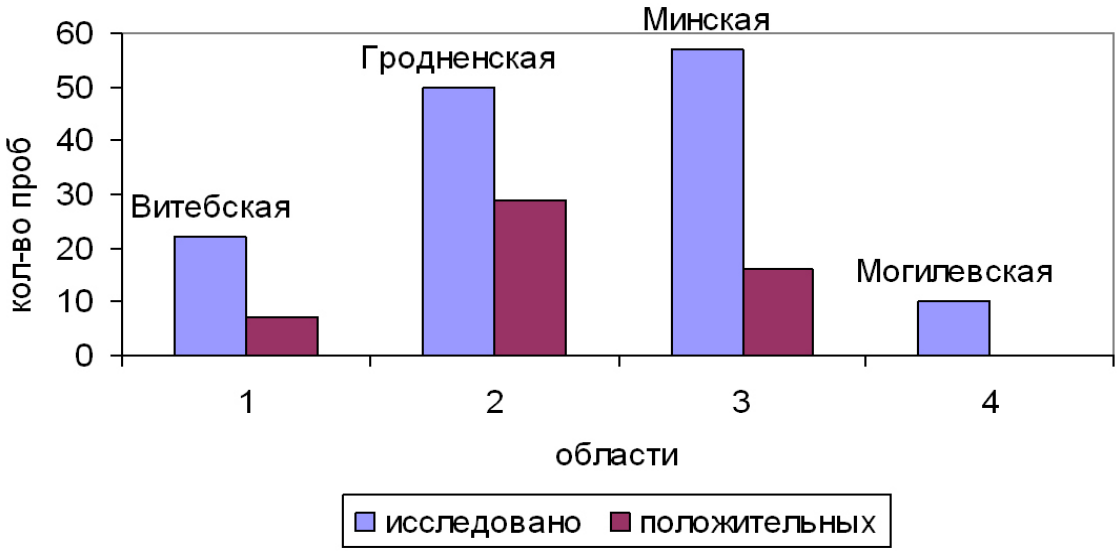


Рисунок — Результаты мониторинга болезни Ауески в некоторых областях Республики Беларусь в 2010 г.

В таблице 3 представлены результаты исследования сывороток крови свиней группы откорма в разрезе районов. В каждом районе обследовалось по одному хозяйству.

Таблица 3 — Результаты исследования сывороток крови свиней на наличие или отсутствие антител к вирусу болезни Ауески

Области	Районы	Количество проб сывороток крови	Количество проб	
			отрицательных	положительных
Витебская	Поставский	7	–	7
	Брасловский	5	5	–
	Верхнедвинский	9	9	–
Гродненская	Лидский	6	–	6
	Гродненский	12	10	2
	Сморгонский	10	9	1
	Новогрудский	4	4	–
	Волковысский	10	–	10
	Вороновский	10	–	10
Минская	Клецкий	9	9	–
	Вилейский	10	10	–
	Пуховичский	10	–	10
	Воложинский	5	–	5
	Минский	9	8	1
	Мядельский	4	4	–
Могилевская	Чаусский	10	10	–

Из таблицы 3 видно, что в Витебской области из 3 обследованных свинокомплексов 2 являются благополучными по болезни Ауески свиней и в одном болезнь Ауески протекает в латентной форме. В Гродненской области имеется 3 хозяйства с латентной инфекцией, а в Минской — 2.

Полученные результаты свидетельствуют о широком распространении возбудителя болезни Ауески свиней с протеканием заболевания в латентной форме. При этом настораживают мизерные случаи его диагностирования, что создает неоправданно успокоенное отношение к этой болезни. Многие хозяйства без проведения необходимых тщательных исследований отказались от вакцинаций. Учитывая, что не исследуются дикие животные и тем более не проводится широкомасштабный

серологический мониторинг свиноводческих хозяйств на данное заболевание, используются устаревшие методы диагностики, последствия для свиноводства могут быть непредсказуемые.

Необходимо как можно быстрее приступить к разработке программы по искоренению болезни Ауески свиней на территории Республики Беларусь, где в том числе определить методику проведения мониторинговых исследований, разработать новые подходы к диагностике с учетом современных методов.

Заключение. Таким образом, в результате проведенного выборочного мониторинга установлено:

1. Из 16 обследованных свинокомплексов 7 являются благополучными по болезни Ауески.

2. В 6 хозяйствах заболевание, вызываемое вирусом болезни Ауески, протекает в латентной форме, о чем свидетельствует выявление положительных проб во всех исследуемых пробах сывороток крови.

3. В 3 хозяйствах имеются серопозитивные животные,и там необходимо провести серологический мониторинг всех половозрастных групп.

4. Учитывая наличие латентной формы болезни Ауески свиней на территории Республики Беларусь, необходимо совершенствовать эпизоотологический надзор за этим заболеванием, разработать новые подходы к диагностике с учетом современных методов.

Литература

1. Информационные базы данных МЭБ [Электронный ресурс] / WAHID Interfase, 2010. — Режим доступа: http://web.oie.int/wahis/public.php?page = home&admin = 0&newlang = 1. — Дата доступа: 11.05.2011.

2. Коломыцев, А.А. Анализ эпизоотической ситуации и эффективности мер борьбы с болезнью Ауески в мире/ А.А. Коломыцев, А.А. Стрижаков, И.В. Амирова// Ветеринарная патология. — 2008. — № 1. — С. 157–159.

3. Некоторые аспекты эпизоотического проявления классической, африканской чумы свиней и болезни Ауески: информ.-аналит. обзор / А.А. Шевцов[и др.]; ФГУ«ВНИИЗЖ» Информ.-аналит. центр. — Владимир, 2008. — 47 с.

4. Serological survey on Aujeszky's disease, swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections in Italian pigs/ M. Foti [et al.] // Pol. J. Vet. Sci. — 2008. —Vol. 11, № 4. — P. 323–325.

5. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин [и др.]; под общ. ред. В.Н. Сюрина. — М.: ВНИТИБП, 1998. — 928 с.

6. Pseudorabies (Aujeszky's disease) and its eradication: a review of the U.S. experience // USDA, Technical Bulletin [Electronic resource]. — 2008, № 1923. — Mode of access: http://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/content/printable_version/pseudo_rabies_report.pdf. — Date of access: 15.12.2010.

Поступила 13.09.2011

ANALYSES OF EPIZOOTIC SITUATION ON AUJESZKY'S DISEASE IN BELARUSIAN PIGS

Erokhovets N.F.

S.N. Vyshelessky Research Institute for Experimental Veterinary, Minsk, Belarus

Analysis of epizootic situation on Aujeszky's disease of pigs in Belarus have been done. Selective monitoring of a swine farms from four areas which were safe from Aujeszky's disease of pigs was carried out and immunization against this disease wasn't used. It was established that in 6 from 16 of survey farms the disease course was in the latent form.

Keywords: Aujeszky's disease, pigs, epizootic situation, Belarus.

МОНИТОРИНГ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ В НЕКОТОРЫХ ОБЛАСТЯХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Згировская А.А., Гусев А.А., Азарова И.А., Ломако Ю.В., Ероховец Н.Ф., Сай Н.Г.

Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского, Минск, Беларусь

Резюме. В статье представлены результаты обследования сывороток крови свиней на наличие антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) в некоторых областях Республики Беларусь. Установлено, что РРСС широко распространен на территории страны. Серопозитивные пробы сывороток крови выявлены в 72,7–100% случаев в выборочно обследованных хозяйствах.

Ключевые слова: вирус репродуктивно-респираторного синдрома, свиньи, антитела, сыворотка крови, Беларусь.

Введение. Репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС) характеризуется нарушением функции воспроизводства у свиноматок, поздними абортами (90–109 дней супоросности), преждевременными родами (110–112 дней), прохолостами свиноматок, рождением мертвых, мумифицированных, нежизнеспособных поросят, пневмонией и диареей у молодых поросят и их высокой смертностью [1]. Уровень мертворождаемости и инфицирования молодняка зависит, прежде всего, от вирулентности изолята и срока супоросности, на котором свиноматка подверглась заражению. По сообщениям некоторых авторов, мертворождаемость может составлять до 100%, а инфицированность приплода — 4–75% (в среднем 45%) [2].

Возбудителем заболевания является РНК-содержащий вирус, относящийся к роду *Arterivirus*, семейство *Arteriviridae*, порядок *Nidovirales* [3].

РРСС впервые зарегистрировали в свиноводческих хозяйствах США и Канады в 1986–1987 гг. В последующие годы заболевание распространилось по всему миру и к середине 90-х гг. РРСС охватил почти всю Европу. По официальным данным Международного эпизоотического бюро (МЭБ), неблагополучными в отношении РРСС являются 56 стран мира. Особенно сложная эпизоотическая ситуация сложилась в Европе, где из 45 государств болезнь зафиксирована в 24, в Азии — в 10 странах.

Серопозитивность среди стад в различных странах Европы сильно варьирует. В Дании при определении статуса 47 ферм по РРСС с использованием непрямой ELISA 29 стад (61,7%) были классифицированы как РРСС-позитивные. В Словении в результате серомониторинга среди 8 крупных свиноводческих хозяйств антитела к вирусу РРСС были обнаружены только в 297 (5,5%) пробах из 5336 исследованных [4].

РРСС также широко распространен в странах Юго-Восточной Азии. Так, в Южной Корее при исследовании 256 ферм сероположительными к вирусу РРСС оказались 230 хозяйств (89,8%) [4].

Из стран южноамериканского континента антитела к вирусу РРСС обнаружили в свиноводческих хозяйствах Коста-Рики, Чили, Венесуэлы, Колумбии и Панамы [5, 6].

Заболевание не зарегистрировано пока на Австралийском континенте. При исследовании 875 проб сывороток крови из 163 свиноводческих хозяйств Австралии не удалось обнаружить антитела к вирусу РРСС ни в одной пробе [7]. Естественная изоляция этого материка позволяет ему сохранять благополучие по многим инфекционным болезням, в том числе и по РРСС.

Африка долгое время была благополучной в отношении РРСС, однако в июне 2004 г. появились сообщения о вспышках острой формы РРСС на фермах в Южно-Африканской Республике, вызванных вирусом американского генотипа. Болезнь проявлялась высоким уровнем абортов у свиноматок и респираторными нарушениями у поросят. К концу 2004 г. неблагополучными стали 6 районов провинции Западный Кейп, при этом заболело 6806 свиней, из которых 5580 погибли и 1024 были вынужденно убиты [5].

К настоящему времени РРСС довольно широко распространен на территории России. По данным сотрудников ВНИИВВиМ, антитела к вирусу РРСС обнаруживали в сыворотках крови свиней из 11 краев и областей России [8].

Заболевание также было зарегистрировано и на территории Украины [9]. Нарушение репродуктивной функции свиноматок и рождение мертвых и нежизнеспособных поросят отмечали в свиноводческих хозяйствах Сумской, Харьковской, Донецкой и Полтавской областей Украины. В этих хозяйствах поздние аборты и мертворождаемость наблюдали у 22,5–100% свиноматок, а нежизнеспособный приплод, погибающий в первые дни жизни, приносили 6,5–19,3% свиноматок. Из 12 хозяйств, обследованных сотрудниками Института экспериментальной и клинической ветеринарной медицины (Харьков, Украина), в 11 были обнаружены антитела к вирусу РРСС, и в 4 пробах патматериала был обнаружен антиген вируса РРСС [4].

С 1993 г. заболевание регистрируют и в Республике Беларусь.

При интродукции в неинфицированное стадо инфекция причиняет большой экономический ущерб, но скоро переходит в умеренную или даже инаппарантную форму. В эндемичной форме вирус продолжает долгое время циркулировать в стаде. В течение многих недель персистирует виремия. Наибольшие экономические потери приносят острые массовые вспышки заболевания. Напри-

мер, экономический ущерб от РРСС ежегодно в США составляет 560 млн. долларов: из них 45% потерь составляют недополучение привесов и перерасход кормов, 43% — смертность поросят на доращивании и 12% — репродуктивные нарушения [10].

Целью нашего исследования являлось обследование некоторых хозяйств на наличие антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней для прогнозирования эпизоотической ситуации по этому заболеванию в нашей стране.

Материалы и методы. Из 19 хозяйств 4 областей (Гродненской, Минской, Витебской и Могилевской) было получено 218 проб крови от поросят 4–6-месячного возраста, находящихся на откорме. Сыворотки крови получали стандартным методом. Поступившие пробы крови выдерживали при +37 °С в течение 60 мин, после чего отделяли сгусток крови от стенок пробирки и выдерживали пробы в течение 24 часов при +4 °С. Образовавшуюся сыворотку отбирали во флаконы и использовали для дальнейших исследований.

Наличие или отсутствие антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней определяли в тест-системе фирмы INGENASA для определения специфических антител к вирусу РРСС непрямым методом ИФА. Анализ проб проводили согласно инструкции. Результаты теста учитывали при значении оптической плотности положительного контроля (ОП $К^+$), превышающем 1,5. Оптическая плотность отрицательного контроля (ОП $К^-$) должна быть ниже показателя 0,25. Для интерпретации результатов рассчитывали отсекающие значения (cutt off) по формуле 0,15×ОП $К^+$. Пробу считали положительной при условии, если ОП превышала значение cutt off. Отрицательной считали пробу, если значение ОП было ниже показателя cutt off. Для расчета титра (Т) положительного образца сначала вычисляли соотношение его ОП к ОП $К^+$ (S/P), полученное значение использовали в формуле:

$$T = 100\times(e^{4x}) - 80,$$

где е — основание натурального логарифма (2,718),

х — значение S/P.

Результаты и обсуждение. Результаты выборочного мониторинга РРСС в Гродненской, Минской, Могилевской и Витебской областях представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Результаты мониторинга РРСС в некоторых областях Республики Беларусь в 2010 г.

Области	РРСС			
	Количество обследованных районов	Количество проб	Количество положительных проб	
			абс.	%
Гродненская	7	85	76	89,4
Минская	8	101	93	92,1
Могилевская	1	10	10	100,0
Витебская	3	22	21	95,5
ВСЕГО	19	218	200	91,7

Данные мониторинга показали, что РРСС широко распространен на территории нашей страны. Так, РРСС выявлен во всех 19 обследованных районах. Положительными в отношении РРСС считали хозяйства, в которых свиней не вакцинировали, но выявляли у них специфические антитела, результат переболевания. Как видно из таблицы 1, из 218 обследованных животных у 200 выявлены антитела к вирусу РРСС, т.е. 91,7% особей являются серопозитивными.

В таблице 2 представлены результаты исследования сывороток крови свиней, находящихся на откорме, на наличие или отсутствие антител к вирусу РРСС на различных свинокомплексах.

Как видно из таблицы 2 во всех 19 обследованных свиноводческих комплексах выявлены антитела к вирусу РРСС, процент положительных проб колебался от 72,7 до 100,0%.

Таблица 2 — Выявление антител к вирусу РРСС в сыворотках крови свиней на различных свинокомплексах

Области	Название свинокомплекса	Количество проб сывороток крови	Количество проб		
			отрицательных	положительных	% положительных
Минская	Грицевичи	9	—	9	100,0
	Нарочанские зори	10	—	10	100,0
	Ананичи	10	—	10	100,0
	Першаи-2003	5	1	4	80,0
	Ждановичи-Агро	9	—	9	100,0
	Брусы	4	—	4	100,0
	Борисовский	44	7	37	84,1
	Клевица	10	—	10	100,0
Витебская	Команский	8	1	7	87,5
	Маяк-Браславский	5	—	5	100,0
	Шайтерова	9	—	9	100,0
Гродненская	Прогресс	6	—	6	100,0
	Озеры	12	—	12	100,0
	Андреевцы	10	—	10	100,0
	Орковичи	4	—	4	100,0
	Шиловичи	10	—	10	100
	Дотишки	10	—	10	100,0
	Ворняны	33	9	24	72,7
Могилевская	Антоновский	10	—	10	100,0

Основными путями заноса вируса РРСС являются перемещение инфицированных свиней и спермы хряков из позитивных хозяйств в благополучные. Распространение вируса в течение короткого времени также возможно механическим путем через инфицированные предметы ухода за животными, транспорт, корма, воду, аэрогенно, некоторыми видами птиц, в том числе перелетными [5, 11, 12].

К настоящему времени РРСС довольно широко распространен, однако еще не достаточно изучены вопросы эпизоотологии, меры борьбы и профилактики этого заболевания, иммунобиологические свойства изолятов, циркулирующих на территории нашей страны и особенности течения РРСС в свиноводческих хозяйствах различного типа. В связи с этим изучение особенностей течения РРСС, иммунобиологических свойств изолятов, циркулирующих в республике, разработка, усовершенствование и оценка эффективности применяемых средств специфической профилактики РРСС являются актуальной задачей для развития отечественного свиноводства.

Заключение. Установлено, что РРСС широко распространен на территории Республики Беларусь. Серопозитивные пробы сывороток крови выявлены в 72,7–100% случаев в выборочно обследованных хозяйствах.

Для обеспечения благополучия свиноводческих комплексов в нашей стране необходимо:

- проведение постоянного эпизоотического мониторинга РРСС;
- проведение мероприятий по раннему выявлению РРСС;
- осуществление профилактической иммунизации животных в регионах высокой степени риска заноса РРСС и слежение за иммунным статусом животных.

Литература

1. Байбиков, Т.З. Репродуктивно-респираторный синдром свиней / Т.З. Байбиков // Вет. врач. — 2000. — № 2. — С. 20–24.

2. Ассоциированные вирусные инфекции при патологии воспроизводства свиней / О.Е. Краснобаева [и др.] // Пробл. и перспективы паразитоценологии: материалы 5-й межсъезд. конф. паразитоценологов Украины. — Харьков; Луганск, 1997. — С. 92–93.

3. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин [и др.]. — М.: ВНИТИБП, 1998. — С. 552–558.

4. Cho, J.G. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus / J.G. Cho, S.A. Dee // Theriogenology. — 2006. — Vol. 66. — P. 655–662.

5. Handistatus II: prototype [Electronic resource] / The World Organisation for Animal Health (OIE). — Paris, 2010. — Mode of access: http://www.oie.int/hs2/report.asP. — Date of access: 09.09.2011.

6. Zimmerman, J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): recent developments in epidemiology, prevention, control / J. Zimmerman // 5th Int. SymP. Emerg. Re-emerg. Pig Dis., Krakow, Poland, 2007. — P. 137–139.

7. A national serological survey to verify Australia's freedom from porcine reproductive and respiratory syndrome / M.G. Garner [et al.] // Aust. Vet. J. — 1997. — Vol. 75, № 8. — P. 596–600.

8. Выделение и идентификация вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) в Самарской области / И.Ф. Вишняков [и др.] // Ветеринария. — 1997. — № 11. — С. 16–19.

9. Бусол, В.О. Репродуктивний і респіраторний синдром свиней — загроза свинарству Україні / В.О. Бусол, М.В. Бабкін, В.О. Міщенко // Збереженість молодняка с/г тварин — запорука развитку тваринництва України: зб. стат. науч.-практ. конф. — Харків, 1994. — С. 102–104.

10. Seroprevalence of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in diagnostic submissions / S.M. Kim [et al.] // J. Vet. Sci. — 2002. — Vol. 3, № 3. — P. 159–161.

11. Evidence for the transmission of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) virus in boar semen / M. Yeager [et al.] // Swine Health and Production. — 1993. — Vol. 5. — P. 7–9.

12. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen) / S. Otake [et al.] // Can. J. Vet. Res. — 2002. — Vol. 66. — P. 191–195.

Поступила 13.09.2011

MONITORING ON PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME IN SEVERAL REGIONS OF BELARUS

Zgirovskaya A.A., Gusev A.A., Azarova I.A., Lomako Yu.V., Erokhovets N.F., Say N.G.

S.N. Vyshelessky Research Institute for Experimental Veterinary, Minsk, Belarus

The results of survey of porcine blood serum for the presence of antibodies to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) in several regions of Belarus have been presented. It was established that PRRSV widespread on territory of the country. Seropositive serum samples revealed in 72,7-100 % of cases in selectively surveyed households.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome virus, antibodies, blood serum, Belarus.

ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ ГЕРПЕТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ

Калугина М.Ю., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Бошьян Р.Е., Тебеньков А.В.

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России; Тушинская детская городская больница, Москва, Россия

Резюме. Под наблюдением находилось 88 детей в возрасте от 8 месяцев до 14 лет с диагнозом «внезапная экзантема» в остром периоде лихорадочного заболевания, как с признаками сыпи, так и без нее. Установлено, что наиболее часто — у 47,5% детей — выявлялись признаки острой цитомегаловирусной инфекции, а у 45,0% — острой инфекции, вызванной вирусом Эпштейна — Барр. Признаки острой инфекции, вызванной вирусом простого герпеса и острой инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) определялись приблизительно у одинакового количества больных детей (28,75 и 31,25%). ВГЧ-6 исследуется сравнительно недавно, и эпидемиология этой инфекции изучена недостаточно. Разработка ее высокоспецифичной диагностики чрезвычайно актуальна ввиду широкой распространенности и слабой изученности этой инфекции.

Ключевые слова: вирус герпеса человека 6 типа, диагностика, признаки.

Введение и цель работы. Неуклонный рост числа герпетических заболеваний у взрослых и детей обусловливает необходимость всестороннего изучения герпетической инфекции и разработки эффективных методов профилактики и лечения различных форм этой инфекции. Среди вирусных инфекций герпес занимает одно из ведущих мест в силу повсеместного распространения вирусов, многообразия клинических проявлений, как правило, хронического течения, различных путей передачи вирусов, сложности диагностики и лечения.

Клинические симптомы этих инфекций сходны с симптомами множества других заболеваний, поэтому большое значение придается разработке диагностических систем, позволяющих дифференцировать инфекционный агент с высокой степенью специфичности. Сложность иммунодиагностики герпесвирусных инфекций обусловлена так же значительным серологическим перекрестом не только внутри семейства, но и с другими вирусами [1, 2].

Эпидемиологический надзор за герпетическими инфекциями в полном объеме (учет абсолютного числа количества заболевших и заболеваемости в интенсивных показателях, выявление факторов и групп риска, проведение противоэпидемических и профилактических мероприятий) осуществляется только в отношении официально регистрируемых герпесвирусных инфекций (ветряная оспа, инфекционный мононуклеоз, генитальный герпес). Другие формы герпесвирусных инфекций не регистрируются, поэтому противоэпидемические мероприятия проводятся весьма ограниченно. В отношении инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6), система эпиднадзора пока не организована. Причина этому — трудности диагностики, разнообразие клинических проявлений и отсутствие мер специфической профилактики.

Одной из особенностей герпесвирусов является их пантропизм. Как правило, герпесвирусные больные наблюдаются врачами разных специальностей (педиатры, дерматологи, урологи, стоматологи, невропатологи, офтальмологи, иммунологи, инфекционисты и др.) с синдромальными диагнозами, без уточнения этиологического фактора. Различия в методологических подходах к обследованию таких пациентов существенно разнятся, что сказывается на эпидемиологическом учете этих инфекций.

Смертность и заболеваемость в тяжелой форме, ассоциированные с первичной инфекцией ВГЧ-6 в раннем детстве, редки, однако поражения ЦНС могут привести к серьезным последствиям (гемипарез, олигофрения, эпилепсия). Реактивация ВГЧ-6 обуславливает смертность и болезнь среди пациентов после пересадки органов и костного мозга, а также у больных СПИДом. У иммунодефицитных больных ВГЧ-6 может быть причиной лихорадки, снижения функции и отторжения трансплантата, пневмонии, гепатитов, поражений ЦНС. Высокую опасность ВГЧ-6 представляет для реципиентов костного мозга, по-видимому, из-за супрессивного воздействия этого возбудителя на костный мозг. Наиболее частым проявлением ВГЧ-6-инфекции у иммунокомпетентных детей

является «внезапная экзантема» и острая лихорадка без видимого очага инфекции. Значение остальных герпесвирусов в этиологии внезапных экзантем не изучено, поэтому перед нами и встала задача провести работу для определения значения цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна — Барр (ВЭБ), вируса простого герпеса (ВПГ) и ВГЧ-6 для данной категории больных детей.

Материалы и методы исследования. За 2007 г. в 1-е инфекционное отделение Тушинской детской городской больницы в остром периоде лихорадочного заболевания (37,5–39,0 °С) поступило 80 детей. Дети с краснухой, признаками кори и менингитами госпитализировались в специализированные отделения. С симптомами лихорадки и высыпаниями было 38 человек (47,5%), с лихорадкой без видимого очага инфекции — 42 ребенка (52,5%), из них у 12 (29,0%) была выявлена бактериальная инфекция, вызванная стафилококками, у 30 (71,0%) этиология заболевания оставалась неясной. Для установления диагноза и назначения правильного этиотропного лечения эти дети обследовались на ряд герпетических инфекций, чтобы определить, какой из герпесвирусов мог быть этиологическим агентом, вызвавшим лихорадку и высыпания. С этой целью исследовались сыворотки крови, клетки крови и слюна методами иммуноферментного анализа (ИФА), непрямой реакции иммунофлуоресценции (НРИФ), быстрого метода культуры клеток (БКМ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Результаты и их обсуждение. Наиболее часто — у 47,5% детей с проявлениями «внезапной экзантемы» — выявлялись признаки острой ЦМВИ и в 45,0% — острой ВЭБИ, в то время как маркеры острой ЦМВИ и ВЭБИ у практически здоровых детей определялись реже (в 9,5 и 4,5 раза соответственно). Признаки острой ВПГИ и острой ВГЧ-6-инфекции определялись приблизительно у одинакового количества больных детей (28,75 и 31,25%), что было в 6 раз чаще, чем в группе сравнения. Была предпринята попытка оценки взаимного влияния герпетических инфекций (ГИ) на их распространенность с помощью расчета коэффициента Жаккара и коэффициента общности (таблица 1).

Таблица 1 — Коэффициенты Жаккара и общности, рассчитанные для сочетаний ГИ, выявленных среди детей с внезапной экзантемой с признаками сыпи

Показатели	Сочетания выявляемых ГИ									
	ВГЧИ6 ВПГИ	ВГЧИ6 ВЭБИ	ВГЧИ6 ЦМВИ	ВПГИ ВЭБИ	ВПГИ ЦМВИ	ВЭБИ ЦМВИ	ВГЧИ6 ВЭБИ ЦМВИ	ВГЧИ6 ВПГИ ЦМВИ	ВГЧИ6 ВПГИ ВЭБИ	ВПГИ ВЭБИ ЦМВИ
q*	2,12	5,17	10,5	7,27	5,17	7,25	7,6	2,38	5,0	5,43
КО**	0,02	0,03	0,07	0,05	0,03	0,05	0,05	0,01	0,04	0,04

Примечания:
1. * — коэффициент Жаккара
2. ** — коэффициент общности

Представленные расчеты демонстрируют, что ГИ обладают различной способностью к сосуществованию. Наибольшей способностью к сосуществованию обладают ВГЧ-6-инфекция и ЦМВИ. Данное явление обусловлено, вероятно, наличием единых путей передачи возбудителя (контактный, парентеральный). Заметно ниже способность к сосуществованию у возбудителей ВГЧ-6-инфекции и ВПГИ. Как и следовало предполагать, более низкие значения показателей q и КО выявлены для тройного сочетания ГИ (ВГЧИ-6+ВПГИ+ЦМВИ). Однако наименьшей была вероятность одномоментного выявления у детей маркеров ВГЧИ-6 и ВПГИ. Установленные закономерности не могут быть объяснены лишь различными механизмами распространения рассматриваемых видов ГИ. По-видимому, способность к сосуществованию возбудителей ГИ детерминирована на генетическом уровне и реализуется путем сложного межвидового взаимодействия вирусов и взаимодействия тех или иных образующихся ассоциатов с макроорганизмом. Следует предположить наличие групп риска распространения микст-инфекций не только в связи с особенностями поведения лиц из тех или иных социальных групп, но и за счет генетической предрасположенности (или резистентности) определенных групп населения к заражению комбинацией возбудителей.

Широкому выявлению и всеобъемлющей регистрации ВГЧ-6-инфекции препятствует недостаточно разработанная диагностика, хотя именно она при ВГЧ-6-инфекции является важным, а в ряде случаев основным инструментом, с помощью которого возможна постановка правильного

диагноза. Это связано с гетерогенностью симптоматики заболеваний, вызываемых ВГЧ-6, а также с тем, что вирус может находиться в слюне и лимфоцитах практически здоровых людей.

Диагноз, указывающий на возникновение в организме активной формы ВГЧ-6-инфекции, может быть поставлен на основании обнаружения повышенного содержания вируса в биологических жидкостях больного. С этой целью часто используется метод определения вирусного генома. Он отличается высокой точностью и чувствительностью. Его разновидностью является метод ПЦР. Метод дает возможность качественного и количественного анализа ДНК вируса в биологических жидкостях и тканях. Достоинствами метода являются высокая специфичность (100%), чувствительность (90–97%), быстрота исследования (несколько часов), возможность определения концентрации вируса и активности инфекции, использования при скрининге сравнительно большого числа образцов. Метод позволяет выявить вирусы в любой клетке, если в ней есть хотя бы одна молекула вирусной ДНК, т.е. хотя бы одна вирусная частица. Определение ДНК возбудителя в биологических жидкостях и тканях методом ПЦР имеет и свои недостатки. Для ВГЧ-6-инфекции (как и для большинства оппортунистических инфекций) не установлены критерии активации инфекционного агента.

При выявлении ДНК сложно дифференцировать латентное состояние вируса в организме от наличия активного вируса — этиологической причины заболевания.

На сегодняшний день в основном преобладает качественный метод ПЦР, который не позволяет определить концентрацию ДНК вируса, а, следовательно, выявляет все стадии развития вирусной инфекции, включая и латентную.

Диагноз острой герпетической инфекции, вызванной ВГЧ-6, ставится на основании совокупности клинических данных и комплекса лабораторных методов.

Одним из самых распространенных иммунобиологических методов для обнаружения специфических антител (проявления иммунного ответа) является метод ИФА. Его чувствительность составляет 99%, специфичность — 95%. Серодиагностика дает ретроспективную информацию о наличии вируса. Выявление диагностической сероконверсии (4-кратного нарастания IgG-антител в парных сыворотках) свидетельствует об острой форме заболевания при первичном инфицировании или об активации персистирующей инфекции. Недостатками серологических тестов при диагностике оппортунистических инфекций являются:

• высокая частота носительства у клинически здоровых;

• наличие антител класса IgG означает лишь ответ на инфекцию, но не говорит об активности инфекционного процесса (при однократном обследовании или при отсутствии диагностической сероконверсии при наблюдении в динамике);

• отсутствие антител не означает отсутствия возбудителя.

Другими иммунобиологическими методами диагностики, имеющими не менее важное значение, служат метод непрямого выявления вирусных антигенов и метод культуры клеток, позволяющий определять ранние антигены и репродукцию вируса, что помогает определять острые стадии заболевания и является альтернативой обнаружения ДНК вируса в биологических жидкостях методом ПЦР. При этом чаще всего используют иммунофлюоресцентный метод (чувствительность 88%).

В лаборатории эпидемиологии оппортунистических инфекций ФГБУ «НИИЭМ им.Н.Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития России была создана экспериментальная тест-система на основе метода НРИФ. Она высокоэффективна, проста, доступна, экономична и характеризуется быстротой получения результатов (около 2 часов). Чувствительность ее — 88% и специфичность — 97,2%. Одним из преимуществ разработанной тест-системы является возможность применения ее как для работы с патологоанатомическими препаратами, так и для исследования различных биологических жидкостей. Исследования, проведенные в ходе создания этой тест-системы, будут развиваться, и в дальнейшем планируется серийное производство усовершенствованного диагностикума.

Если в качестве скринингового метода при диагностике герпесвирусной инфекции рекомендуется использовать метод ПЦР, ИФА и реакцию иммунофлюоресценции (РИФ), то в качестве подтверждающего — метод выделения герпесвирусов на чувствительных клеточных культурах. Вирусологический метод является «золотым стандартом» в диагностике герпесвирусной инфекции. Отличительной особенностью данного метода является высокая степень достоверности полученных результатов, а также высокая чувствительность (85–100%) и специфичность (100%),

возможность получения чистой культуры возбудителя для его дальнейшего изучения, в частности испытания чувствительности к антивирусным препаратам; недостатком — длительность проведения (от 2 до 5–14 дней). Кроме того, этот метод недоступен большинству медицинских учреждений, так как исследование с использованием клеточных культур является процессом трудоемким, дорогостоящим, а также требующим высокой квалификации персонала. Чувствительность метода зависит от времени, прошедшего с момента забора материала до посева, от качества забора материала, условий транспортировки, качества используемых сред и реагентов. ВГЧ-6 репродуцируется во многих клеточных первичных и перевиваемых культурах различного происхождения: лимфоцитах Т-ряда, моноцитарно-макрофагальных мегакариоцитах, глиальных клетках, клетках тимуса, в свежевыделенных лимфоцитах человека [3]. Цикл репродукции вируса длится 4–5 дней. Инфицированные клетки на 5-й день образовывают синцитий с ядерными и цитоплазматическими включениями. Репродукция вируса сопровождается деструкцией и лизисом клеток. Цитопатическое действие на 5–10-й день поражает 90% клеток.

Чтобы избежать гипердиагностики, вирусная инфекция должна быть верифицирована как минимум двумя методами. Лабораторная диагностика ВГЧ-6-инфекции должна включать в себя:

- постановку диагноза (моно- или микст-инфекция);
- определение активности инфекционного процесса;
- оценку тяжести течения болезни и прогноз;
- осуществление контроля эффективности лечения.

Трактовка полученных результатов анализов позволяет правильно определить стадию заболевания (таблица 2).

Таблица 2 — Выявление маркеров ВГЧ-6-инфекции на различных стадиях заболевания комплексом современных методов диагностики (ИФА, НРИФ, культура клеток, ПЦР)

Стадии развития заболевания		МАРКЕРЫ ИНФЕКЦИИ				
		АНТИТЕЛА IgG (ИФА)	АНТИГЕНЫ (Общие и поздние) (НРИФ)	Метод культуры клеток		ДНК (ПЦР)
				Ранние антигены	Репродукция вируса	
Нет встречи с возбудителем		–	–	–	–	–
Встреча с возбудителем в прошлом		+ (анамнестические титры)	–	–	–	–
Первичная инфекция (вирусемия)		–	±	+	–	+
Острая инфекция	начало	–	±	+	±	+
	разгар	+ (диагностические титры)	+	±	+	+
	конец	+ (высокие титры)	±	–	±	±
Реконвалесценция		+ (диагностические титры)	–	–	–	–
Хроническая персистирующая инфекция — латентная форма, когда вирус находится в депо		+ (анамнестические или начальные диагностические титры)	±	–	–	±
Хроническая персистирующая инфекция в стадии обострения (реактивация)		+ (диагностические титры)	+	+	–	+
		+ (высокие титры — нарастание антител в 10 раз и более)	+	–	+	+

Наличие только антител класса IgG (ИФА) к ВГЧ-6 в средних (1:250–1:500) и высоких титрах (IgG в титре ≥1:500) свидетельствует о не так давно перенесенной инфекции; наличие только антител класса IgG к ВГЧ-6 в низких титрах свидетельствует о том, что у ребенка был контакт с вирусом, и организм ответил слабовыраженной иммунной реакцией.

Присутствие антител класса IgG к ВГЧ-6 в низких титрах при наличии антигенов или ДНК свидетельствует о развитии заболевания в латентной форме либо в острой, но при слабой наработке организмом антител (дети с иммунодефицитами различной природы); присутствие антител класса IgG к ВГЧ-6 в высоких титрах в сочетании с обнаружением антигенов или ДНК, свидетельствует об острой стадии заболевания (как при первичном инфицировании, так и на стадии реактивации инфекции).

Выявление антител класса IgG к ВГЧ-6 в диагностической сероконверсии при наличии антигенов и ДНК вируса указывает на первичную острую инфекцию.

Наличие только ДНК или только антигенов может говорить о латентной инфекции или первичном инфицировании на стадии вирусемии.

Высокочувствительные и специфичные иммунобиологические исследования (ИФА, НРИФ) незаменимы в определении стадии герпетических инфекций. Для выявления инфекции, вызванной ВГЧ-6, необходимо применение лабораторных методов в комплексе и в динамике. Практически ничего неизвестно об антигенных спектрах двух наиболее известных белков ВГЧ-6 p100 и p41, которые кодируются соответствующими генами U11 и U27. В этой связи необходимо применение молекулярно-генетических методов для выделения, характеристики и типирования диких штаммов вируса и дальнейшего сравнения их со стандартными.

Заключение:

1. Достоверная диагностика возможна исключительно при использовании комплекса различных диагностических методов.

2. Моногерпетическая инфекция встречается нечасто, в основном — микст-инфекция. Наибольшей способностью к сосуществованию у детей с диагнозом «внезапная экзантема» обладают ВГЧ-6-инфекция и ЦМВИ.

3. Выявление новых генетических маркеров ВГЧ-6, специфичных и перспективных, позволит создать на их основе отечественные высокочувствительные диагностические системы, удовлетворяющие требованиям клинической практики.

Литература

1. Получение рекомбинантного антигена p100 герпесвируса человека 6-го типа / И.В. Плясунов [и др.] // Биотехнология. — 2004. — № 6. — С. 83–88.

2. Использование метода полимеразной цепной реакции для выявления ДНК вируса герпеса человека 6-го типа (human herpes virus 6 type, HHV6) / И.В. Плясунов [и др.] // Биотехнология. — 2005. — № 1. — С. 83–89.

3. The effect of human herpesvirus-6 (HHV-6) on cultured human neural cells: oligodendrocytes and microglia / A.V. Albrigh [et al.] // J. Neurovirol. — 1998. — Vol. 4. — P. 486–494.

Поступила 10.08.2011

PROBLEMS OF HERPETIC INFECTION DIAGNOSTICS

Kalugina M.Yu., Karazhas N.V., Rybalkina T.N., Bosh'yan R.E., Teben'kov A.V.

N.F. Gamaleya Research Institute for Epidemiology & Microbiology;
Tushin Children Municipal Hospital, Moscow, Russia

We observed 88 children from 8 months to 14 years with «exanthema subitum» diagnosis in acute febrile illness with symptoms like rashes, and without it. It was found that the most often, in 47.5% of children, symptoms of acute cytomegalovirus infection, and in 45.0% of ones — acute Epstein-Barr virus infection were identified. Symptoms of acute infections caused by herpes simplex virus and human herpesvirus type 6 (HHV-6) were found in approximately the same number of sick children (28.75% and 31.25% thereafter). HHV-6 was investigated recently, and epidemiology of this infection has been insufficiently studied. The development of highly specific diagnostic particularly urgent in view of the prevalence and weak scrutiny of the infection.

Keywords: human herpes virus 6 type, diagnostics, symptoms.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА КЛАССИЧЕСКОЙ И ВАКЦИНОАССОЦИИРОВАННОЙ КОРИ

Самойлович Е.О.[1], Семейко Г.В.[1], Свирчевская Е.Ю.[1], Елин О.Е.[2], Ермолович М.А.[1], Згурская Л.И.[2], Ерёмин В.Ф.[1], Качкан М.В.[3], Галенчик А.В.[3]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;
[2]Червенская центральная районная больница, Червень;
[3]Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь

Резюме. С целью дифференциации классической и вакциноассоциированной кори обследовано шесть человек с температурой и сыпью, недавно контактировавших с больными корью и привитых вакциной корь-паротит-краснуха по эпидпоказаниям за 7–10 дней до появления симптомов заболевания. Лабораторно подтвердить диагноз «корь» удалось у четырех из них (в четырех случаях выявлены специфические IgM-антитела, в одном случае также выделен вирус кори). Секвенирование фрагмента N-гена выделенного вируса показало, что он относится к дикому вирусу (генотипу D8), что подтвердило классический характер кори у заболевшего. Остальные три лабораторно подтвержденных случая в соответствии с рекомендациями ВОЗ для стран, находящихся на стадии элиминации инфекции, были также зарегистрированы как корь.

Ключевые слова: корь, вакцинация, лабораторная диагностика, генотипирование.

Введение. В соответствии с рекомендациями ВОЗ обнаружение IgM-антител к вирусу кори в сыворотке крови больного с температурой и сыпью является основным методом лабораторного подтверждения диагноза «корь» [1]. Однако, как известно, температура и сыпь могут наблюдаться примерно у 5% лиц, получивших прививку против кори [2]. Отличить поствакцинальные IgM-антитела от антител, сформировавшихся в ответ на инфицирование диким вирусом, не представляется возможным. Сероконверсия или нарастание титров IgG-антител в парных сыворотках крови, используемые в диагностике кори, также наблюдаются и в том и в другом случаях, и, соответственно, их исследование также неприменимо для целей дифференциации этих состояний. Эпидемиологические данные (уровень заболеваемости, выявление индексного и вторичных случаев и т.д.), а также особенности клинического течения в определенной степени помогают в диагностике, однако убедительные данные для разграничения поствакцинальной и классической кори может обеспечить только выделение вируса от больного и его молекулярно-генетическая характеристика. Обнаружение в клиническом материале одного из вакцинных штаммов вируса кори, относящихся к генотипу А, свидетельствует о вакциноассоциированном характере заболевания. Выявление вируса кори генотипов В–Н подтверждает естественное инфицирование диким вирусом кори [3].

Целью настоящего исследования явилась дифференциальная диагностика классической и вакциноассоциированной кори у лиц с температурой и сыпью, привитых по эпидпоказаниям во время вспышки кори в Червенском районе Минской области.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось шесть человек с лихорадкой и макулопапулезной сыпью, которые контактировали с больными корью и были привиты по эпидпоказаниям комбинированной вакциной корь-паротит-краснуха (КПК). У всех шести заболевших указанные клинические проявления появились в период с 7 по 10 день после вакцинации. Четыре пациента были госпитализированы в Червенскую центральную районную больницу, двое лечились амбулаторно.

От всех больных на 3–8 день от появления сыпи были забраны гепаринизированная кровь или сыворотка крови и направлены на исследование в Республиканскую референс-лабораторию по диагностике кори (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). От двух заболевших, у которых в первом образце отсутствовали IgM-антитела к вирусу кори, с интервалом 8–9 дней был забран второй образец крови.

IgM-антитела к вирусу кори в сыворотке крови или плазме выявляли с использованием иммуноферментной тест-системы производства Siemens (Германия), IgG-антитела — с использованием иммуноферментных тест-систем производства Siemens (Германия), или Virion/Serion (Германия).

Вирус кори выделяли из мононуклеаров периферической крови, полученных с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина общепринятым методом. Взвесью мононуклеаров инокулировали в культуру клеток Vero-SLAM и вели наблюдение в течение 2 недель. В случае отсутствия цитопатического эффекта в течение этого времени выполняли 2 слепых пассажа. При появлении цитопатического эффекта вируссодержащий материал собирали, разливали по аликвотам и замораживали при температуре –20 ºС для дальнейшего хранения и анализа.

Экстракцию вирусной РНК выполняли с использованием QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с протоколом производителя. С-концевой фрагмент N-гена (450 нуклеотидов), исследование которого рекомендовано для генотипирования вируса кори [1], амплифицировали методом гнездовой ПЦР со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) с помощью праймеров, предложенных Kremer J.R. с соавт. [4]. Секвенирование полученных ампликонов проводили с использованием коммерческого набора Big Dye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, США) на капиллярном ДНК-секвенаторе ABI 3100 Avant (Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных последовательностей и построение филограмм выполняли с помощью программ «BioEdit» и «Mega» версии 5.05 [5].

Результаты и обсуждение. При наблюдении за контактными лицами в очагах во время локальной вспышки кори в Червенском районе Минской области в мае–июле 2011 г., было выявлено 6 человек, привитых вакциной КПК по эпидпоказаниям, у которых появились лихорадка и макулопапулезная сыпь. Все заболевшие имели контакт с лабораторно подтвержденными случаями кори, поэтому появление характерных для кори клинических симптомов могло свидетельствовать об их инфицировании циркулировавшим диким вирусом. С другой стороны, сыпь и повышение температуры могли явиться следствием введения вакцины, содержащей коревой компонент.

Заболевшие были в возрасте 11 месяцев, 17 лет, 20 лет, 21 год, 28 лет и 32 лет. Введение вакцины КПК было первой прививкой против кори для ребенка в возрасте 11 месяцев. Четверо взрослых ранее получали плановую вакцинацию против кори (пациенты 17, 20, 21 лет — двукратно, 28 лет — однократно). Для одного заболевшего (32 года) прививочный статус установить не удалось.

У четырех из шести пациентов заболевание имело легкое течение. Сыпь сохранялась 2–3 дня, характерная для кори этапность появления сыпи отмечалась только у одного больного. Пятна Коплика на слизистой щек не были выявлены. Температура тела находилась в пределах 37–38 ºС у трех заболевших и 38–39 ºС — у одного. У двух заболевших отмечалась средняя степень тяжести заболевания. У одного из них температура тела доходила до 39 ºС, у другого превышала 39 ºС. Отмечалась этапность появления сыпи, ее сохранение в течение 3–4 дней, с последующей пигментацией и шелушением. У обоих заболевших наблюдались пятна Коплика и энантема на мягком небе.

При лабораторном исследовании первого образца крови IgM-антитела к вирусу кори были выявлены у 4 пациентов. У двух заболевших IgM-антитела отсутствовали, что потребовало забора второго образца крови. Проведенное исследование парных образцов не выявило нарастания концентрации IgG-антител, IgM-антитела и во втором образце также не были обнаружены.

При вирусологическом исследовании мононуклеаров периферической крови, полученных от 4 заболевших, в одном случае (пациент 32 лет с течением заболевания средней тяжести) был выделен вирус кори. Секвенирование фрагмента генома выделенного вируса кори и его филогенетический анализ показали, что вирус являлся диким и относился к генотипу D8. Отличие полученного изолята от референс-штамма генотипа D8 Manchester.UNK/30/94 оказалось значительным и составило 9 (2%) нуклеотидов. При сравнении нуклеотидной последовательности выделенного вируса с вирусами, вызвавшими локальную вспышку кори в Червенском районе, различий между ними не установлено.

Таким образом, при проведении лабораторного обследования 6 пациентов с лихорадкой и сыпью, находившихся в очаге кори и вакцинированных против кори по эпидпоказаниям, у 2 из них ни один из методов исследования не позволил подтвердить диагноз «корь». Можно предположить, что в этих случаях заболевание было вызвано другими причинами. Однако, принимая во внимание тот факт, что оба заболевших ранее были привиты против кори, нельзя исключить диагностические «неудачи», связанные с проблемами лабораторной верификации диагноза у ранее привитых лиц.

У 4 из 6 заболевших был подтвержден диагноз корь (у трех — выявление IgM-антител, у одного — выявлением IgM-антител и выделением вируса кори). В случае с выделением вируса, на основании данных молекулярно-генетической характеристики изолята было убедительно доказано, что заболевание вызвано диким вирусом кори. Вакцинация, вероятнее всего, была проведена, когда человек уже находился в инкубационном периоде кори, и соответственно, оказалась безуспешной.

В трех случаях, подтвержденных обнаружением IgM-антител, когда вирус выделить не удалось, дать окончательный ответ классическая это корь или реакция на прививку не представляется возможным. Однако, в соответствии с критериями ВОЗ, если нет убедительных доказательств того, что заболевание обусловлено другими причинами, на стадии элиминации инфекции все подо-

зрительные по клиническим признакам (лихорадка и макуло-папулезная сыпь) случаи с выявлением IgM-антител к вирусу кори регистрируются как корь с последующим проведением соответствующих противоэпидемических мероприятий. На основании этого, все три случая заболевания также были зарегистрированы как лабораторно подтвержденная корь.

Заключение. В дифференциальной диагностике классической и вакциноассоциированной кори решающая роль принадлежит данным молекулярно-генетического исследования вируса. На стадии элиминации инфекции, когда регистрируются редкие случаи заболевания, чрезвычайно важно обеспечить проведение как серологического, так и вирусологического обследования каждого пациента. Только обнаружение в клиническом материале вакцинного вируса кори (генотип А) является убедительным доказательством вакциноассоциированной кори.

Литература

1. Руководство по лабораторной диагностике кори [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. — 2-я ред. — Женева, 2009. — 115 с. — Режим доступа: http://www.who.int/ihr/elibrary/manual_diagn_lab_mea_rub_ru.pdf. — Дата доступа: 30.09.2011.

2. The laboratory confirmation of suspected measles cases in setting of low measles transmission: conclusions from the experience in the Americas / V. Dietz [et al.] // Bull. World Health Organ. — 2004. — Vol. 82, N 11. — P. 852–857.

3. Global distribution of measles genotypes and measles molecular epidemiology / P.A. Rota [et al.] // J. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 204, № 1. — P. 514–523.

4. 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, № 7. — P. 987–994.

5. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. — 2011. — № 28. — P. 2731–2739.

Поступила 04.10.2011

DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF CLASSICAL AND VACCINE-ASSOCIATED MEASLES

Samoilovich E.O.[1], Semeiko G.V.[1], Svirchevskaya E.Ju.[1], Elin O.E.[2], Yermalovich M.A.[1], Zgurskaya L.I.[2], Eremin V.F.[1], Kachkan M.V.[3], Galenchik A.V.[3]

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Central District Hospital, Cherven';
[3]Minsk Region Center of Hygiene, Epidemiology& Public Health, Minsk, Belarus

The aim of the work was to carry out the differentiation of classical or vaccine-associated measles in 6 patients with rash and fiver who contacted with measles cases and received measles-mumps-rubella vaccine according to the epidemiological reason 7–10 days before the rush onset. Laboratory conformation of measles was received for 4 of them (specific measles virus IgM were revealed in 4 cases, measles virus was isolated from one of them). Sequencing of N-gene of virus isolated showed it belonging to wild virus (D8 genotype), that confirmed a classical measles case. The rest three laboratory confirmed cases without virus isolation were also reported as measles cases according to WHO recommendation for countries on the stage of measles elimination.

Keywords: measles, vaccination, laboratory diagnostics, genotyping.

ЛАБОРАТОРНОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

Абдикеримов М.М., Романенко А.И., Суванбеков А.А., Жолдошев С.Т.

Кыргызско-Российский Славянский Университет, Бишкек;
Институт медицинских проблем, Ош, Кыргызстан

Резюме. Успех лечения при хроническом вирусном гепатите С обеспечивается комплексной рекомбинантной противовирусной терапией при постоянном контроле показателей гомеостаза больного.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит С, цитокины, базисная терапия, противовирусная терапия, рецидив, биохимические тесты.

Введение. Проблема вирусного гепатита С является одной из самых актуальных в современной медицине в связи с его широкой распространенностью, латентностным характером болезни и серьезными осложнениями (цирроз печени, гепатоцеллюлярная карцинома и др.). В мире насчитывается около 300 млн. инфицированных вирусом гепатита С (ВГС, HCV). Этот гепатит занимает первое место среди всех инфекций, передающихся через кровь [1–4].

Стандартом лечения больных хроническим гепатитом С (ХГС) в настоящее время является комбинация препаратов интерферона и рибавирина [5–8].

Цель исследования: обосновать эффективность специфической терапии хронического вирусного гепатита С на основании лабораторных и клинических данных исследования.

Материалы и методы исследования. В наших исследованиях больные получали комбинированную противовирусную терапию: α-интерферон + рибавирин. Был использован пегилированный α-2а интерферон (Пегасис, компания Хоффманн-Ля Рош) в дозе 180 мкг/неделю подкожно в комбинации с рибавирином (Копегус, компания Хоффманн-Ля Рош) 800–1200 мг/ежедневно внутрь. Продолжительность лечения определялась генотипом ВГС. В случае выявления генотипа 1 больному назначалась противовирусная терапия (ПВТ) в течение 48 недель, в любом другом случае — продолжительность 24 недели. Показанием к назначению противовирусной терапии являлись повышенная активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) (в 1,5 раза и более), наличие HCV-РНК в сыворотке крови. Параллельно проводилось наблюдение за 40 больными хроническим гепатитом С, которые получали базисную терапию и составили контрольную группу. Больным проводился комплекс клинико-биохимических исследований, определялась активность репликации HCV, содержание медиаторов иммунного ответа. Показатели изучались при динамическом наблюдении за больными на фоне проводимой противовирусной и базисной терапии. Исследования проводили до начала терапии α-интерфероном и в процессе динамического наблюдения в течение 24 недель, 48 недель, через 3 и 6 месяцев после окончания ПВТ.

С учетом исхода лечения все больные были разделены на 2 группы. В 1-ю группу вошли 32 больных (71,1%), у которых наблюдался устойчивый вирусологический ответ (спустя 24 недели и даже через 2 года после окончания лечения стойко отсутствовала HCV-РНК и показатели АлАТ были нормальными). Вторую группу составили 13 больных (28,9%) с рецидивом (выявлялась HCV-РНК, зарегистрирован повторный подъем АлАТ).

Статистическая обработка полученных результатов была выполнена при помощи программы STATISTICA for Windows. Достоверность различий в величине средних оценивали при помощи коэффициента Стьюдента. Различия считались значимыми при уровне вероятности $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Первым этапом анализа стала оценка динамики HCV-РНК у больных 1-й и 2-й групп, поскольку именно ее отсутствие являлось критерием эффективности ПВТ.

Как видно из рисунка 1, до начала лечения HCV-РНК выявлялась у всех больных без исключения, уровень вирусной нагрузки был высоким ($>10^3$ копий/мл). Уже к 4 неделе ПВТ в 1-й группе у половины больных отмечалось исчезновение HCV-РНК (у 16 из 32, 50,0%). У всех у них в дальнейшем был зарегистрирован устойчивый вирусологический ответ (УВО) ($p = 0,001$). Таким образом, раннее (в течение первого месяца) исчезновение HCV-РНК является надежным критерием эффективности ПВТ. Следует подчеркнуть, что среди этих больных у 10 (31,2%) был генотип 1в, так называемые «трудные для лечения больные». Тем не менее ни у кого из них в дальнейшем не было отмечено рецидива. У 13 (40,6%) больных 1-й группы количественный анализ HCV-РНК в эти сроки выявил снижение концентрации на 2 логарифма. У всех у них также отмечен УВО ($p = 0,025$). У оставшихся 3 больных (9,3%) к исходу 1-го месяца титр HCV-РНК не изменился, однако к 12-й неделе произошло снижение ее концентрации на 2 логарифма.

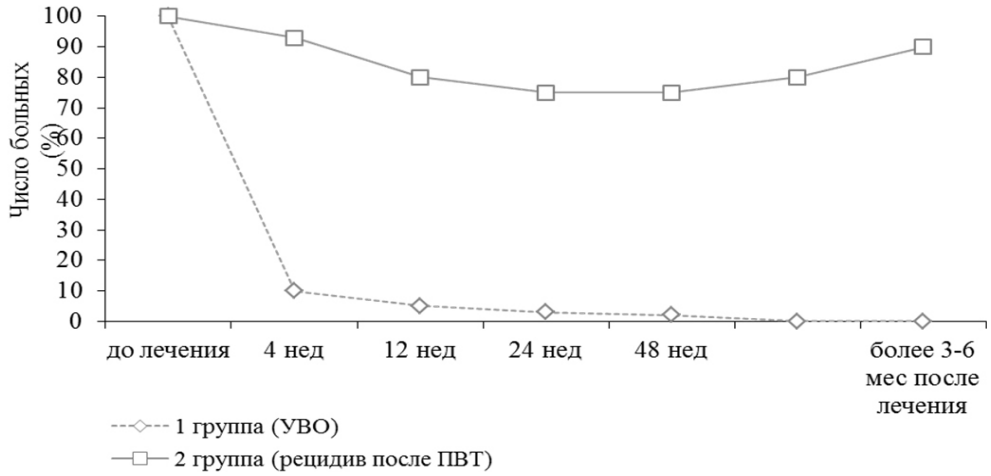


Рисунок 1 — Частота выявления РНК у больных ХГС с УВО и рецидивом после ПВТ

Иная картина наблюдалась во 2-й группе больных. К четвертой неделе лечения у всех больных HCV-РНК сохранялась. Результаты количественной оценки содержания РНК в эти сроки свидетельствовали о сохранении виремии на прежнем уровне. Более того, следует отметить, что у большинства из них определен генотип 1в (у 9 из 13, 69,2%). К 12-й неделе лечения у большинства больных 2-й группы HCV-РНК продолжала определяться (у 10 из 13, 76,9%; $p < 0,001$). Снижение концентрации HCV-РНК отмечалось только у 1 (7,6%) больного и менее чем на 2 логарифма.

Таким образом, наши исследования подтвердили значение динамики контроля за концентрацией HCV-РНК как «золотого стандарта» прогнозирования УВО на ранних этапах лечения — на 4-й и 12-й неделях (рисунок 1). Ранее нами было показано, что при остром гепатите С (ОГС) динамика АлАТ в значительной степени соответствовала динамике HCV-РНК (28,46). Как видно из рисунка 2, перед началом лечения уровень АлАТ был повышен у всех больных.

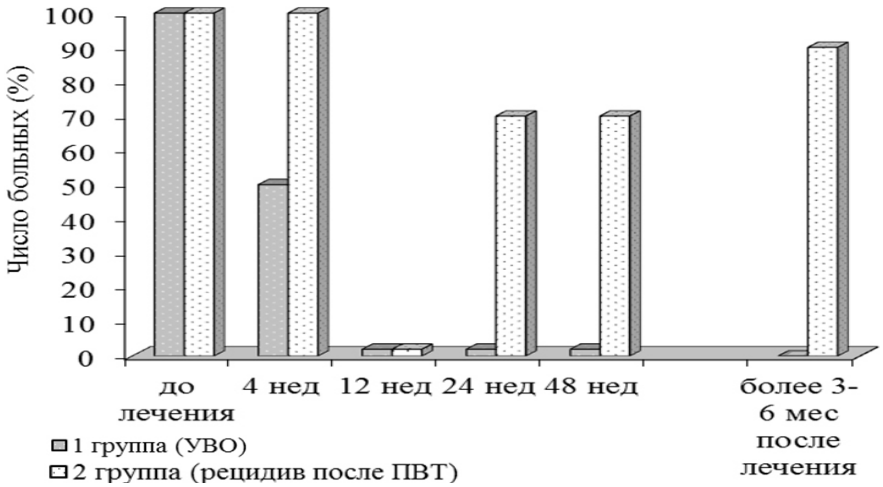


Рисунок 2 — Частота повышения АлАТ у больных ХГС с УВО и рецидивом после ПВТ

Средние показатели АЛАТ в 1-й группе составили 0,74 ± 0,14 мккат, во 2-й группе — 0,80 ± 0,12 мккат ($p = 0,34$). На 4 неделе лечения у половины больных 1-й группы наблюдалось снижение АЛАТ до 1,5–2 норм (у 18 из 32 больных, 56,2%). С другой стороны, у всех больных 2-й группы уровень АлАТ остался прежним ($p = 0,026$). К 12-й неделе показатели АлАТ в обеих группах нормализовались.

В 1-й группе в дальнейшем уровень АлАТ остался стойко нормальным, а во 2-й группе к моменту окончания ПВТ у 9 из 13 больных (69,2%) вновь зафиксировано повышение показателей АлАТ. У оставшихся 4-х (30,8%) больных этой группы оно было отмечено через 6 месяцев. Следует подчеркнуть, что повторный подъем АлАТ соответствовал и повторному появлению HCV-РНК.

Нами была проведена оценка показателей тимоловой пробы у больных 1 и 2 групп. До начала лечения средние значения ее были повышены у всех больных (6,38 ± 0,35 Д и 6,82 ± 0,43 ЕД).

На 4-й неделе лечения было отмечено существенное снижение и нормализация уровня этого показателя как в первой, так и во второй группе (3,52 ± 0,22 ЕД, p = 0,037 и 3,76 ± 0,28, p = 0,042). В дальнейшем в первой группе значения пробы оставались стойко нормальными, а во второй группе к моменту окончания ПВТ отмечено их повышение (6,32 ± 0,36, p = 0,045).

Мы пришли к заключению, что контроль за показателями АлАТ и тимоловой пробы может быть использован лишь для диагностики рецидива ВГС и оказывается неэффективным для прогнозирования исхода ПВТ. Полученные результаты потребовали поиска иных доступных и информативных методов контроля эффективности противовирусной терапии.

Заключение. Комплексная рекомбинантная терапия препаратами интерферонового ряда в сочетании с противовирусными средствами может дать хороший клинический эффект. Все это доказано корреляционными связями лабораторных и клинических показателей.

Литература

1. Актуальные проблемы гепатологии: эпидемиология вирусных гепатитов: приложение к СССХХIII «Воен.-мед. журн.» / А.Л. Раков [и др.]. / под общ. ред. И.М. Чижа, Л.Л. Галина — М., 2002. — 96 с.
2. Вирусные гепатиты: пособие для врачей / А.Г. Рахманова [и др.]. — Кольцово: Вектор-Бест, 2002. — 57 с.
3. Карпов, Ю. Клиническая характеристика и особенности течения хронического гепатита С низкой степени активности / Ю. Карпов, П.Е. Крель // Клинич. медицина. — 2005. — № 1. — С. 14–19.
4. Лакина, Е.И. РНК и неструктурный белок NS4 вируса гепатита С в печени и периферической крови больных хроническим гепатитом С: автореф. дис. ...канд. биол. наук / Е.И. Лакина. — М., 2000. — 25 с.
5. Ивашкин, В.Т. Особенности иммунного ответа у больных хроническим вирусным гепатитом С / В.Т. Ивашкин, С.Н. Мамаев, Е.А. Лукина // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колонопроктол. — 2002. — Т. 12, № 3. — С. 24–29.
6. Neau-Cransac, M. Modifications of T-lymphocyte subsets before and during interferon and ribavirin treatment for chronic hepatitis C infection / M. Neau-Cransac, J. Foucher, V.D. Ledinghen //Viral Immunol. — 2005. — Vol. 18, N 1. — P. 197–204.
7. Stoll-Keller, F. Immunomodulating effect of HCV during the development of chronic hepatitis C: toward new therapeutic approaches / F. Stoll-Keller, E. Schvoerer, C. Thumann // Bull. Acad. Natl. Med. — 2003. — Vol. 187, N 6. — P. 1147–1160.
8. Strader, D.B. Hepatitis C: a brief clinical overview / D.B. Strader, L.B. Seeff // ILAR J. — 2001. — Vol. 42, N 2. — P. 107–116.

Поступила 18.07.2011

DYNAMICS OF LABORATORY DATE FEATURES IN VARIOUS TREATMENT METHODS FOR CHRONIC VIRAL HEPATITIS C

Abdikerimov M.M., Romanenko A.I., Suvanbekov A.A., Zholdoshev S.T.

Kyrgyz-Russian (Slavonic) University, Bishkek;
Institute of Medical Problems, Osh, Kyrgyzstan

Success of the chronic viral hepatitis C treatment is due to the complex recombinant antiviral treatment under a constant control of the of the patient's homeostasis parameters.

Keywords: chronic viral hepatitis C, cytokines, basic therapy, antiviral treatment, relapse, biochemical tests.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ДИАГНОСТИКУМОВ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С

Владыко А.С.[1], Фомина Е.Г.[1], Счеслёнок Е.П.[1], Красько А.Г.[1], Школина Т.В.[1], Рогачева Т.А.[2], Игнатьев Г.М.[1]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;
[2]Городская инфекционная клиническая больница, Минск, Беларусь

Резюме. Проведен сравнительный анализ чувствительности и специфичности двух российских и одной белорусской иммуноферментных тест-систем, используемых для обнаружения специфических к вирусу гепатита С антител в сыворотках крови пациентов. Показано, что по чувствительности отечественная тест-система (98,0%) уступает аналогичным российским (100%), тогда как по специфичности белорусский диагностикум (100%) превосходит последние (94,3 и 95,2%).

Ключевые слова: гепатит С, иммуноферментный анализ, чувствительность, специфичность.

Введение. Вирус гепатита С относится к возбудителям парентеральных гепатитов у людей, инфицированность которых, по данным ВОЗ, достигает 10% всей популяции. Заболевание представляет серьезную проблему для здравоохранения и служит ведущей причиной хронической патологии печени. При этом примерно у 60% остро инфицированных лиц развивается хроническая инфекция, заканчивающаяся развитием цирроза или рака печени. В США гепатит С занимает первое место в структуре смертности от заболеваний печени [1]. В Беларуси острых случаев гепатита С регистрируется около 60 в год. Поскольку острый период гепатита С плохо обозначен симптоматикой, пациенты часто не обращаются за помощью. В стране ежегодно выявляется около 2000 случаев хронического гепатита, носителей — порядка 3,5 тысячи.

Существующие в настоящее время иммуноферментные тест-системы для диагностики вируса гепатита С созданы на основе рекомбинантных или синтетических пептидов или их смеси и включают как структурные, так и неструктурные белки вируса в различной компановке. Тем не менее, основой всех диагностикумов, призванных выявлять в сыворотке крови специфические антитела, является нуклеокапсидный вирусный белок (core), который, по данным литературы, позволяет выявлять до 96% и более лиц, страдающих от данного заболевания [2, 3]. Остальные белки вируса, главным образом неструктурные NS3, NS4 и NS5, служат существенным дополнением иммуноферментных тест-систем и позволяют выявлять оставшуюся часть лиц (до 100%), инфицированных вирусом гепатита С.

Коммерческие тест-системы, закупаемые в России и в других странах (Западная Европа), обладают высокими диагностическими свойствами — чувствительностью и специфичностью. Наш анализ показал, что основные диагностические характеристики ввозимых в Беларусь тест-систем, предназначенных для первичного скрининга сывороток крови пациентов на антитела к вирусу гепатита С, обеспечиваются сорбированными в лунки панели почти всех как структурных, так и неструктурных белков вируса.

Иммуноферментная тест-система, разработанная в Беларуси, основана на включении структурного белка core и его мультиплицированной иммунодоминантной части, а также неструктурного белка NS3. Как показала наша практика, у части пациентов, примерно 1 на 1000, в крови имеются антитела к белку NS3 и нет (или в низких титрах) антител к белку core. Остальные неструктурные белки служат дополнением к структурному белку core и, по нашим наблюдениям, являются прогностическими для гепатита С и, наряду с белком core, должны быть включенными в конфирматорные тест-системы, поскольку повышают чувствительность диагностикумов практически до 100%. Существенным недостатком неструктурных белков вируса гепатита С является их способность, в отличие от белка core, существенно увеличивать число ложно-положительных реакций, т.е. снижать специфичность.

Целью настоящих исследований было сравнить тест-системы российского и белорусского производителей, рекомендуемых для первичного скрининга антител у пациентов, на предмет их чувствительности и специфичности.

Материалы и методы. *Диагностические тест-системы*. Всего было протестировано 3 диагностические тест-системы: 2 российские (ВБ и ДС) и 1 белорусская (БР), которые зарегистрированы в Республике Беларусь или Российской Федерации и рекомендованы для использования в диагностической практике стран производителей.

Сыворотки для тестирования. Положительные и отрицательные сыворотки были получены из Городской инфекционной клинической больницы (ГИКБ) г. Минска после тестирования коммерческой, зарегистрированной в Республике Беларусь иммуноферментной тест-системой, с последующим подтверждением методом ПЦР-анализа. Всего протестировано 50 положительных и 40 отрицательных сывороток.

Чувствительность и специфичность тест-систем. Чувствительность рассчитывали по формуле:

$$\text{число ПС}/(\text{число ПС}+\text{число ЛО})\times 100\%,$$

где ПС — положительные сыворотки;

ЛО — ложно-отрицательные сыворотки.

Специфичность рассчитывали по формуле:

$$\text{число ОС}/(\text{число ОС}+\text{число ЛП})\times 100\%,$$

где ОС — отрицательные сыворотки;

ЛП — ложно-положительные сыворотки.

Результаты и обсуждение. Заведомо положительные и отрицательные сыворотки были протестированы в параллельных экспериментах на предмет диагностической значимости анализируемых тест-систем. Постановку реакций осуществляли в соответствии с инструкциями по применению, приложенные к наборам. Сравнительный анализ оптической плотности (ОП) контрольных образцов и контроля конъюгата (к/к) трех диагностических тест-систем приведен в таблице 1.

Таблица 1 – Средние значения оптической плотности контрольных образцов трех диагностических тест-систем

Тест-системы	Средние значения ОП			
	положит. контроля	отрицат. контроля	контроль конъюгата	ОП критическое
ВБ (Россия)	2,464	0,040	0,038	0,240
ДС (Россия)	3,841	0,044	—	0,224
БР (Беларусь)	2,311	0,151	0,067	0,351

Из таблицы 1 видно, что наибольший показатель ОП положительных контролей выявлен в диагностической тест-системе ДС (Россия) — 3,841, наименьший — в БР (Беларусь) — 2,311. Для тест-системы ВБ этот показатель составил 2,464. В этой связи можно отметить, что ОП в диапазоне значений 2,0–4,0 и выше для положительных образцов одинаково четко регистрируется как визуально, так и с помощью считывающих устройств. В то же время отрицательные образцы четко распознаются глазом как светлые лунки до значений ОП = 0,2. Стремление разработчиков тест-систем к созданию иммуноферментных диагностикумов, работающих по принципу «все или ничего», но предназначенных для первичного скрининга, лишает возможности пользователей к анализу сывороток, имеющих допороговые значения ОП. Этот вывод объясняет логику разработчиков, стремящихся уйти от большого количества ложно-положительных результатов при включении большого количества неструктурных белков для достижения этого принципа. Анализ 50 положительных и 40 отрицательных сывороток, полученных из ГИКБ г. Минска, представлен в таблице 2.

Таблица 2 — Результаты сравнительного тестирования заведомо положительных и отрицательных сывороток на гепатит С в ТИФА

Тест-системы	Всего протестировано*		Результат	
	Положит.	Отрицат.	Положит.	Отрицат.
ВБ (Россия)	50	40	53	37
ДС (Россия)	20	22	21	21
БР (Беларусь)	50	40	49	41

* Тестировались одни и те же сыворотки для всех трех систем.

Из таблицы 2 видно, что одни и те же сыворотки, использованные в трех разных тест-системах, дали разные результаты. Это свидетельствует о том, что разработчики тест-систем использовали разные как по количеству, так и по качеству пептиды вируса гепатита С. Это не могло не повлиять на результативность данных тест-систем, оцениваемую по двум основным критериям — чувствительности и специфичности. Результаты диагностической ценности этих тест-систем представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Чувствительность и специфичность трех тест-систем

Параметры	ВБ (Россия)	ДС (Россия)	БР (Беларусь)
Чувствительность	100%	100%	98,0%
Специфичность	94,3%	95,2%	100,0%

Таким образом, предварительный анализ показал, что при использовании заведомо положительных и отрицательных сывороток крови пациентов ГИКБ г. Минска для расчета чувствительности и специфичности анализируемых двух российских и одной белорусской тест-систем, предназначенных для первичного скрининга специфических к вирусу гепатита С антител, оказалось, что по чувствительности отечественная тест-система уступает российским, тогда как по специфичности превосходит последние (таблица 3). Вместе с тем, для окончательного вывода нужны более масштабные исследования в инфекционных клиниках и станциях переливания крови страны.

В дополнение к изложенному выше следует отметить, что с учетом потребностей пользователей тест-систем, а это, главным образом, службы переливания крови и инфекционные клиники, ложно-положительные результаты нежелательны для лабораторной службы инфекционных клиник, тогда как ложно-отрицательные — для служб переливания крови. Однако существование подтверждающих тест-систем (ПЦР-анализ и конфирматорные иммуноферментные тесты) позволяют с высокой степенью вероятности корректировать результаты первичного скрининга. В Беларуси разработана и зарегистрирована тест-система, позволяющая определять наличие РНК вируса гепатита С на основе метода ПЦР, а также проходит апробацию конфирматорная иммуноферментная тест-система, предназначенная анализировать как острые и хронические случаи гепатита С, так и определять прогностические критерии течения инфекции у больных с ярко выраженным характером течения данной инфекции.

Литература

1. Kim, W.R. The burden of hepatitis C in the United States / W.R. Kim // Hepatology. — 2002. — Vol. 36, suppl. 1. — S93–S98.

2. Михайлов, М.И. Лабораторная диагностика гепатита С. Серологические маркеры и методы их выявления / М.И. Михайлов // Вопр. вирусологии. — 1995. — № 6. — С. 251–253.

3. Масалова, О.В. Вирусный гепатит С: новые подходы к изучению патогенеза и разработка средств диагностики и профилактики: автореф. дис. …д-ра биол. наук: 03.02.02 / О.В. Масалова; НИИ вирусол. им. Д.И. Ивановского. — М., 2011. — 45 с.

Поступила 16.09.2011

SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF ENZYME IMMUNOASSAY KITS FOR DETECTION OF ANTIBODIES TO HEPATITIS C VIRUS

Vladyko A.S.[1], Fomina E.G.[1], Scheslenok E.P.[1], Krasko A.G.[1], [1]Shkolina T.V., Rogacheva T.A.[2], Ignatjev G.M.[1]

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Municipal Infectious Clinical Hospital, Minsk, Belarus

Comparative analysis of two Russian and one Belarusian enzyme immunoassay kits for detection of antibodies to hepatitis C virus was carried out. The sensitivity and specificity options were analyzed. It was shown the sensitivity of Belarusian test system was not significantly below Russian one, whereas specificity was higher.

Keywords: hepatitis C, enzyme immunoassay, sensitivity, specificity.

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

Гашникова Н.М., Косогова Т.А, Пучкова Л.И., Балахнин С.М., Теплякова Т.В.

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. Базидиальные грибы являются перспективными продуцентами для разработки препаратов против вируса иммунодефицита человека. Наиболее эффективными, по результатам настоящего исследования, были экстракты грибов из родов *Inonotus, Lentinus* и *Pleurotus*. Индекс селективности водного экстракта гриба *Inonotus obliquus* (IS_{50}) превышает 19 000, а 10% раствора аптечного препарата «Бефунгин», содержащего 30–32% экстрактивных веществ чаги, равен 20 533.

Ключевые слова: базидиальные грибы, экстракты, антиретровирусные препараты, вирус иммунодефицита человека.

Введение. В последнее десятилетие значительно возрос интерес к исследованию биологически активных метаболитов грибов-базидиомицетов с целью создания лекарств на основе природных веществ. Известно, что базидиальные грибы, многие из которых являются съедобными, содержат широкий спектр различных биологически активных компонентов — полисахариды, органические

кислоты, липиды, стероидные вещества, тетрациклические тритерпены и другие соединения,— проявляющих противоопухолевую, антибластическую активность, цитостатическое действие и противовирусный эффект. Класс базидиальных грибов включает свыше 15 тыс. видов, более 100 видов используются в традиционной медицине Китая, Кореи, Японии и других юго-восточных стран [1]. Выявлены некоторые природные соединения грибов, оказывающие ингибирующее действие на вирус иммунодефицита человека. Известны данные о подавлении ВИЧ-1 экстрактом гриба *Trametes versicolor*, содержащим полисахаридпептиды [2]. Аналогичные результаты получены при исследовании экстрактов гриба *Grifola frondosa*, действующим началом которого является глюкан [3]. Имеются научные сведения об антивирусной активности съедобного гриба шиитаке — *Lentinus edodes* — в отношении ВИЧ-1. Этот гриб широко применяется в медицинских целях в Юго-Восточной Азии. Полисахарид лентинан, образующийся в клеточных стенках гриба, обладает иммуномодулирующим, антибактериальным и антивирусным свойствами. Известно применение экстракта мицелиальной культуры гриба *Fuscoporia oblique* (Fr.) Aoshima, выращенного на искусственной жидкой питательной среде, в качестве активного компонента, ингибирующего вирус иммунодефицита человека [4]. Описано также применение экстракта черной наружной части склероция этого же гриба в качестве активного ингредиента, ингибирующего вирус иммунодефицита человека [5].

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» располагает собственной коллекцией базидиальных грибов, отработанными методами их культивирования и вирусологической базой, позволяющей проводить поиск эффективных в отношении ряда вирусов препаратов.

Цель наших исследований заключалась в проверке противовирусной активности водных экстрактов базидиальных грибов в отношении ВИЧ-1.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили виды и штаммы высших базидиальных грибов из следующих родов*: Ganoderma*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Inonotus*, *Laetiporus, Volvariella*.

Водные экстракты получали из плодовых тел или мицелия грибов, выращенных на питательных средах. Для экстракции активных компонентов смеси сухих порошков из грибов с водой (1:2–1:10) обрабатывали ультразвуком в течение10 минут (46/2, 52, 07-09, 07-10, 07-12) или прогревали на водяной бане от 20 до 60 минут (07-34/1, 07-45/1, 08-09, 08-10). Суспензии двух образцов (07-03, 07-05) не подвергались таким обработкам. Из аптечного препарата «Бефунгин» готовили 10% водный раствор (08-08).

Исследование противовирусной активности соединений в отношении ВИЧ-1 проводили на перевиваемой линии лимфоцитов человека МТ-4. Клетки инфицировали ВИЧ-1, штамм ГКВ 4046, с множественностью заражения 0,2–0,5 инфекционных единиц на клетку.

Токсичность экстрактов исследовали методом прижизненного окрашивания клеток МТТ [6]. Определяли концентрацию вещества, не оказывающую токсического действия на клетки МТ-4.

Профилактическое действие препаратов оценивали по подавлению вируспродукции в клетках МТ-4 при добавлении препарата при адсорбции вируса. Терапевтическое действие препаратов оценивали по подавлению продукции ВИЧ-1 в клетках МТ-4 при добавлении препаратов грибов после адсорбции вируса на поверхности клетки. Контролями служили неинфицированные клетки МТ-4; инфицированные ВИЧ-1 клетки МТ-4 без добавления препаратов; в качестве положительного контроля препарата в экспериментах использовали азидотимидин (AZT). Планшеты инкубировали при 37 ºС в атмосфере 5% CO_2 в течение 3 суток.

Анти-ВИЧ-активность препаратов оценивали по изменению накопления вирусного белка p24 в контрольных и опытных образцах количественным определением p24 методом прямого иммуноферментного анализа с использованием тест-системы «ВектоВИЧ-1 p24-антиген-подтверждающий тест ФСП 42-0117-5686-04» (Вектор-Бест, Россия). Определяли 50% и 100% ингибирующие концентрации исследуемых препаратов (IC_{50}, IC_{100}). Индекс селективности (IS) рассчитывали по соотношению CC_{50} к IC_{50} для каждого независимого эксперимента. Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами [7].

Результаты исследования и обсуждение. В таблице 1 представлены характеристики экстрактов базидиальных грибов, исследованных в данной работе. Анализ цитотоксичности образцов, проведенный на культуре лимфобластоидной линии клеток человека МТ-4, показал, что диапазон концентраций экстрактов, токсичный для 50% клеток, варьирует от 0,0058 до 0,616 мг/мл (таблица 1).

Таблица 1 — Содержание сухих веществ в экстрактах, полученных из базидиальных грибов. Цитотоксические характеристики исследуемых образцов

Род грибов	Исследуемый образец	Содержание сухого вещества в экстракте, г/мл	*Нетоксичная концентрация экстракта, мг/мл	
			CC_{50}	CC_{100}
Pleurotus	07-09	2,5 ± 0,06	0,025 ± 0,007	0,004 ± 0,001
	07-10	3,5 ± 0,07	0,044 ± 0,009	0,010 ± 0,003
	07-12	2,4 ± 0,11	0,060 ± 0,011	0,008 ± 0,005
	08-04	1,5 ± 0,09	0,075 ± 0,023	0,002 ± 0,001
Lentinus	08-06	2,3 ± 0,05	0,115 ± 0,034	0,004 ± 0,002
	52	3,2 ± 0,07	0,160 ± 0,069	0,040 ± 0,013
Ganoderma	07-03	5,0 ± 0,11	0,0078 ± 0,002	0,008 ± 0,005
Laetiporus	08-09	5,0 ± 0,09	0,0503 ± 0,009	0,008 ± 0,002
Inonotus	07-05	3,7 ± 0,05	0,0058 ± 0,009	0,006 ± 0,001
	07-45/1	15,2 ± 0,11	0,380 ± 0,0162	0,050 ± 0,018
	08-08	19,7 ± 0,14	0,616 ± 0,0490	0,206 ± 0,058
	08-10	10,0 ± 0,07	0,125 ± 0,0130	0,031 ± 0,009
Volvariella	07-34/1	5,0 ± 0,06	0,25 ± 0,0052	0,060 ± 0,014

Примечание — * — CC_{50}, CC_{100}, цитотоксическая концентрация, при которой клетки сохраняют 50% и 100% жизнеспособность, результат трех независимых экспериментов

В таблице 2 приведены результаты оценки антиретровирусной эффективности экстрактов базидиальных грибов. Анализ полученных данных показывает, что наибольшую эффективность в отношении ВИЧ-1 проявили образцы из чаги *Inonotus obliquus*. Готовый аптечный препарат «Бефунгин» (образец 08-08), который представляет собой концентрированный водный экстракт (30–32 %) с добавлением солей кобальта, имея самое высокое содержание экстрактивных веществ, оказывал выраженный ингибирующий эффект на ВИЧ-1 как при одновременном внесении с вирусом в культуру клеток, так и при внесении его после инфицирования культуры.

Таблица 2 — Антиретровирусная эффективность экстрактов высших базидиальных грибов, определенная на модели культуры клеток МТ-4, инфицированных ВИЧ-1

Род грибов	Исследуемый образец	Профилактическая анти-ВИЧ эффективность экстракта		Терапевтическая анти-ВИЧ эффективность экстракта	
		*IC_{50}, мкг/мл	**IS_{50}	*IC_{50}, мкг/мл	**IS_{50}
Pleurotus	07-09	0,04 ± 0,01	625 ± 87	0,08 ± 0,02	313 ± 82
	07-10	0,11 ± 0,03	400 ± 104	0,11 ± 0,01	400 ± 46
	07-12	0,08 ± 0,01	750 ± 95	н.о.	н.о.
	08-04	0,19 ± 0,04	395 ± 56	н.о.	н.о.
Lentinus	08-06	0,07 ± 0,02	1643 ± 509	0,14 ± 0,03	821 ± 164
	52	0,05 ± 0,01	3200 ± 651	0,10 ± 0,02	1600 ± 388
Ganoderma	07-03	0,78 ± 0,14	10 ± 2	0,78 ± 0,09	10 ± 2
Laetiporus	08-09	0,62 ± 0,02	81 ± 6	н.о.	н.о.
Inonotus	07-05	0,06 ± 0,01	97 ± 15	0,12 ± 0,05	48 ± 23
	07-45/1	<0,02	>19000	0,09 ± 0,02	4222 ± 967
	08-08	<0,03	>20533	0,03 ± 0,01	20533 ± 780
	08-10	< 0,08	>1562	0,16 ± 0,01	781 ± 107
Volvariella	07-34/1	1,56 ± 0,90	160 ± 54	6,25 ± 1,23	40 ± 8

Примечания:

1. * — IC_{50}, ингибирующая концентрация исследуемого препарата, вызывающая 50% подавление прироста вирусспецифического белка p24 при внесении в культуру клеток вируса и препарата, результат трех независимых экспериментов

2. ** — IS индекс селективности рассчитывали как отношение CC_{50} к IC_{50} для каждого независимого эксперимента

3. н.о. — не определено

Этот же образец обладает наибольшим терапевтическим диапазоном концентраций и наивысшим индексом селективности из всех исследованных образцов. Близкие характеристики противовирусной эффективности имеет 25% экстракт *Inonotus obliquus* (образец 07-45/1), полученный путем прогревания водной суспензии чаги на водяной бане. Данный образец обладает низкой токсичностью и, соответственно, широким терапевтическим диапазоном, высоким индексом селективности.

Образцы чаги, содержащие меньшую концентрацию вещества, либо приготовленные без прогревания (08-10, 07-05), показали более слабую эффективность в отношении ВИЧ-1.

Образцы, полученные из *Lentinus edodes*, также характеризовались достаточно высокой активностью в отношении подавления репродукции ВИЧ-1. Образец 52, полученный из биомассы 20-суточного глубинного мицелия гриба шиитаке (*L. edodes,* 3760), при относительно низкой токсичности для клеток имеет индекс селективности 3200, тогда как IS_{50} образца 46/2 (биомасса гриба выращена на поверхности жидкой среды) составляет 1643.

Большая часть исследованных в работе экстрактов высших базидиальных грибов обладает способностью подавлять репликацию ВИЧ-1 на модели острой инфекции, чувствительной к вирусу культуры клеток. Необходимо отметить, что экстракты *Inonotus obliquus*, показавшие наибольшую активность в отношении ингибирования репродукции ВИЧ-1, содержали не менее 10 мг/мл сухого вещества в образце (образцы 07-45/1, 08-08, 08-10). Препараты *Inonotus obliquus* с более низкой концентрацией активных веществ были менее эффективны против ВИЧ-1. Возможно, выбранная нами концентрация экстрактов для изучения других видов грибов, является недостаточной для полноценного проявления их противовирусной активности. Проведенные исследования также выявили, что на цитотоксичность и противовирусные свойства экстрактов, полученных из базидиальных грибов, значительно влияют как способы их культивирования, так и способы экстрагирования из грибов биологически активных веществ. Так, образец 07-05 был приготовлен без нагревания водной суспензии, а 08-10 и 07-45/1 — путем прогревания на водяной бане в течение 20 минут. Концентрация сухого вещества в экстрактах 08-10 и 07-45/1 была больше, чем в образце 07-05 (в 2,7 и в 4,1 раза соответственно), тем не менее наблюдалась обратная зависимость — с увеличением концентрации экстрактов их токсичность понижалась (в 21,6 и в 65,5 соответственно).

Образец 52 из *L. edodes*, полученный из биомассы гриба глубинной культуры, обладал более высокими противовирусными свойствами, чем образец 46/2, биомасса которого была выращена на поверхности культуральной среды. В результате исследований ряда дереворазрушающих грибов (*Lentinus, Ganoderma*) были получены аналогичные данные, показывающие, что по содержанию некоторых активных компонентов, в том числе полисахаридов, глубинный мицелий значительно превосходит даже плодовые тела грибов [8].

Из других исследованных экстрактов грибов интересны образцы из рода Вешенка (*Pleurotus*). Грибы данного рода представляют пищевую ценность и культивируются во многих странах мира. Все исследованные виды вешенки проявляют анти-ВИЧ-активность. Из результатов исследований других авторов известно, что четыре вида вешенки, в том числе *Pl. djamor* и *Pl. ostreatus*, обладали антимикробной активностью, а из гриба *Pleurotus ostreatus* (вешенка устричная) был выделен убиквитинподобный гликопротеин, который проявлял активность против обратной транскриптазы ВИЧ-1 [9]. Среди испытанных нами видов наиболее широкое распространение в природе, в том числе и в Сибири, представляет вешенка *Pleurotus ostreatus.* Это делает возможным поиск штаммов, которые по противовирусной эффективности не будут уступать другим видам вешенки, как, например, *Pl. eryngii* (образец 07-09) и *Pl. djamor* (образец 07-12), проявившим в данном исследовании наиболее высокие показатели в отношении ВИЧ-1.

Заключение. Несмотря на большое количество разработанных в настоящее время анти-ВИЧ-препаратов, существует проблема эффективности и доступности противовирусных лекарственных средств. Наиболее серьезные проблемы — это токсичность эффективных препаратов и их высокая стоимость. Кроме того, к большинству применяемых химически синтезированных лекарственных средств ВИЧ-1 способен вырабатывать устойчивость. Поэтому крайне актуальной остается проблема разработки эффективных и недорогих противовирусных средств, не обладающих токсическим действием на организм человека и характеризующихся высоким барьером к развитию устойчивости ВИЧ-1.

В данной работе продемонстрирована высокая антиретровирусная активность гриба *Inonotus obliquus*, что, возможно, связано с его сложным биохимическим составом, главную роль в котором играет полифенолкарбоновый комплекс (ПФК), включающий также меланины, гуминовые кислоты [10].

Выявлена перспективность использования для разработки антиретровирусных средств биологически активных веществ гриба шиитаке (*Lentinus edodes*), так как даже при низких концентрациях экстракт на основе мицелия шиитаке показал высокий индекс селективности.

Эффективность и безопасность препаратов на основе базидиальных грибов в большой мере зависит от способа экстрагирования, фракционирования и очистки активных компонентов.

Проведенные исследования показали, что высшие базидиальные грибы являются перспективным источником для поиска и разработки эффективных, безопасных и экономически доступных препаратов для профилактики и лечения ВИЧ-инфекции.

Литература

1. Белова, Н.В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов в России / Н.В. Белова // Микология и фитопатология. — 2004. — Т. 38, Вып. 2. — С. 1–7.
2. Collins, R.A. Polysaccaropeptide from *Trametes versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection / R.A. Collins, T.B. Ng // Life Sci. — 1997. — Vol. 60, N 25. — P. 383–387.
3. Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) glucan in HIV-infection patients / H. Nanba [et al.] // Mycoscience. — 2000. — Vol. 41. — P. 293–295.
4. Заявка США № 20040105859, МПК A61 35/78, опубл. 03.06.2004.
5. Anti-HIV agent: пат. JP 9191891 Японии, МПК A 61K 36/06, A 61K 35/84, C 12P 1/02 / M. Honda, K. Sakuma, T. Emura, O. Yamazaki; заявитель K. Sakuma. — № JP19960023208; заявл. 16. 01.1996; опубл. 29.07.1997.
6. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann. — J. Immunol. Meth. — 1983. — Vol. 65, N 1–2. — P. 55–63.
7. Зайцев, Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной биологии / Г.Н. Зайцев. — М.: Наука, 1984. — 424 с.
8. Бабицкая, В.Г. Углеводы глубинного мицелия ксилотрофных базидиомицетов / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба // Приклад. биохимия и микробиология. — 2004. — Т. 40, № 6. — С. 634–638.
9. Wang, H.X. Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostrestus* mushroom with anti-human immunodeficiency virus, translation-inhibitory and ribonuclease activities / H.X. Wang, and T.B. Ng // Biochem. Biopnys. Res. Commun. — 2000. — Vol. 256. — P. 587–593.
10. Физико-химические свойства меланинов, образуемых чагой в природных условиях и при культивировании / Т.А. Кукулянская [и др.] // Приклад. биохимия и микробиология. — 2002. — Т. 38, № 1. — С. 68–72.

Поступила 19.08.2011

ANTIVIRAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM BASIDIOMYCETES AGAINST HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS

Gashnikova N.M., Kosogova T.A., Puchkova L.I., Pronyaeva T.R., Balakhnin S.M., Teplyakova T.V.

State Research Center of Virology & Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Basidiomycetes are the most promising producers for the development of drugs against human immunodeficiency virus. According to the results obtained the most effective were extracts from fungi of the genera *Inonotus, Lentinus* and *Pleurotus*. The high therapeutic activity of an aqueous extracts of the mushroom chaga, *Inonotus obliquus* (IS_{50}) was above 19 000, and 10% solution of pharmaceutical drug "Befungin" containing 30–32% chaga extractives was 20533.

Keywords: basidiomycetes, extracts, antiretroviral drugs, human immunodeficiency virus.

ОЦЕНКА АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ПРОИЗВОДНЫХ ДИФЕНОЛОВ

Кучеров И.И., Рытик П.Г.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Представлены результаты комплексных испытаний *in vitro* металлокомплексов производных дифенолов на противовирусную активность в отношении вируса иммунодефицита человека. Выявлено одно соединение, обладающее высокой степенью активности. Установлена корреляция между выраженностью антивирусных свойств соединений и входящим в состав комплекса металлом.

Ключевые слова: антиретровирусная (АРВ) активность, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), металлокомплексы (МК), непрямая иммунофлуоресценция (НИФ), окраска трипановым синим (ОТС), формазановый тест (ФТ).

Введение. Отмечаемый в последние годы почти повсеместно резкий подъем заболеваемости ВИЧ/СПИДом является прямым следствием недостаточности предпринимаемых мер по борьбе

с инфекцией. Слабая надежда на создание в обозримом будущем эффективной вакцины и явная несостоятельность используемых методов неспецифической профилактики усугубляют пессимизм в решении этой социальной проблемы. Разработанная стратегия высокоактивной АРВ-терапии (HAART) стала одним из самых существенных достижений в борьбе с ВИЧ/СПИДом [1, 2]. Тем не менее и этот подход не лишен недостатков. Основной проявляется в формировании у возбудителя резистентности (включая перекрестную) к используемым этиотропным ингибиторам ВИЧ [3]. Этот факт обязывает расширять поиск новых антивирусных средств [4]. Именно эту цель преследует направленный синтез химических соединений, прототипом которых выступают хорошо зарекомендовавшие себя лекарственные препараты. Некоторые из синтезированных образцов по своей биоактивности могут превзойти свои известные аналоги.

Перспективными для создания новых лекарственных средств объектами считаются металлокомплексы (МК), поскольку ионы металлов способны изменять силу и направленность фармакологических эффектов органических соединений (лигандов). Испытания биологической активности некоторых из них на животных и клеточных модельных системах убеждают в правильности такого подхода. Так, 3,5-ди-трет-бутилпирокатехин (лиганд LI) оказался активным антиоксидантом с выраженными противовоспалительными и антигипоксическими свойствами. Лиганд LII (4,6-ди-трет-бутил-3-(2-гидроксиэтилсульфанил) пирокатехин) проявлял противовирусную, нейро- и ноотропную активность [5]. Некоторые МК, в первую очередь комплексы меди, активны в отношении многих бактерий (в первую очередь, грамположительных), дрожжей и грибков [6]. Показано также, что комплекс серебра (Ag) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил) уксусной кислотой (лиганд LIII) отличался бактериостатическим эффектом в отношении многих микроорганизмов [7].

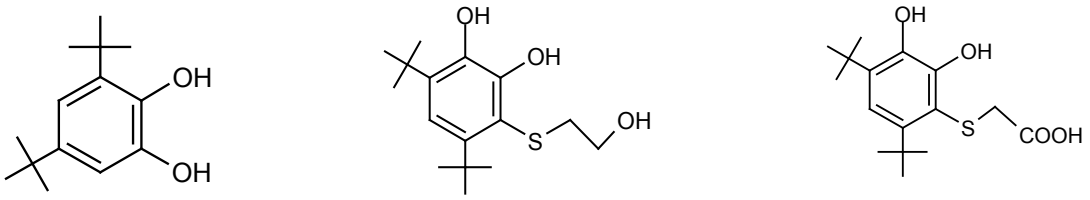
Целью настоящей работы являлось проведение комплексных испытаний металлокомплексов различной конфигурации на антиретровирусную активность и изучение влияния отдельных составляющих МК на репродукцию ВИЧ *in vitro*.

Материалы и методы. Испытания проводили на перевиваемой Т-лимфобластоидной линии клеток человека линии МТ-4, поддерживаемых путем пассирования на питательной среде RPMI-1640 через каждые 48 часов. В качестве инфекционного агента использовали высокорепликативный (rapid/high) штамм ВИЧ-1_{zmb} (титр — 6,0 lg $ТЦД_{50}$), выделенный от проживавшего на территории республики вирусоносителя [8]. Образцы соединений, синтезированные по оригинальной технологии, были предоставлены сотрудниками химического факультета БГУ (рук. проф. Шадыро О.И.). Из испытуемых образцов готовили спиртовые *stock*-растворы с исходной концентрацией 5,0 мг/мл. Титрование полученных растворов вели с 5-кратным шагом на полной питательной среде RPMI-1640 в лунках 96-луночных панелей («Costar», США) с конечным объемом реакционной смеси 200 мкл. Испытания проводили в терапевтическом варианте, предусматривающем внесение вируса непосредственно вслед за образцами тестируемых препаратов. Каждый эксперимент сопровождался параллельным титрованием эталонного ингибитора ВИЧ — азидотимидина (АЗТ).

Влияние испытуемых соединений на репродукцию ВИЧ оценивали тремя методиками: формазановым тестом (ФТ) в МТТ-варианте, прижизненной окраской клеток трипановым синим (ОТС) и непрямой иммунофлуоресценцией (НИФ). В качестве верифицирующего теста использовали иммуноферментный анализ (ИФА) по детекции капсидного белка ВИЧ-1 p24. Учет результатов проводили: ИФА — на p24 через 24 часа, НИФ — на 3-и, а ФТ и ОТС — на 4-е сутки после инфицирования клеток. Для учета результатов методикой ОТС использовали инвертированный световой микроскоп «Reicher-Jung» (MicroStar), НИФ — люминесцентный микроскоп (Ломо ИЗ), ФТ ($\lambda = 540$ нм) и ИФА ($\lambda = 450$ нм) — спектрофотометр Reader 230S («Organon Teknika»). О наличии антивирусных свойств соединений судили по величине химиотерапевтического индекса (ХТИ) — соотношению максимально переносимой (МПК) и минимально активной концентраций (МАК) препаратов. Показатели ХТИ ниже 2,0 указывали на отсутствие или очень низкую, 2–8 — средневыраженную, выше 8,0 — высокую степень антивирусной активности исследуемых образцов [9].

Результаты и их обсуждение. Всего было испытано 14 МК с производными пространственно экранированных дифенолов (лигандов): 3 были представлены медными комплексами (Cu), по 2 с кобальтом (Co), марганцем (Mn), никелем (Ni) и цинком (Zn). Также было изучено по одному металлокомплексу с висмутом (Bi), железом (Fe) и серебром (Ag).

В первой серии экспериментов изучались лигандные конструкции некоторых производных дифенолов в МК с медью и серебром. Металлокомплексы имели в своем составе 3 вида лигандов: 3,5-ди-трет-бутилпирокатехин (LI), 4,6-ди-трет-бутил-3-(2-гидрооксиэтилсульфанил) пирокатехин (LII) и 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидрофенилсульфанил)уксусной кислоты (LIII) (рисунок).



LI LII LIII

Рисунок — Лигандные конструкции производных дифенолов в металлокомплексах

Полученные данные (таблица 1) позволили установить следующие факты. МПК исследованных соединений располагались в диапазоне 3,17–7,82 мкг/мл, что указывает на достаточно высокую степень их цитотоксичности для клеток. Конструкция лигандов оказывает существенное влияние на АРВ-свойства металлокомплексов. Так, если медный комплекс с LII проявил себя в качестве среднеактивного соединения (ХТИ = 7,43), то его замена в МК на LIII приводила к существенному снижению его вирусингибирующей активности (ХТИ = 4,32). Наличие же в составе МК лиганда LI полностью нивелировало его анти-ВИЧ-активность.

Таблица 1 — Результаты испытаний металлокомплексов на антиретровирусную активность

Образцы	АРВ активность некоторых металлокомплексов в испытаниях различными методиками					
	ФТ		ОТС		НИФ	
	МАК (мкг/мл)	ХТИ	МАК (мкг/мл)	ХТИ	МАК (мкг/мл)	ХТИ
$Cu(L^{I})_2$	1,17 ± 0,13	2,71	не активен	–	5,02 ± 0,43	0,63
$Cu(L^{II})_2$	1,05 ± 0,22	7,43	1,86 ± 0,26	4,19	3,04 ± 0,36	2,57
$Cu(L^{III})_2$	1,08 ± 0,15	4,32	1,35 ± 0,19	3,46	1,92 ± 0,23	2,43
$Ag(L^{III})_2$	2,77 ± 0,28	2,11	2,02 ± 0,31	2,89	3,24 ± 0,39	1,80

С другой стороны, отмечено и непосредственное влияние присутствующего в составе МК металла на биоактивность всего комплекса. Например, установлено, что замена меди на серебро в МК с LIII проводила к заметному понижению уровня его антивирусного действия. Для уточнения этого факта была проведена дополнительная серия экспериментов. В ней изучалось воздействие на вирус комплексов некоторых металлов (меди, кобальта и никеля) с лигандом (L) 4,6-ди-трет-бутил-3-[(2-гидроксиэтил)тио]бензен-1,2диолом (таблица 2).

Таблица 2 — Влияние металлов на анти-ВИЧ-активность металлокомплексов

Образцы МК	МПК (мкг/мл)	Показатели ХТИ металлокомплексов в испытаниях на АРВ-активность		
		ФТ	ОТС	НИФ
L	4,0 ± 0,35	1,09	1,74	1,01
CuL_2	9,0 ± 0,78	8,36	5,14	4,49
CoL_2	13,5 ± 1,45	не активен	4,22	3,91
NiL_2	14,0 ± 1,50	5,91	2,78	не активен

Полученные данные продемонстрировали крайне низкую степень антивирусной активности «чистого» лиганда и его высокую токсичность для лимфоидных клеток. Введение же в состав лиганда ионов металлов усиливало его АРВ-свойства и снижало его цитотоксичность. Наиболее высокие уровни ВИЧ-ингибирующей активности (судя, главным образом, по результатам ФТ) отмечены у металлокомплекса с медью (CuL_2). Введение в состав МК кобальта или никеля было менее эффективно.

Для проверки полученных данных содержащий медь МК был протестирован на способность подавления репликации ВИЧ в инфицированных клетках (ИФА на p24 ВИЧ). Тестовые результаты испытаний приведены в таблице 3.

Таблица 3 — Снижение продукции вирусного белка p24 ВИЧ-1 клетками МТ-4 под действием МК меди

Контроль вируса (пкг/мл)	АЗТ (мкг/мл)		МК CuL_2 (мкг/мл)			
	0,2	0,04	0,6	4,0	0,8	0,16
180 ± 3,2 (0) *)	35 ± 1,3 (80,6%) $p < 0,01$	53 ± 2,1 (70,6%) $p < 0,01$	44 ± 1,3 (75,6%) $p < 0,01$	38 ± 1,1 (78,9%) $p < 0,01$	39 ± 0,9 (78,3%) $p < 0,01$	52 ± 2,3 (71,1%) $p < 0,01$

Примечание —*) — в скобках указан уровень снижения продукции p24 (в %) по сравнению с контролем вируса

Как видно из представленных данных, указанное соединение оказалось мощным ингибитором репродукции вирусного антигена p24. Уровень его активности был сопоставим с действием, оказываемым АЗТ. Так, при концентрациях АЗТ 0,2 и 0,04 мкг/мл имело место существенное снижение выработки p24 с 180 ± 3,2 пг/мл (контроль вируса) до 35 ± 1,3 и 53 ± 2,1 пг/мл соответственно, т.е. на 80,6 и 70,6% ($p < 0,01$).

В то же время и в присутствии тестируемого соединения в дозах 4,0–0,16 мкг/мл зарегистрировано существенное подавление процесса синтеза вирусного антигена p24 с 180 ± 3,2 пг/мл до уровней 38–52 пг/мл (на 71,1–78,9%, $p < 0,01$).

Заключение. Изучение комплексов некоторых металлов с синтетическими лигандами позволило установить несколько закономерностей. Во-первых, у некоторых лигандов отмечены слабовыраженные антиретровирусные свойства. Во-вторых, активность металлокомплексов с лигандами напрямую зависит как от самого лиганда, так и входящего в комплекс металла. Выраженность ВИЧ-ингибирующих свойств у МК в большинстве случаев выше, чем у «чистого» лиганда. В-третьих, присутствие металла в комплексе, как правило, существенно снижает цитотоксичность лиганда, независимо от природы последнего. Наиболее выраженные АРВ-свойства проявили металлокомплексы меди [10].

Авторы выражают глубокую благодарность Л.О. Мистрюковой и И.А. Подольской за оказание помощи в проведении испытаний.

Литература

1. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment / V. Simon [et al.] // Lancet. — 2006. — Vol. 368. — P. 489–504.

2. History of viral suppression on combination antiretroviral therapy as a predictor of virological failure after a treatment change / J. Reekie [et al.] // HIV Med. — 2010. — Vol. 11, N 7. — P. 469–478.

3. Two-months-off, four-months-on antiretroviral regimen increases the risk of resistance, compared with continuous therapy: a randomized trial involving West African adults / C. Danel [et al.] // J. Infect. Dis. — 2009. — Vol. 199, N 1. — P. 66–76.

4. Novel inhibitors of HIV discovered among existing classes of pharmaceutical compounds indicated for unrelated clinical indications / I.I. Kucherov [et al.] // Curr. Pharm. Des. — 2009. — Vol. 15, N 11. — P. 1187–1190.

5. Синтез и противовирусная активность некоторых производных 3,5-ди-трет-бутилпирокатехина / Д.К. Петрикевич [и др.] // Хим.-фармацевт. журн. — 1995. — № 12. — С. 32–34.

6. Synthesis and biological evaluation of copper (II) complexes of sterically hindered o-aminophenol derivatives as antimicrobial agents / N.V. Loginova [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. — 2006. — Vol. 16, N 20. — P. 5403–5407.

7. Синтез и антимикробная активность комплексов серебра (I) и меди (II) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислотой / А.А. Чернявская [и др.] // Хим.-фармацевт. журн. — 2006. — Т. 40, № 8. — С. 7–9.

8. Биологические свойства ВИЧ, выделенного от вирусоносителя, проживающего в БССР / П.Г. Рытик [и др.] // Вопросы вирусологии. — 1990. — Т. 35, № 5. — С. 389–390.

9. Первичное изучение антивирусных свойств синтетических и природных соединений: метод. рекомендации / В.И. Вотяков [и др.] // Белорус. НИИ эпидемиол. и микробиол. М-ва здравоохр. Респ Беларусь. — Минск, 1986. — 26 с.

10. Synthesis, characterization, antifungal and anti-HIV activities of metal(II) complexes of 4,6-di-*tert*-butyl-3-[(2-hydroxyethyl)thio]benzene-1,2-diol / N.V. Loginova [et al.] // Eur. J. Med.Chem. — 2008. — Vol. 43. № 7. — P. 341–348.

Поступила 18.11.2011

THE ANTIRETROVIRAL ACTIVITY EVALUATION OF DERIVED DIPHENOL METAL COMPLEXES

Kucherov I.I., Rytik P.G.

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

Complex results *in vitro* testing of derived diphenol metal complexes on antiviral activity respecting human immunodeficiency virus are presented. One compound with high level of antiretroviral activity was detected. The correlation between antiviral activity levels and metals including in complexes was determined.

Keywords: antiretroviral (ARV) activity, formazan assay (FA), human immunodeficiency virus (HIV), indirect immunofluorescence (IF), metal complexes (MC), trypan blue staining (TBS).

АНТИВИРУСНЫЙ ПРЕПАРАТ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Турмагамбетова А.С., Зайцева И.А., Коротецкий И.С., Соколова Н.С., Ембергенова А.А., Солдатова И.А., Богоявленский А.П., Березин В.Э.

Институт микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

Резюме. Проведено изучение гемагглютинирующей, нейраминидазной и вирусингибирующей активности композиционного растительного препарата на вирусы гриппа с различной антигенной формулой. Установлено, что композиционный растительный препарат способен ингибировать репродукцию разных вирусов гриппа А в концентрации 0,25 мг/кг веса куриного эмбриона.

Ключевые слова: растительный антивирусный препарат, вирус гриппа.

Введение. Грипп и сегодня, в начале 21 века, продолжает оставаться серьезной медико-социальной проблемой, приводя не только к многочисленным госпитализациям и обострениям хронических болезней, но и к летальным исходам. Ежегодно в мире гриппом болеют от 3 до 5 млн. человек [1]. Эпидемии гриппа возникают с периодичностью 1–3 года, но сезонные вспышки отмечаются ежегодно и наносят большой ущерб здоровью населения и животных, а также приводят к огромным экономическим затратам на лечение и реабилитацию больных, особенно среди групп риска, а также на ликвидацию очагов заболевания среди животных.

Смертность от гриппа и его осложнений занимает первое место среди всех инфекционных заболеваний. В структуре смертности ведущее место занимают пациенты старше 65 лет — 80–90%. Среди пациентов 45–64 лет без сопутствующей патологии смертность составляет примерно 2 случая на 100 тыс. человек [2]. Следовательно, поиск новых антивирусных препаратов является актуальной задачей современной вирусологии.

Целью настоящего исследования являлось изучение антивирусной активности композиции растительных препаратов.

Материалы и методы. В работе были использованы вирусы гриппа птиц (ортомиксовирусы), штамм *A/FPV/Rostock/34* (H7N1), *A/крачка/Южная Африка/1/61* (H5N3), A/*черноголовый хохотун*/Атырау/743/04 (H13N6), *A/малая поганка/Алаколь/791/04* (H4N6), и вирусы гриппа человека, штаммы *A/Алматы/8/98* (H3N2), *A/Ленинград/54/1* (биологический рекомбинант штаммов *A/PR/8/34* и *A/Хабаровск/77*) (H1N1), вирус гриппа свиней *A/swine/Iowa/30* (H1N1). Вирусы выращивали в аллантоисной полости 9–10-дневных куриных эмбрионов в течение 24–36 час при 37 °С.

Гемагглютинирующую активность вирусов определяли по стандартной методике [3] с использованием 1% взвеси куриных эритроцитов.

Для определения степени гемолиза эритроцитов за фиксированное время в пробирки с предварительно приготовленными растворами растительных экстрактов (0,1 мл) вносили 2 мл 2% суспензии куриных эритроцитов. Через 30 мин инкубации с периодическим встряхиванием смесь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин. Степень гемолиза эритроцитов в надосадочной жидкости определяли спектрофотометрически при длине волны 412 нм (гемопротеидная полоса Соре). Растворы готовили на буфере 140 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4. Инкубацию смеси эритроцитов с тестируемыми материалами проводили при 37 °С [4].

Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [5].

Результаты и обсуждения. Из 3 видов казахстанских растений семейств *Caryophillaceae, Leguminoseae* и *Betullaceae* были получены водно-спиртовые экстракты путем обработки растительных материалов 50% водным этанолом при температуре кипения растворителя. В дальнейшем из этих экстрактов получили композиционный растительный препарат, обладающий антивирусной активностью.

В серии экспериментов на модели вирусов гриппа *A/FPV/Rostock/34* (H7N1), *A/крачка/Южная Африка/1/61* (H5N3) и *A/Алматы/8/98* (H3N2) проводилось изучение влияния композиционного растительного препарата в разных дозах на биологическую активность вирусов гриппа (гемагглютинирующая и нейраминидазная активность).

Показано, что в исследуемом диапазоне доз от 0,015 до 1% композиционный растительный препарат способен ингибировать до 40% гемагглютинирующей активности вирусов гриппа (рисунок 1), что может являться одним из механизмов подавления репродукции вирусов.

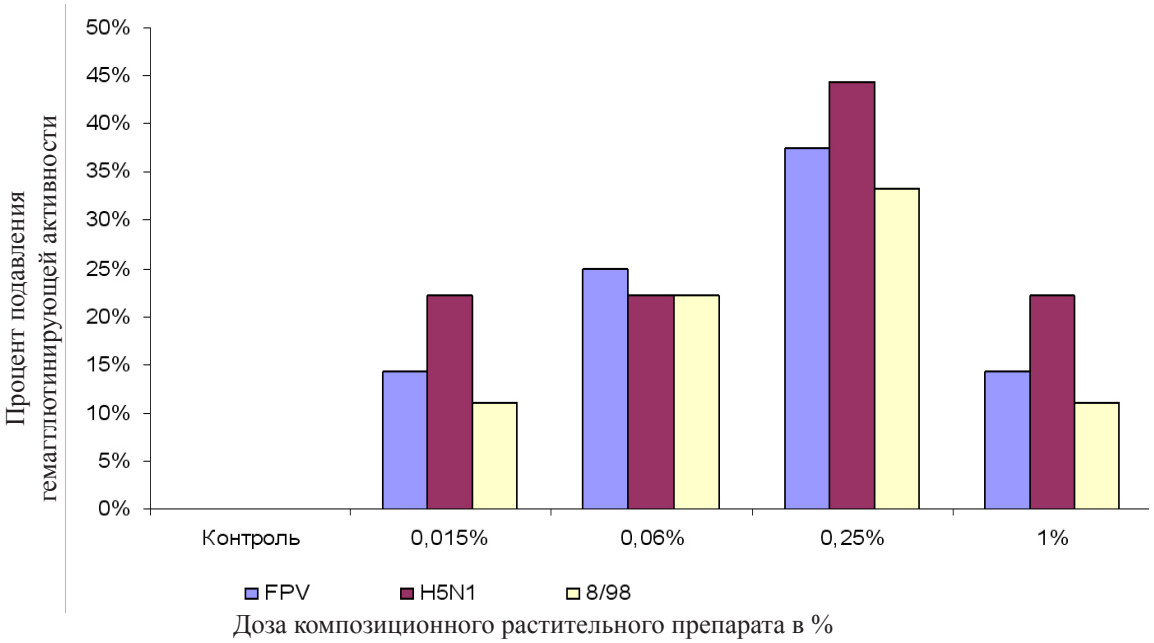


Рисунок 1 — Влияние композиционного растительного препарата на гемагглютинирующую активность вирусов гриппа А

В дальнейшем было проведено изучение влияния композиционного растительного препарата в диапазоне доз от 0,06 до 1% на нейраминидазную активность вирусов гриппа *A/FPV/Rostock/34* (H7N1), *A/крачка/Южная Африка/1/61* (H5N3) и *A/Алматы/8/98* (H3N2). Установлено, что в концентрации 0,25 и 1% препарат ингибировал нейраминидазную активность указанных вирусов до 60% (рисунок 2).

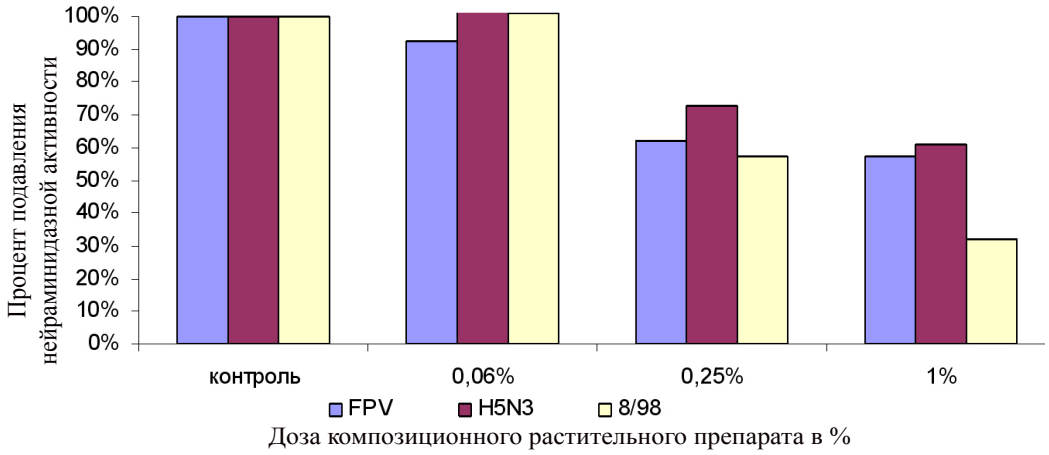


Рисунок 2 — Влияние композиционного растительного препарата на нейраминидазную активность вирусов гриппа А

Далее проводилось изучение влияния композиционного растительного препарата на репродукцию вируса гриппа. Вирусингибирующие свойства соединения изучали в экспериментах с ортомиксовирусами на куриных эмбрионах. Определение противовирусных свойств выполняли методом «скрининг-тест», рассчитанным на нейтрализацию вируса в количестве 100 $ЭИД_{50}$ заданными концентрациями препарата. Критерием противовирусного действия считали наличие отличия титра вируса в сравнении с контролем.

Антивирусная активность препарата была исследована в дозах 0,25 и 0,5 мг/кг массы куриных эмбрионов. Установлено, что в заданных концентрациях композиционный растительный препарат эффективно подавлял репродукцию вируса гриппа, штамм *A/FPV/Rostock/34* (H7N1) (таблица).

Таблица — Вирусингибирующая активность композиционного растительного препарата при воздействии на вирусы гриппа А

Вирус гриппа	Вирусингибирующая активность (%) в дозе мг/кг	
	доза 0,25 мг/кг	доза 0,5 мг/кг
A/FPV/Rostock/34 (H7N1)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
A/крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
A/Алматы/8/98 (H3N2)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
A/черноголовый хохотун/ Атырау/743/04 (H13N6)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
A/малая поганка/ Алаколь/791/04 (H4N6)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
A/Ленинград/54/1 (H1N1)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
A/swine/Iowa/30 (H1N1)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0

Дальнейшие исследования были посвящены изучению способности препарата подавлять репродукцию вирусов с различной антигенной формулой. Для анализа были использованы вирусы гриппа с антигенной формулой H5N3 (штамм *A/крачка/Южная Африка/1/61*), H3N2 (штамм *A/Алматы/8/98*), H13N6 (A/*черноголовый хохотун*/Атырау/743/04), H4N6 (*A/малая поганка/Алаколь/791/04*) и H1N1 (*A/Ленинград/54/1* и *A/swine/Iowa/30*). Показано, что в концентрациях 0,25 и 0,5 мг/кг массы куриных эмбрионов композиционный растительный препарат подавлял репродукцию вирусов на 100% (таблица 1).

Заключение. Композиционный растительный препарат на основе экстрактов растений семейств *Caryophillaceae, Leguminoseae* и *Betullaceae* эффективно подавляет репродукцию вирусов гриппа с разной антигенной структурой за счет влияния на основные биологические свойства вируса (гемагглютинирующая и нейраминидазная активности).

Литература

1. Thayer, A.M. Flu fighters / A.M. Thayer // Chem. Eng. News. — 2009. — Vol. 87. — P. 15–26.

2. Pandemic (H1N1) 2009 — update 101 / Global Alert and Response [Electronic resource] / World Health Organization. — Mode of access: http://who.int/csr/don/2010_05_21/en/index.html. — Data of access: 22.07.2011.

3. Spalatin, J. The haemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing Newcastle disease virus / J. Spalatin, R.P. Hanson, P.D. Beard // Avian Dis. — 1970. — Vol. 14. — P. 542–549.

4. Калер, Г.В. Гемолиз эритроцитов детергентами — математическая модель и анализ концентрационных и кинетических кривых / Г.В. Калер, Л.И. Рачковский, Н.М. Окунь // Цитология. — 1986. — Т. 28, № 9. — С. 954–963.

5. Урбах, В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В.Ю. Урбах. — М., 1975. — 295 с.

Поступила 27.07.2011

THE ANTIVIRAL PREPARATION OF PLANT ORIGIN

Turmagambetova A.S., Zaitceva I.A., Korotetckyi I.S., Sokolova N.S., Yembergenova A.A., Soldatova I.A., Bogoyavlenskyi A.P., Berezin V.E.

Institute of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

It has been studied the hemagglutinin activity, neuraminidase activity and antiviral activity of plant origin composite preparation on influenza viruses with different subtypes. Established that antiviral preparation capable of inhibiting the reproduction of different influenza A viruses in a concentration of 0.25 mg/kg body weight of chicken embryos.

Keywords: plant origin antiviral preparation, influenza virus.

СОЧЕТАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РИБАМИДИЛА И ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНОГО СЫРЬЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ВИРУСОМ ЛАССА

Богданова Н.Л., Рустамова Л.М., Петкевич А.С.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Резюме. В предварительных экспериментах определен ряд препаратов на природной основе с выраженным противовирусным действием. В данной работе выявлены комбинации активных препаратов природного происхождения в сочетании с рибамидилом, влияющие на выживаемость мышей при экспериментальной инфекции, вызываемой вирусом Ласса.

Ключевые слова: вирус Ласса, рибамидил, комбинированная терапия.

Введение. Возбудитель геморрагической лихорадки — вирус Ласса (семейство аренавирусов) — высоко патогенен для человека. Вспышки геморрагической лихорадки Ласса продолжают возникать на территории многих Африканских стран. Заболевание характеризуется тяжелыми клиническими проявлениями, высокой контагиозностью и смертностью [1, 2]. Описан ряд случаев заноса вируса Ласса из Западной Африки в Европу и Северную Америку. По определению Национального института аллергии и инфекционных болезней (США), аренавирусы категории А принадлежат к патогенам, которые могут быть использованы в качестве биологического оружия.

В настоящее время отсутствуют эффективные средства специфической и неспецифической защиты от возбудителей опасных вирусных инфекций. Учитывая высокую контагиозность этого вируса, растущие международные связи и миграцию населения, появление на территории республики новых видов растений и животных в связи с глобальным изменением климата, в частности возможных переносчиков опасных вирусных инфекций, а также в целях обеспечения биологической безопасности Республики Беларусь от угроз международного терроризма представляется необходимым проведение исследований по поиску препаратов профилактики и лечения этого заболевания в разных направлениях [1–3].

В предварительных экспериментах мы выявили ряд активных лечебных средств среди некоторых категорий кандидатов в противовирусные препараты, в том числе препаратов на природной основе. Подобранные терапевтические дозы не вызывали агрессивного токсического воздействия на сам организм, что явилось существенным положительным параметром для данной группы препаратов и является приоритетным при выборе лекарственных средств для лечения данной инфекции [4, 5].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния комбинаций препаратов на основе природного сырья в сочетании с рибамидилом на выживаемость мышей при экспериментальной инфекции, вызываемой вирусом Ласса.

Материалы и методы. ***Вирусы.*** В работе использовали вирус Ласса, штамм Сьерра-Леоне.

Животные. Исследования выполнены на мышах линии BALB массой 6–8 г, которые содержались в клетках типа Е и типа 2 L (ванночки из поликарбоната) в защитных технологических линиях типа Р4. Животные получали пищу и воду в достаточном количестве на протяжении всего срока наблюдения.

Препараты. Препараты на растительной основе: Аллапенин — кардиопротектор, содержащий дитерпеновые алкалоиды; Untom — в состав которого входят полифенольные и оксиндольные алкалоиды, включая эпикатехины, процианидины А1, В1, В2, В4, изоринхофиллин и др. биологически активные вещества (БАВ); Mlt — комплексный натуропатический препарат, кластерный «каркас» которого содержит сложный комплекс БАВ из растений и минералов.

Изучение защитных свойств препаратов. Животных заражали в мозг в дозе 100–1000 БОЕ/мышь, что обеспечивало их 80% гибель. Контролем вируса была группа зараженных мышей, не получавших лечения. В качестве плацебо использовали физиологический раствор. Срок наблюдения составлял три инкубационных периода (21 день). Действие препаратов оценивали по увеличению выживаемости, средней продолжительности жизни (СПЖ) и удлинению срока жизни (УСЖ) опытных групп животных по сравнению с контрольными.

Статическая обработка результатов. При статической обработке экспериментальных данных вычисляли доверительные интервалы среднеарифметических величин и проводили оценку достоверности различий числовых результатов по критерию Стьюдента. Разницу считали статистически достоверной при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований получены следующие данные (рисунок). Наиболее высокие защитные свойства были определены у пары препаратов

рибамидил + Mlt и рибамидил + Untom — 35,3 и 32% соответственно ($p < 0,05$). Средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей при применении этих пар препаратов была 9–10 дней, а удлинение срока их жизни (УСЖ) — 3,0–3,5 дня. При применении препаратов Untom и Mlt в отдельности протективный эффект был несколько ниже: Untom защищал от инфекции на 24,0%, а Mlt — на 29, СПЖ составляла — 8,5–9 дней, а УСЖ было на 1–1,5 суток меньше. Протективные свойства комбинированного применения препарата аллапенин и рибамидил определены на уровне активности рибамидила 28,0%, СПЖ в контроле препарата и в комбинации не превышала 7,5 дня, а УСЖ — 1–1,5 суток по сравнению с контрольной группой мышей.

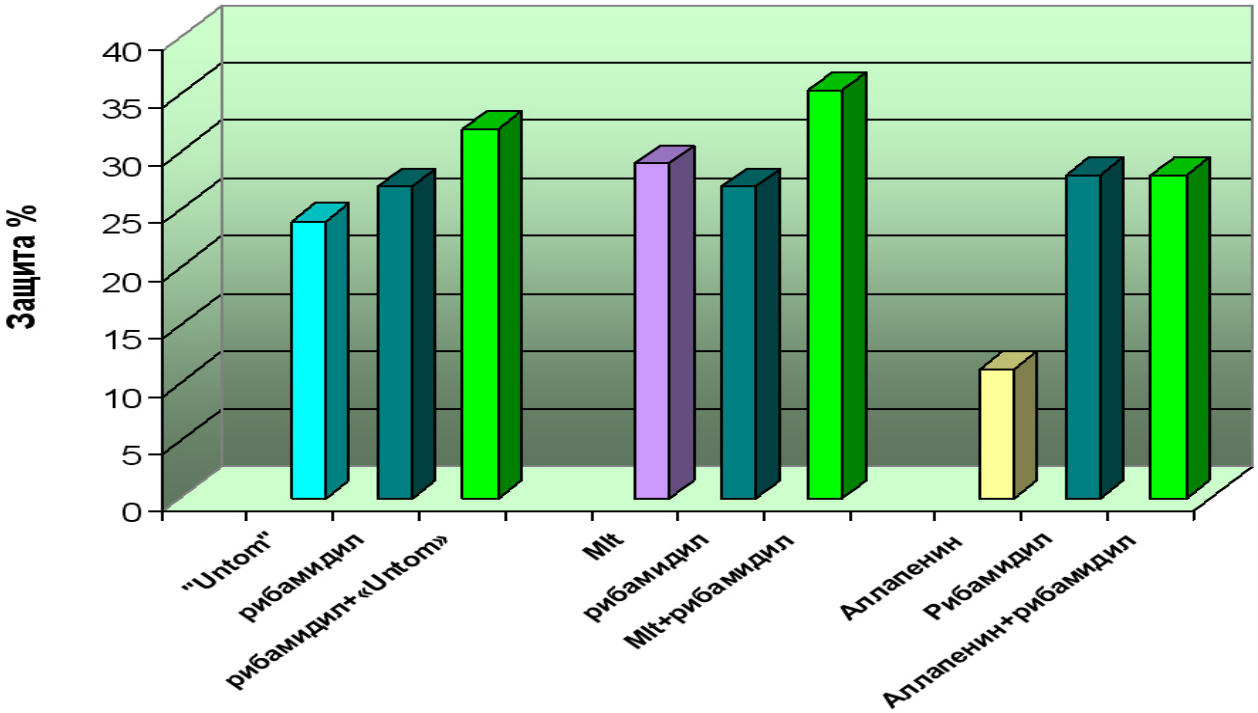


Рисунок — Влияние препаратов на природной основе в сочетании с рибамидилом на выживаемость мышей линии BALB, инфицированных вирусом Ласса

Заключение. Наиболее высокие защитные свойства, выявлены у пары препаратов рибамидил + Mlt и рибамидил + Untom. Процент защиты составил 35,3 и 32% соответственно. Средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей при применении этих пар препаратов была 9–10 дней, а удлинение срока их жизни (УСЖ) составило 3,0–3,5 дня по сравнению с назначением препаратов в отдельности. Эти данные позволяют обозначить расширение направления поиска активных противовирусных средств не только среди препаратов на основе природного сырья (применяемых по новому назначению), а также при применении их оригинальных сочетаний.

Литература

1. Antiviral drugs for treatment of arenavirus infection: междунар. заявка WO2007100888, МПК A 61K 31/16, A 61K 31/38, A 61K 31/405 / D.E. Hruby [et al.]; заявитель Siga Technologies, Inc.; D.E. Hruby [et al.]. — № PCT/US2007/05262; заявл. 02.03.2007; опубл. 17.09.2007.

2. Орехов, А.П. Химия алкалоидов / А.П. Орехов. — М., 1995. — 105 с.

3. Jarling, P.B. Lymphocytic choriomeningitis virus. A neglected pathogen of man / P.B. Jarling, C.J. Peters // Arch. Pathol. Lab. Med. — 1992. — Vol. 116. — P. 486–488.

4. Богданова, Н.Л. Доклинические испытания антивирусной активности комбинации препаратов природного происхождения на модели экспериментальной геморрагической лихорадки Ласа / Н.Л. Богданова, Л.М. Рустамова, А.С. Петкевич // Создание и клинические испытания лекарственных средств. Современная фармакотерапия вирусных инфекций: рос. заоч. электрон. науч.-практ. конф., Волгоград, 7–12 нояб., 2005 г. // Бюл. Волгоград. науч. центра РАМН и Админ. Волгоград. обл. — Волгоград: ВОЛГМУ, 2006. — № 1. — С. 18–19.

5. Сочетанное применение лекарственных средств разной природы при лимфоцитарном хориоменингите у мышей / Н.Л. Богданова [и др.] // Здравоохранение. — 2008. — № 11. — С. 76–79.

Поступила 12.09.2011

COMBINED USE OF RIBAMIDIL AND PREPARATIONS BASED ON NATURAL RAW MATERIALS FOR EXPERIMENTAL INFECTION OF VIRUS LASSA

Bogdanova N.L., Rustamova L.M., Petkevich A.S.

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

The highest protective properties have been found in a pair of drugs ribamidil + Mlt and ribamidil + Untom. Percentage of protection was 35.3% and 32.0, respectively. Average life expectancy of mice in the application of these pairs of drugs was 9-10 days, and lengthening the period of their lives 3.0-3.5 days compared to the appointment of agents in particular. These data allow us to identify areas of search for active expansion of antiviral agents, not only among the chemotherapeutic agents, drugs based on natural raw materials (used for new purposes), as well as the study of their original combinations.

Keywords: Lassa virus, ribamidil, combination therapy.

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА ЛИМФОЦИТАРНОГО ХОРИОМЕНИНГИТА

Фомина Е.Г, Счеслёнок Е.П., Кузнецова Л.А., Винокурова Н.В., Школина Т.В., Семижон П.А, Владыко А.С.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Получена рекомбинантная плазмидная ДНК, содержащая в качестве вставки протяженный (960 п.н.) фрагмент S-сегмента вируса лимфоцитарного хориоменингита, включающий последовательность, комплементарную праймерам, используемым для проведения ПЦР. Плазмидная ДНК использована в качестве положительного контроля для отработки условий проведения ПЦР в режиме реального времени при дагностике лимфоцитарного хориоменингита.

Ключевые слова: лимфоцитарный хориоменингит, ПЦР в режиме реального времени, положительный контроль, рекомбинантная плазмидная ДНК.

Введение. Вирус лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ) является возбудителем инфекционного заболевания, клинические проявления которого варьируют от сравнительно легких гриппоподобных (85% всех случаев ЛХМ) до менингитов, менингоэнцефалитов (12–15%), а иногда водянки головного мозга у новорожденных (единичные случаи). Описано тератогенное действие вируса, а также острые молниеносные формы с летальным исходом. Вирус распространен повсеместно: в Европе, Америке, Австралии и Японии [1].

Природным резервуаром инфекции являются мыши разных видов, включая домовых мышей, полевок и др. Описаны случаи заражения от домашних хомяков, морских свинок и обезьян [2].

Во всем мире, в том числе и в нашей стране, имеются лишь ограниченные данные о клинически подтвержденных случаях заболевания «вирусный лимфоцитарный хориоменингит», имеет место гиподиагностика. То же можно утверждать и о распространённости вируса ЛХМ в природной популяции грызунов. Это связано с рядом причин. Одной из главных является то, что в Республике Беларусь не производятся и не закупаются тест-системы для выявления геномной РНК вируса ЛХМ. Такие тест-системы не разработаны и в сопредельных государствах (Россия, Украина и др.). Другой сдерживающей причиной является ограниченное количество специализированных лабораторий, имеющих право работать с вирусами, относящимися ко 2-ой группе патогенности

В литературе все чаще описываются случаи, связанные со вспышками данного заболевания. Одна из таких вспышек произошла в США в 1975 г. Количество заболевших составило 236 человек. В 2003–2005 гг. появились публикации о заражении вирусом ЛХМ при трансплантации органов [3]. В описанных случаях погибли 7 из 8 человек после трансплантации зараженных вирусом ЛХМ органов. В литературе описаны также 54 врожденных случая ЛХМ [4]. Смертность при врожденной патологии у таких детей составляет 35%, 64% — имелись серьезные неврологические заболевания.

Для исследования органов животных на наличие антигена(ов) ЛХМ в потенциальных природных очагах, а также молекулярно-генетического подтверждения диагноза «вирусный лимфоцитарный хориоменингит» в нашем центре ведутся исследования по разработке тест-системы для выявления вируса ЛХМ методом ПЦР в режиме реального времени.

Целью данного исследования явилось получение рекомбинантной плазмидной ДНК, содержащей в качестве вставки фрагмент генома, кодирующего нуклеокапсидный белок вируса ЛХМ, и использование ее в качестве положительного контроля при отработке условий проведения ПЦР.

Материалы и методы. Для выделения вирусной РНК использовали коммерческий препарат TRI-реагент BD (Sigma) и «РИБО-сорб» производства «Амплисенс» (Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Постановка реакции обратной транскрипции (ОТ). К 10 мкл вирусной РНК добавляли 1 мкл праймера (50 пмолей), комплементарного нуклеотидной последовательности нуклеокапсидного белка вируса ЛХМ, 0,5 мкл рибонуклеазного ингибитора (40 ед.). Смесь инкубировали 5 мин при 85 °С с последующим охлаждением до 42 °С, далее вносили смесь, содержащую 1 мкл смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ), содержащей по 10 мМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ каждого, 4 мкл ×5 ОТ-буфера для обратной транскриптазы (250 мМ трис-HCl, pH 8,3; 200 мМ KCl; 30 мМ $MgCl_2$, 50 мМ дитиотреитол), 100 ед. обратной транскриптазы и деионизованную воду до конечного объема 20 мкл. После этого смесь инкубировали еще 1 час при 42 °С и нагревали 5 мин при 95 °С для денатурации ферментов. В дальнейшем ОТ-продукт (комплементарная ДНК) использовали в полимеразной цепной реакции.

Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР). В плашки для амплификации (BioRad) вносили 5 мкл ×10 Taq-буфера (50 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, 15 мМ $MgCl_2$, 0,1% Triton X100), 1 мкл дНТФ (10 мМ каждого), по 1 мкл праймеров (70 пмолей), 5 мкл RT-продукта (кДНК), деионизованную воду до конечного объема 50 мкл, 0,5 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл). Закрывали плашку оптически-прозрачной пленкой и переносили в амплификатор (BioRad iQ5). Режим амплификации: 94 °С — 45 с, 50 °С — 30 с, 72 °С — 45 с. Количество циклов — 35.

Рестрикция вектора и амплифицированных фрагментов. Рестрикцию вектора и амплифицированных фрагментов ДНК проводили при 37 °С в течение 2 часов рестриктазами (в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя «Fermentas»), в конечном объеме 20 мкл. Реакционная смесь содержала 0,1 мкг двухцепочечной ДНК, ×1 буфер для рестриктаз, 1 U каждого фермента рестрикции. Ферменты рестрикции инактивировали в течение 15 мин при 85 °С.

Анализ продуктов рестрикции. Фрагменты ДНК после обработки рестриктазами анализировали в 1,5% агарозном геле. Электрофорез вели при напряжении тока 10 В/см геля в ТРИС-ацетатном буфере, pH 8,0, в течение 1 часа. Визуализацию ДНК осуществляли с помощью окрашивания геля бромистым этидием с последующим просмотром в УФ.

Лигирование. В пробирку вносили 10 мкл (20 нг) гидролизованного ферментами ретрикции BamHI и HindIII амплифицированного фрагмента ДНК, 5 мкл (100 нг) плазмидного вектора pJC40, гидролизованного теми же рестриктазами, 2 мкл ×10 лигазного буфера, 1 мкл фермента T4 DNA Ligase (5 ед/мкл) и деионизованную воду до конечного объема 20 мкл. Смесь инкубировали при 22 °С в течение часа.

Подготовка компетентной клеточной культуры. В 5 мл бульона LB вносили отдельную колонию клеток *Escherichia coli*, штамм DH5α. Флакон помещали на шейкер и инкубировали при 37 °С в течение 3 часов. В стерильные пробирки типа Эппендорф вносили полученную культуру клеток по 1,5 мл, охлаждали до +4 °С и центрифугировали 10 мин (+4 °С) при 3 тыс. об/мин, осадок ресуспендировали в 500 мкл 0,1М $CaCl_2$. Образцы помещали в ледяную баню на 40 мин с последующим центрифугированием 10 мин (+4 °С) при 3 тыс. об/мин. Поученный осадок ресуспендировали в 100 мкл 0,1М $CaCl_2$.

Трансформация культуры клеток плазмидной ДНК. В 100 мкл суспензии клеток вносили 10 мкл лигазной смеси, выдерживали 30 мин при +4 °С, тепловой шок проводили при 42 °С в течение 90 с, быстро охлаждали на льду в течение 2 мин, вносили бульон LB до конечного объема 1 мл и помещали в термостат на 1 час. Осаждали клетки центрифугированием и высевали на чашки Петри с ампициллином (50 мкг/мл). Чашки помещали в термостат на ночь при 37 °С.

Выделение плазмидной ДНК. Выделение плазмидной ДНК осуществляли методом щелочного лизиса по стандартной методике [5].

Результаты исследований и их обсуждение. По данным литературы, для выявления генома вируса ЛХМ в ПЦР-диагностике используются отдельные фрагменты S-сегмента генома, кодирующие нуклеокапсидный белок и поверхностный гликопротеид. Поскольку в нашей стране

и в странах ближнего зарубежья не производятся и не зарегистрированы тест-системы для выявления генома вируса ЛХМ, необходимо получить стандартный положительный контроль, который позволял бы оценить эффективность постановки полимеразной цепной реакции. В качестве такого контроля может служить плазмидный вектор, в состав которого клонирована нуклеотидная последовательность фрагмента генома вируса ЛХМ, которая чаще всего используется в коммерческих тест-системах. Последовательность вирусного генома, которая, по данным литературы, чаще всего используется при диагностике вируса ЛХМ как в стандартной ПЦР, так и в ПЦР с детекцией продукта в режиме реального времени, была клонирована в вектор pJC40. На рисунке 1 приведена нуклеотидная последовательность нуклеокапсидного белка вируса ЛХМ, на которой выделены курсивом нуклеотидные последовательности, которые, по данным литературы [6], используются в качестве праймеров для выявления генома вируса ЛХМ.

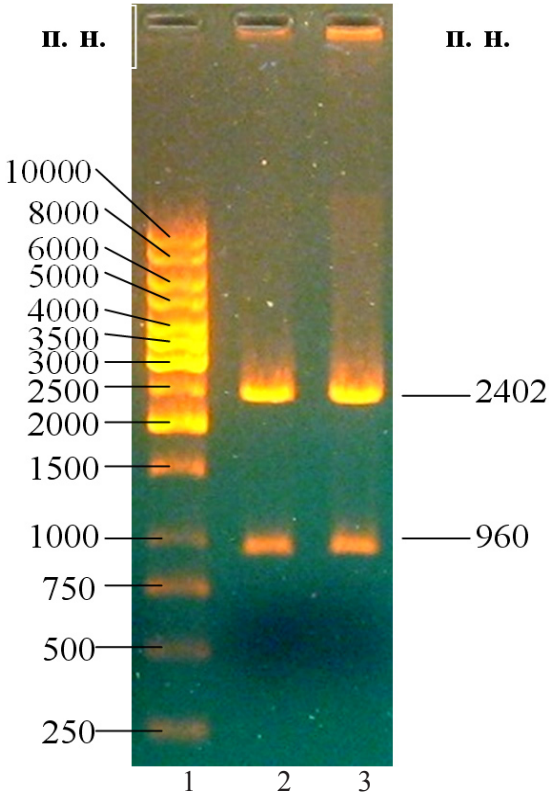
Для получения рекомбинантной плазмиды, содержащей в качестве вставки фрагмент последовательности нуклеокапсидного белка, была подобрана пара праймеров, ограничивающих позиции S-сегмента генома с 2233 по 3192 п.н. Последовательности, комплементарные заказанным праймерам, выделены жирным шрифтом (рисунок 1).

2221 aagcattgtc tg**gctgtagc ttaagcc**cac ctgaggtgga cctgctgctc caggcgctgg
2281 cctgggtgag ttgactgcag gtttctcgct tgtgagatca attgttgtgt tttcccatgc
2341 tctccccaca atcgatgttc tacaagctat gtatggccat ccttcacctg aaaggcaaac
2401 tttatagagg atgttttcat aagggttcct gtccccaact tggtctgaaa caaacatgtt
2461 gagttttctc ttggccccga gaactgcctt caagaggtcc tcgctgttgc ttggcttgat
2521 caaaattgac tctaacatgt taccccatc caacagggct gcccctgcct tcacggcagc
2581 accaagacta aagttatagc ***cagaaatgtt gatgctggac tgc***tgttcag tgatgacccc
2641 cagaactggg tgcttgtctt tcagcctttc aagatcatta agatttggat *acttga**ctgt***
2701 gtaaagcaag ccaaggtctg tgagcgcttg tacaacgtca ttgagcggag tctgtgactg
2761 tttggccata caagccatag ttagacttgg cattgtgcca aattgattgt tcaaaagtga
2821 tgagtctttc acatcccaaa ctcttaccac accacttgca ccctgct***gag gctttctcat***
*2881 **cccaactat***c tgtaggatct gagatctttg gtctagttgc tgtgttgtta agttccccat
2941 atatacccct gaagcctggg gcctttcaga *cctc**atgatc ttggccttca gctt***ctcaag
3001 gtcagccgca agagacatca gttcttctgc actgagcctc cccactttca aaacattctt
3061 ctttgatgtt gactttaaat ccacaagaga atgtacagtc tggttgagac ttctgagtct
3121 ctgtaggtct ttgtcatctc tcttttcctt cctcatgatc ctctgaacat tgctgac**ctc**
3181 **agagaagtcc aa**cccattca gaaggttggt tgcatcctta atgacagcag ccttcacatc

Рисунок 1 — Нуклеотидная последовательность, кодирующая фрагмент нуклеокапсидного белка вируса ЛХМ

Праймеры содержат сайты узнавания для рестриктаз BamHI и HindIII. Амплифицированный фрагмент и вектор pJC40 были обработаны рестриктазами BamHI и HindIII, очищены и лигированы. Лигазной смесью были трансформированы бактериальные клетки *E. coli*, штамм DH5α.

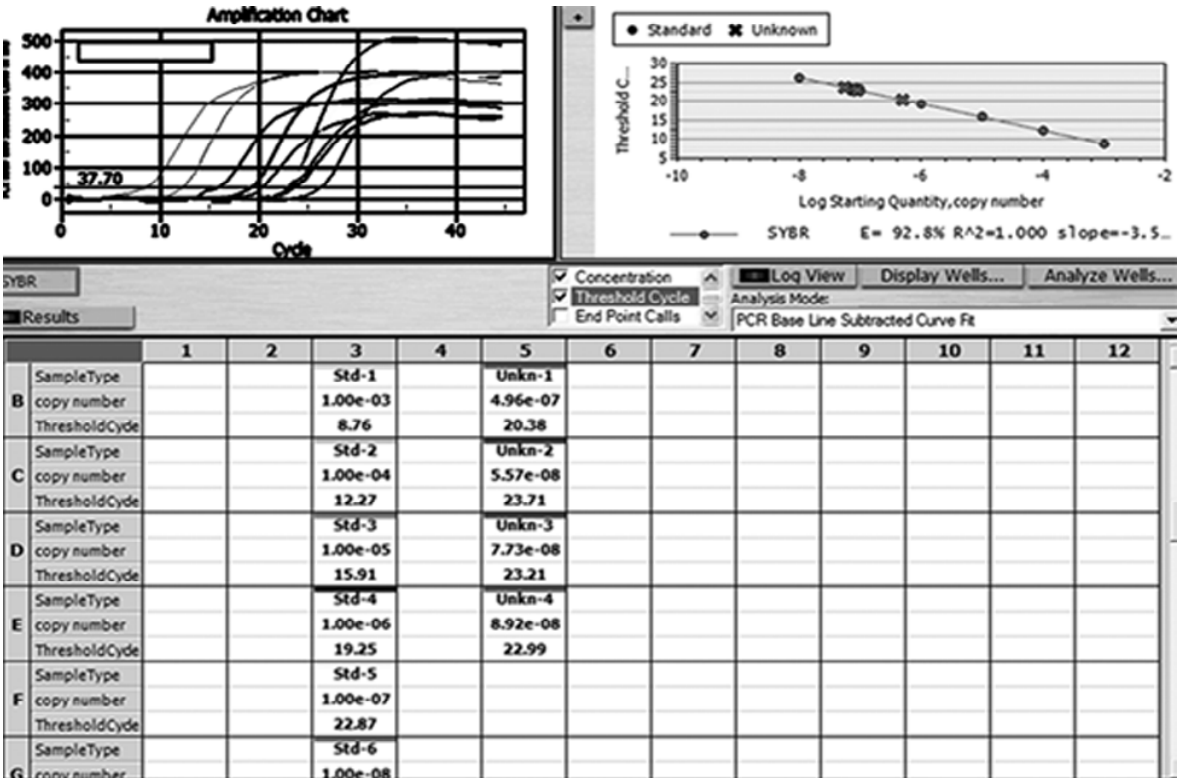
Для подтверждения наличия вставки в рекомбинантных плазмидах плазмидная ДНК была обработана рестрикционными нуклеазами BamHI и HindIII, разделена в 1,5% агарозном геле (рисунок 2). Как видно из рисунка 2, каждая из полученных плазмид содержит нуклеотидную последовательность длинной 960 п.н., кодирующую фрагмент нуклеокапсидного белка вируса ЛХМ. Данная плазмидная ДНК была использована как положительный контроль для постановки полимеразной цепной реакции с парой праймеров, ограничивающих фрагмент S-сегмента генома вируса ЛХМ с позиции 2868 по 2994 п.н.



Дорожки: 1 — GeneRuler 1kb DNA Ladder «Fermentas»; 2, 3 — рекомбинантная плазмидная ДНК, обработанная BamHI и HindIII рестриктазами

Рисунок 2 — Электрофоретический анализ рекомбинантного плазмидного вектора, содержащего вставку нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент нуклеокапсидного белка вируса ЛХМ

Пара праймеров имеет следующую нуклеотидную последовательность: NP1R 5’ AAGCTGAAGGCCAAGATCAT 3’ позиция генома 2868–2889; NP1F 5’ GAGGCTTTCTCATCCCAACTAT 3’ позиция генома 2975–2994. Реакцию проводили с использованием набора Sybr green, производства BioRad, как рекомендовано в инструкции производителя. В качестве положительных проб использовали РНК, выделенную из музейных штаммов, задепонированных в специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии): штамм WE, Armstrong, «Кантарович». Выделение РНК проводили набором «Рибосорб» производства «Амплисенс» (Россия). Синтезированную в процессе обратной транскрипции кДНК использовали в качестве матрицы при проведении ПЦР. Положительным контролем служила плазмидная ДНК со встроенным фрагментом S-сегмента вируса ЛХМ. Для оценки эффективности реакции плазмидная ДНК была титрована в 10-кратном разведении. Данные проведения ПЦР в режиме реального времени представлены на рисунке 3. Как видно из рисунка, все исследуемые пробы были положительными и пересекали «порог цикла» на 20,38; 23,71; 23,21; 22,99 цикле соответственно.

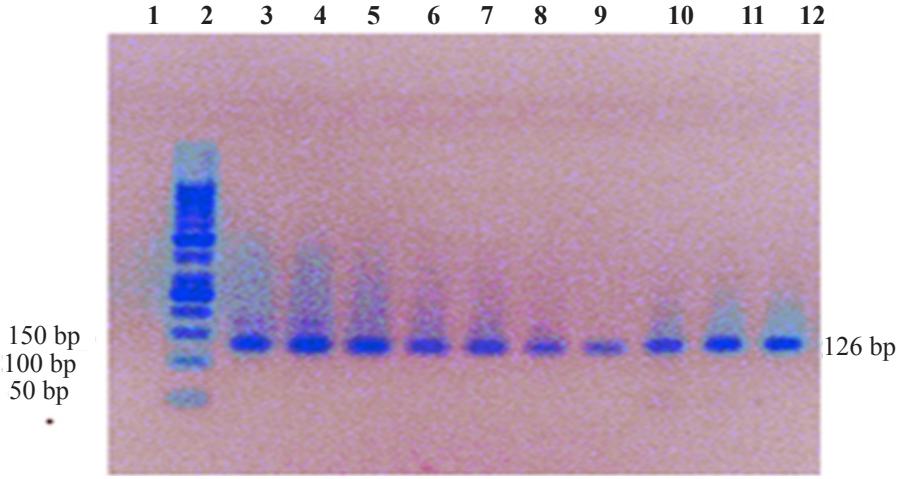


		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	SampleType			Std-1		Unkn-1							
	copy number			1.00e-03		4.96e-07							
	ThresholdCycle			8.76		20.38							
C	SampleType			Std-2		Unkn-2							
	copy number			1.00e-04		5.57e-08							
	ThresholdCycle			12.27		23.71							
D	SampleType			Std-3		Unkn-3							
	copy number			1.00e-05		7.73e-08							
	ThresholdCycle			15.91		23.21							
E	SampleType			Std-4		Unkn-4							
	copy number			1.00e-06		8.92e-08							
	ThresholdCycle			19.25		22.99							
F	SampleType			Std-5									
	copy number			1.00e-07									
	ThresholdCycle			22.87									
G	SampleType			Std-6									
	copy number			1.00e-08									

Std (стандарт 1, 2, 3, 4, 5, 6) — матрица представляет собой плазмидную ДНК, приготовленную последовательным титрованием в 10-кратном разведении; Unkn 1, 2, 3, 4 — сДНК, полученная в процессе обратной транскрипции на матрице РНК, выделенной из музейных штаммов WE (1, 2), Armstrong (3), Кантарович (4)

Рисунок 3 — Выявление геномной РНК вируса ЛХМ в режиме реального времени

Так как реакцию проводили с использованием интеркалирующего агента Sybr green, который может неспецифически встраиваться в любую двухцепочечную молекулу ДНК, то специфичность реакции и размер амплифицированного фрагмента проверяли с помощью гель-электрофореза в агарозном геле. Данные представлены на рисунке 4.



Дорожки: 1 — отрицательный контроль проведения реакции (в качестве матрицы используется вода); 2 — маркер молекулярных масс ladder 50 b.p., Fermentas; 3–8 — положительный контроль (в качестве матрицы используется рекомбинантная плазмидная ДНК, серия десятикратных разведений); 9–12 — матрицей являются пробы сДНК, полученные в процессе обратной транскрипции из РНК штаммов WE (9, 10), Armstrong (11), «Кантарович» (12)

Рисунок 4 — Электрофоретический анализ продуктов полимеразной цепной реакции

Как видно из рисунка 4, во всех исследуемых пробах, кроме отрицательного контроля, выявляется специфическая полоса в области 126 пар нуклеотидов, как и предполагалось при расчете последовательности, ограниченной подобранной парой праймеров.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов подобраны условия проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Отработан процесс выделения РНК из биологического материала. Получена рекомбинантная плазмида, содержащая в качестве вставки протяженный фрагмент S-сегмента генома вируса ЛХМ (960 п.н.). Полученная рекомбинантная плазмида может служить в качестве унифицированного положительного контроля при проведении ПЦР.

Литература

1. Spatial and temporal dynamycs of lymphocytic choriomeningitis virus in wild rodents, Northern Italy / V. Tagliapietra [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2009. — Vol. 15, N 7. — P. 1019–1025.
2. Lymphocytic choriomeningitis in Michigan / E.S. Foster [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2006. — Vol. 12, N 5. — P. 851–853.
3. Pet rodents and fatal lymphocytic choriomeningitis in transplant patients / B.R. Amman [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2009. — Vol. 13, N 5. — P. 719–725.
4. Barton, L.L. Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: decade of rediscovery / L.L. Barton, M.B. Mets. — Clin. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 33, N 3. — P. 370–374.
5. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис [и др.]. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
6. McCausland, M.M. Quantitative PCR technique for detecting lymphocytic choriomeningitis virus in vivo / M.M. McCausland, S. Crotty // J. Virol. Methods. — 2008. — Vol. 147, N 1. — P. 167–176.

Поступила 16.09.2011

UTILIZING RECOMBINANT PLASMID AS A POSITIVE CONTROL FOR DETECTION OF LYMPHOCYTIC CHORIOMENINGITIS VIRUS GENOME

Fomina E.G., Scheslenok E.P., Kyznetsova L.A., Vinokurova N.V., Schkolina T.V., Semizhon P.A., Vladyko A.S.

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

The nucleotide sequences (960 bp. fragment of S segment of LCMV) coding nucleocapside protein was cloned into the polylinker T7 expression vector pJC40. 10-fold dilutions of this linearized plasmid was used as a positive control for detection genome of LCMV in a Real-time PCR.

Keywords: lymphocytic choriomeningitis virus, recombinant plasmid, Real-time PCR, positive control.

ВИРУССОРБИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ВОЛОКНИСТЫХ ИОНООБМЕННЫХ МАТЕРИАЛОВ ТИПА ФИБАН И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ УЛАВЛИВАНИЯ ВИРУСОВ ИЗ ВОДОПРОВОДНОЙ ВОДЫ

Гринкевич П.И., Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Богуш З.Ф.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Представлен краткий анализ накопленных литературных данных по проблеме улавливания вирусных агентов из водной среды, а также результаты собственных исследований вируссорбирующих свойств тканых ионообменных материалов отечественного производства типа ФИБАН и их использования для отбора проб проточным методом. Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности обратимой адсорбции вирусов исследованными волокнистыми ионообменными материалами марок ФИБАН А5 и ФИБАН А6, АК22 (эффективность адсорбции-элюции 100%) при концентрации их в воде до 3 lg ТЦД50/л. Материалы ФИБАН К-1 и ФИБАН Х-1 не обладали такой способностью.

Ключевые слова: концентрирование вирусов, адсорбция вирусов, ФИБАН, энтеровирусы.

Введение. Очень низкая концентрация кишечных вирусов в воде (питьевой, поверхностной, сточной) диктует необходимость применения различных способов их концентрирования для дальнейшего анализа молекулярными методами [1]. Существует ряд методов фильтрации, так же как и фильтрационных материалов, традиционно применяемых для улавливания «водных» вирусов. Известно, например, использование тангенциальной фильтрации, а также применение фильтров на основе стекловаты и стекловолокна [2–4]. Механическая фильтрация в большинстве случаев не дает желаемых результатов из-за слишком маленького размера вирусных частиц. Поэтому вполне обоснованно применяются методы адсорбции-элюции, которые включают манипуляцию зарядами на поверхности вируса путем изменения pH, чтобы увеличить их адсорбцию на фильтрах, несущих заряд [2, 3].

Адсорбция-элюция вирусов на положительно заряженных фильтрах является одним из самых распространенных способов. Именно он рекомендован для концентрирования энтеровирусов из питьевой воды Агентством защиты окружающей среды США [5]. Эти фильтры не нуждаются в изменении pH, т.к. большинство энтеровирусов несут отрицательный заряд при обычном pH. Однако положительно заряженные фильтры легко загрязняются и имеют низкие показатели сорбции в морской воде из-за наличия в ней солей и ее щелочности. Отрицательно заряженные материалы обладают лучшими показателями сорбции вирусов в морской воде и в сильно загрязненных водах. При обычных условиях энтеровирусы сорбируются на таких фильтрах только в присутствии Mg^{2+}, т.к. они обладают одноименным зарядом с фильтрующим материалом. Следующим важным условием адсорбции является наличие других поливалентных катионов или кислая среда, при которой заряд вирусных частиц становится положительным. В модифицированном методе, разработанном Katayama et al. [6], вместо картриджа используется отрицательно заряженная мембрана. Метод показывает хорошие результаты для морской воды (73%). После фильтрации применяется кислота, которая удаляет катионы и другие ингибиторы. Вирусы при этом остаются прикрепленными к мембране.

Haramoto et al. [7] модифицировали вышеупомянутый метод концентрирования для улучшения извлечения вирусов из пресных вод (например, подземных, речных и водопроводных) путем предварительной обработки отрицательно заряженной мембраны НА типа $AlCl_3$, что улучшило показатели извлечения полиовирусов из 10 л обработанной воды в среднем до 109%.

Альтернативой методам адсорбции-элюциии является ультрафильтрация, демонстрирующая высокие показатели для морской воды (72% в эксперименте с бактериофагами T2) [4, 8]. Известны два варианта устройства систем для ультрафильтрации: фильтрация в вихревом и тангенциальном потоке. Оба варианта предполагают использование потока воды таким образом, что она прогоняется через цилиндрический фильтр под давлением. При этом фильтры не засоряются частицами, которые остаются в воде [8]. Эти методы почти не нуждаются в дополнительных манипуляциях с pH и работают без стадии элюции. Обычно используется объем воды порядка 20 л, который концентрируется до 50 мл [4]. Для фильтрации в тангенциальном потоке необходима стадия префильтрации для удаления планктона и др. твердых частиц. Показано, что фильтрация в вихревом потоке менее затратна по времени (нет необходимости в префильтрации) и имеет более высокий уровень выделения вирусов. Однако в этих условиях имеется тенденция к накоплению ингибиторов ПЦР вместе с вирусными частицами [9]. Вместе с тем оба метода ультрафильтрации оказываются более затратными по времени и материально, чем методы адсорбции-элюции, из-за высокой стоимости оборудования и ограничений на объем проб, которые могут быть сконцентрированы за один раз. Именно поэтому мы использовали менее ресурсоемкий метод адсорбции-элюции с бифэкстрактом.

Материалы и методы. В работе использовали 5 марок волокнистых ионообменных материлов ФИБАН, отличающихся по своим физико-химическим свойствам. Краткая характеристика исследованных материалов представлена в таблице 1.

Таблица 1 — Основные физико-химические свойства нетканых ионообменных материалов ФИБАН

Наименование материала	Основные характеристики				
	Поверхностная плотность, г/ м^2	Функциональная группа	Ионная форма	Обменная емкость в Cl^--форме, мг-экв/г	Общая характеристика
ФИБАН А5	400	–N = , = NH, –COOH	Смешанная Cl^-, HSO_4^-, HCO_3^-, OH^-	По амино — 4,1 По –COOH — 0,65	Анионит
ФИБАН А6	320	–N = , –N≡	Карбонатная (CO_3^{2-}, HCO_3^-)	По –N≡ — 1,9 По –N= — 1,1	–//–
ФИБАН АК22	200–230	$–NH_2$, = NH, –COOH	Смешанная Cl^-, HSO_4^-, HCO_3^-, OH^-	По амино — 4,5 По –COOH — 1,5	–//–
ФИБАН Х1	200–350	$–N(CH_2COO)_2^{2-}$, –COOH, –N =	Смешанная (H^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^+)	По –COOH — 4,1 По $–NR_2$ —0,8	Хелатный ионит
ФИБАН К1	350	$–SO_3$, H^+	H^+	По H^+ — 2,6	Катионит

В качестве модельного объекта был использован вакцинный штамм полиовируса I типа из коллекции лаборатории санитарной вирусологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Накопление и титрование полиовируса осуществляли на перевиваемой культуре клеток BGM (клетки почки зеленой мартышки). Титрование проводили стандартным методом по ЦПД с определением $ТЦД_{50}$/мл. Титры вирусов в lg $ТЦД_{50}$/мл вычисляли по методу Кербера. Исходный титр вируса составлял 107 $ТЦД_{50}$/мл.

Для проведения исследований была сконструирована установка, в состав которой входила емкость для контаминированной вирусом водопроводной воды, соединенная входной трубкой с фильтровальным устройством (в него помещали образец исследуемого материала). С другой стороны к фильтровальному устройству присоединяли отводную трубку, через которую вода после прохождения через исследуемый материал собиралась в колбу для дальнейшего исследования на предмет полноты адсорбции содержащихся в ней вирусов. Проба воды объемом 3 л контаминировалась 10 мл вируссодержащей жидкости с различной концентрацией модельного полиовируса (диапазон 10–10 000 $ТЦД_{50}$/л) и пропускалась через фильтровальное устройство, содержащее исследуемые образцы материала ФИБАН.

Затем материал, содержащий адсорбировавшиеся вирусные частицы, извлекали из фильтровального устройства и помещали в 10 мл буфера (3% биф-экстракт, pH 9,6) для элюции из него адсорбировавшихся вирусных частиц. Различная скорость прохождения контаминированной вирусами воды через исследуемые образцы материалов ФИБАН достигалась за счет присоединения системы к вакуумному насосу и регулирования скорости протекания. Скорость протекания изменяли в диапазоне 3–10 л/час.

Для оценки эффективности адсорбции вирусных частиц из контаминированной воды и обратимости этого процесса (элюции адсорбировавшихся вирусных частиц буферным раствором) в ходе эксперимента отбирались следующие пробы: контроль разведения вируса (КР) — проба водопроводной воды, контаминированной полиовирусом; контроль сорбции (КС) — проба воды после прохождения ее через адсорбирующие материалы ФИБАН различных марок; контроль элюции (КЭ) — проба элюента после элюции. Затем исследуемые пробы КР, КС и КЭ титровали стандартным методом по ЦПД с определением $ТЦД_{50}$/мл. Титры вирусов в lg $ТЦД_{50}$/мл вычисляли по методу Кербера.

Результаты и обсуждение. Основываясь на имеющихся литературных данных о предполагаемых механизмах адсорбции вирусов и сведениях о структуре и физико-химических свойствах исследуемых материалов, была проведена экспериментальная оценка вируссорбирующих свойств различных марок нетканых ионообменных материалов типа Фибан, перечисленных в таблице 1. Все эксперименты проводили в 3 повторах для получения статистически обоснованных данных. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Показатели адсорбции и элюции вирусов различными марками нетканых ионообменных материалов ФИБАН

Вид материала	Концентрация вируса в исследуемой пробе воды до адсорбции, lg $ТЦД_{50}$/л	Концентрация вируса в исследуемой пробе воды после адсорбции, lg $ТЦД_{50}$/мл	Концентрация вируса в элюате, lg $ТЦД_{50}$/мл	Эффективность адсорбции	Эффективность элюции
ФИБАН А5	1	—*	1	—*	100%
	2	—*	2	—*	100%
	3	0	3	100%	100%
ФИБАН А6	1	—*	1	—*	100%
	2	—*	2	—*	100%
	3	0	3	100%	100%
ФИБАН АК22	1	—*	0,5	—*	50%
	2	—*	2	—*	100%
	3	0	3	100%	100%
ФИБАН К1	1	—*	0	—*	0
	2	—*	0	—*	0
	3	1	0	0	0
ФИБАН Х1	1	—*	0	—*	0
	2	—*	0	—*	0
	3	1	0	0	0

Примечание — * — концентрация вирусов <3 lg $ТЦД_{50}$/л соответствует <1 lg $ТЦД_{50}$/мл и лежит ниже уровня детектируемого в культуре клеток, что не позволило провести прямое определение эффективности адсорбции для этих концентраций. Эффективность адсорбции оценивали косвенно, по концентрации элюированного вируса

Полученные результаты по оценке эффективности адсорбции (на основании титрования в культуре клеток BGM проб воды, отобранных после прохождения через различные типы материалов ФИБАН) показали, что после прохождения через адсорбенты ФИБАН А5, ФИБАН А6 и ФИБАН АК22 водопроводная вода не содержала детектируемых уровней вируса, что указывало на 100% эффективность вирусной адсорбции этими материалами. При исследованиии материалов ФИБАН К1 и ФИБАН Х1 были получены противоположные результаты. В пробах с концентрацией вируса 3 lg $ТЦД_{50}$/л было выявлено содержание вирусных частиц, соответствующее 1 $ТЦД_{50}$/мл. При пересчете эта концентрация соответствовала 3 lg $ТЦД_{50}$ на 1 л раствора, что указывало на полное отсутствие адсорбции вируса из воды материалами ФИБАН К1 и ФИБАН Х1. Дальнейшее титрование элюатов, полученных после элюции вирусов с исследованных материалов ФИБАН буферным раствором, содержащим 3% биф-экстракт в трис-HCl буфере (pH 9,6), показало, что в элюатах с ФИБАН А5 и ФИБАН А6 вирус содержался в концентрации, полностью соответствующей его исходному количеству в контаминированной воде до адсорбции, что указывало на 100% эффективность элюции вирусных частиц с этих материалов. Для ФИБАНа АК22 были получены результаты, свидетельствующие о его 100% эффективности при контаминации воды вирусом в концентрации 2–3 lg $ТЦД_{50}$/л и о 50% эффективности при контаминации воды вирусом в концентрации 1 lg $ТЦД_{50}$/л. Все пробы, полученные после элюции с материалов ФИБАН К1 и ФИБАН Х1 не содержали детектируемых количеств вируса, что свидетельствовало об их неэффективности при использовании в качестве адсорбента вирусных частиц.

Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности обратимой адсорбции полиовируса исследованными волокнистыми ионообменными материалами марок ФИБАН А5 и ФИБАН А6 (эффективность адсорбции — 100%, элюции — 100%) при содержании его в воде в концентрации до 3 lg $ТЦД_{50}$/л. Волокнистый ионообменный материал ФИБАН АК22 обнаружил такие же характеристики при контаминации воды вирусом 2–3 lg $ТЦД_{50}$/л. Однако при более низком содержании вируса в воде (1 lg $ТЦД_{50}$/л) эффективность элюции с этого материала составила только 50%. Материалы ФИБАН К1 и ФИБАН Х1 не обладали способностью обратимо адсорбировать вирусы из воды.

Полученные результаты являются основой для продолжения научно-исследовательских работ по разработке производственной технологии улавливания вирусных патогенов из воды на основе использования отечественных волокнистых ионообменных материалов ФИБАН А5 и ФИБАН А6.

Литература

1. Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys / D.W. Griffin [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 1999. — Vol. 65. — P. 4118–4125.

2. Lipp, E.K. Human enteric viruses and parasites in the marine environment / E.K. Lipp, J. Lukasik, J.B. Rose // Meth. Microbiol. — 2001. — Vol. 30. — P. 559–588.

3. The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction / R.A. Pallin [et al.] // J. Virol. Meth. — 1997. — Vol. 67. — P. 57–67.

4. Pathogenic human viruses in coastal waters / D.W. Griffin [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. — 2003. — Vol. 16. — P. 129–143.

5. ICR microbial laboratory manual. EPA 600R95178 [Electronic resource] / G.S. Fout [et al.]; U.S. Environmental Protection Agency. — Cincinnati, Ohio, 1996. — 233 p. — Mode of access: http://www.epa.gov/nerlcwww/icrmicro.pdf. — Date of access: 21.07.2011.

6. Katayama, H. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus andNorwalk virus from coastal seawater / H. Katayama, A. Shimasaki, S. Ohgaki // Appl. Environ. Microbiol. — 2002. — Vol. 68. — P. 1033–1039.

7. Haramoto, E. Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater / E. Haramoto, H. Katayama, S. Ohgaki // Appl. Environ. Microbiol. — 2004. — Vol. 70. — P. 2154–2160.

8. Paul, J.H. Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration / J.H. Paul, S.C. Jiang, J.B. Rose // Appl. Environ. Microbiol. — 1991. — Vol. 57. — P. 2197–2204.

9. Jiang, S. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California / S. Jiang, R. Noble, W.P. Chui // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — Vol. 67. — P. 179–184.

Поступила 28.07.2011

VIRUS ADSORPTION PROPERTIES OF FIBROUS ION-EXCHANGE FIBAN LIKE MATERIALS AND THEIR APPLICATION FOR VIRUS CONCENTRATION FROM TAP WATER

Grinkevich P.I., Amvrosieva T.V., Paklonskaya N.V., Bogush Z.F.

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

The article presents the results of studies of virus adsorption properties of fibrous ion-exchange FIBAN like materials, suggesting a possibility of their usage for virus concentration from tap water. FIBAN A5 and A6 materials showed high adsorption and recovery rates (100% and 100% respectively) for 3 lg $TCID_{50}$/l of virus. FIBAN AK22 showed similar results within 2–3 lg $TCID_{50}$/l range. FIBAN K-1 and FIBAN X-1 materials did not display an ability to reversibly adsorb viral particles from water.

Keywords: virus concentration, virus adsorption, virus recovery, FIBAN like materials, enterovirus.

ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЙ АГЕНТ В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Богатырев В.А.[1,2], Дыкман Л.А.[1], Староверов С.А.[1], Бибикова О.А.[2], Соколов О.И.[1]

[1]Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук;
[2]Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

Резюме. Диагностические системы с золотыми наночастицами могут быть использованы как альтернатива иммунофлюоресцентным диагностикумам. Обсуждаются различные комбинации методов физического и химического контрастирования, позволяющие получать от золотых наночастиц на уровне световой микроскопии темного поля четко регистрируемые сигналы, что позволяет использовать системы автоматизации захвата и анализа изображений с большими полями зрения. Показана возможность использования золотых наночастиц в качестве носителей антигенов с адъювантными свойствами, средств доставки лекарственных соединений и выявляющих агентов (оптических зондов).

Ключевые слова: золотые наночастицы, антигены, антитела, диагностика, микроскопия.

Введение. Золотые наночастицы используются в цитологических исследованиях как преобразователи биоспецифических взаимодействий в оптически регистрируемый сигнал. В этом качестве они носят названия биомаркеров, оптических биосенсоров или оптических зондов. Как электрон-

ноплотные метки они давно зарекомендовали себя в электронной микроскопии. В настоящее время они находят все большее применение в оптической, в том числе конфокальной лазерной микроскопии. Такое применение обеспечено уникальными оптическими и химическими свойствами наночастиц благородных металлов.

Оптические свойства металлических наночастиц обусловлены явлением плазмонного резонанса, поэтому их часто называют плазмонно-резонансными частицами (ПРЧ). Наиболее значимым для микроскопии оптическим свойством является упругое светорассеяние, интенсивность которого очень высока и в некоторых случаях на порядки превышает интенсивность свечения отдельных молекул флюорофоров. В связи с этим ПРЧ находятся в одном ряду с флюоресцентными метками и квантовыми точками, превосходя их по некоторым параметрам. ПРЧ не выцветают и малоцитотоксичны.

Плазмонный резонанс — колебания электронов проводимости относительно ионного остова, индуцированные светом. Спектральное положение плазмонного резонанса зависит от состава, размера, формы наночастиц и от параметров ближайшего диэлектрического окружения. В случае когда расстояния между частицами малы настолько, что локальные электрические поля начинают взаимодействовать (как, например, при агрегации), возникают коллективные плазмонные колебания. При этом спектры поглощения и рассеяния света уширяются и смещаются в длинноволновую область.

Поверхность наночастиц может быть модифицирована специфическими (узнающими) или неспецифическими биосовместимыми молекулами — иммуноглобулинами, лектинами, ферментами, олигонуклеотидами или сывороточными альбуминами, полиэтиленгликолем, поливинилпирролидоном, полистиренсульфонатом и др. Функционализация наночастиц биологическими или синтетическими полимерными молекулами позволяет предотвращать неспецифическую агрегацию и адсорбцию при цитологических исследованиях. Очевидно, что функционализация может быть комплексной, т.е. одновременно с узнающими макромолекулами (антителами) наночастицы могут быть «нагружены» генными векторами или цитотоксическими веществами. Таким образом может осуществляться адресная доставка с одновременным мониторингом этого процесса и его последствий.

Исследования эндоцитоза золотых наночастиц животными клетками в последнее время интенсивно проводятся во многих научных группах. Областью научных интересов является выяснение размерной зависимости транспорта коллоидного золота (КЗ) внутрь клеток [1], а также связи этого процесса с параметрами поверхностной функционализации золотых наночастиц [2].

Идея использования золотых сферических наночастиц различных размеров как оптических зондов была ярко продемонстрирована в работе [3]. Принципы визуализации ПРЧ в световом микроскопе основаны на свойствах КЗ поглощать (просвечивающая) и рассеивать (темнопольная и эпиполяризационная оптика) видимый свет [4].

Применению техники биоимиджинга в системной биологии посвящен обзор [5], при этом отмечается, что доминирующими механизмами проникновения являются клатрин-зависимый механизм, макропиноцитоз и фагоцитоз. Однако механизмы проникновения золотых наночастиц с немодифицированной поверхностью или модифицированных веществами, клеточные рецепторы к которым не установлены, продолжают оставаться открытыми. В работе [6] выдвигается предположение об участи в этих процессах рецепторов-мусорщиков.

Несмотря на то, что КЗ обладает собственной люминисценцией [7], возможности использования его в традиционной флюоресцентной микроскопии весьма ограничены. Это связано с очень малым квантовым выходом, который возрастает с увеличением размера частиц. Однако проницаемость клеточных оболочек для наночастиц имеет размерные ограничения. В связи с этим одной из решаемых в этой работе задач был поиск способов усиления светимости золотых наночастиц дополнительным окрашиванием цитологических препаратов катионными флюоресцентными красителями.

Большинство упомянутых в этом кратком обзоре работ касается применения ПРЧ для диагностики и терапии раковых заболеваний, в то время как возможности использования диагностических маркеров — конъюгатов КЗ — далеко не исчерпаны для целей микроскопической диагностики в микробиологии. Поэтому мы исследовали возможность использования КЗ в качестве носителя антигена для получения диагностической сыворотки и в виде выявляющего агента в составе конъюгата с антивидовыми антителами.

Материалы и методы исследования. В качестве плазмонно-резонансных меток использовали цитратное КЗ, полученное по методу Френса [8], в диапазоне диаметров частиц от 15 до 60 нм

(КЗ-15 – КЗ-60). Для получения поликлональных антител против туберкулина использовали конъюгат туберкулина с КЗ, который получали простым смешением реактивов [9]. Для получения поликлональных антител на туберкулин конъюгат антигена с КЗ вводили 4 кроликам породы шиншилла внутримышечно четырехкратно с интервалом в 14 дней в дозе 7,5 мкг антигена на животное. Кровь у животных на наличие антител брали спустя 10 дней после четвертой инъекции. Контрольной группе вводили неконъюгированный с КЗ туберкулин в аналогичной дозе. Глобулиновую фракцию из сыворотки получали высаливанием сульфатом аммония и обессоливанием на колонке PD-10. Диагностический маркер получали конъюгированием антикроличьих антител с КЗ-15 адсорбционным способом [9]. Для целей конфокальной лазерной сканирующей микроскопии был получен комплекс флюоресцеинизотиоцианат-туберкулин-КЗ-15.

Биологическими объектами являлись культуры клеток почек эмбрионов свиньи (СПЭВ) и человеческих раковых клеток HeLa, полученные из криобанка коллекции клеточных культур лаборатории вирусологии Саратовского научно-исследовательского ветеринарного института РАСХН. Культивирование клеточных культур проводили в пластиковых флаконах в полной RPMI-среде (10% эмбриональной сыворотки, гентамицин, ампициллин, амфотерицин). Выделение перитонеальных макрофагов крыс проводилось по стандартной методике [10]. При постановке эксперимента макрофаги ресуспендировали в среде RPMI до концентрации 2×10^8 клеток на мл.

Световую микроскопию осуществляли на приборах Leica DM 2500 (Leica Microsistems, Германия); конфокальном микроскопе Leica LSM SP-5 в режиме регистрации светорассеяния (при совмещении полосы возбуждения и приема в красной области спектра) и флюоресценции (со спектральным сдвигом соответствующим используемым флюорофорам); лазерном микродиссекторе Leica LMD 7000. Захват и анализ изображений проводили с помощью цифровой видеокамеры Leica DFC 420 C, программного обеспечения Leica Application Suite V 3.1., стандартных программ микродиссектора.

Режим темнопольного (ТП) освещения реализовали на приборах Leica DM 2500 и Leica LMD 7000, используя в качестве источника бокового освещения (БО) осветитель Leica CLS 150 с двумя световодами, располагая наконечники световодов на расстоянии около 2 см по обе стороны от объектива как можно ближе к плоскости объекта. Для получения высокого разрешения использовали объектив 100× NA 1.3, OIL, iris, прикрывая объективную диафрагму так, чтобы в объектив попадал только свет, рассеянный объектом. В случае комбинации БО и дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) его призмы настраивали для получения максимально темного поля.

Для флюоресцентного окрашивания использовали 0,1% раствор Acridine Orange Stain (АО); 0,1% раствор Propidium iodide (PI). Для приготовления рабочих растворов использовали 10 мМ солевой фосфатный буфер.

Результаты исследования и их обсуждение. Одним из вариантов исследования возможности проникновения золотых наночастиц внутрь нефагоцитирующих клеток является наблюдение нефиксированных микропрепаратов во времени. Использование витальных флюоресцентных красителей, например PI, позволило четко выявить ядро и цитоплазму клеток и показать, что золотые наночастицы накапливаются внутри клеток, но не в ядре. Инкубационный период КЗ-40 с клетками СПЭВ составлял 72 ч. На рисунке 1 показаны два изображения клеток СПЭВ, снятые с интервалом 2 с в одной и той же фокальной плоскости. В левой части кадра заметно изменение в расположении светящихся пятен, соответствующих агрегатам золотых наночастиц.

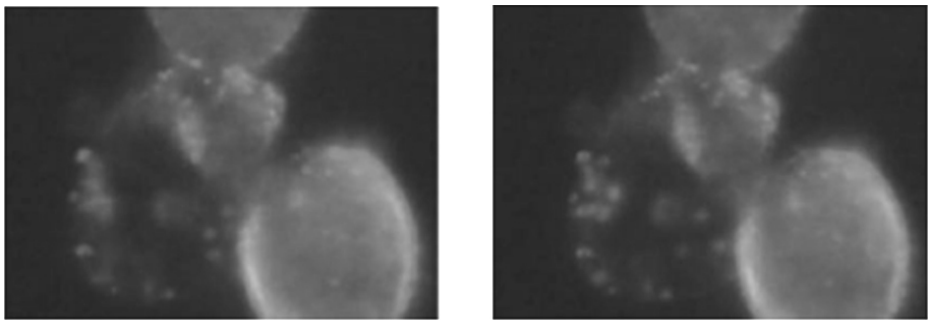


Рисунок 1 — Темнопольные изображения СПЭВ, меченных золотыми наночастицами диаметром 40 нм, сделанные в разные моменты времени (микроскоп Leica DM-2500, объектив 40×)

Следует отметить, что препараты клеток дополнительно окрашивали флюоресцентными красителями PI или АО. В отсутствие такого окрашивания даже сравнительно крупные золотые наночастицы (40–50 нм) визуализировались слабо. На рисунке 2 показаны изображения той же культуры клеток в конфокальном сканирующем лазерном микроскопе в режиме z-stacks при регистрации зеленой флюоресценции и светорассеяния в красной области оптического спектра (окрашивание АО). Сравнение изображений указывает на локализацию ПРЧ как снаружи, так и внутри клеток.

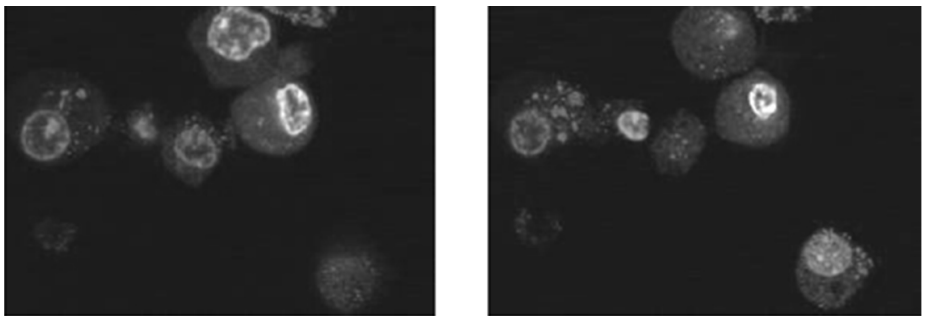
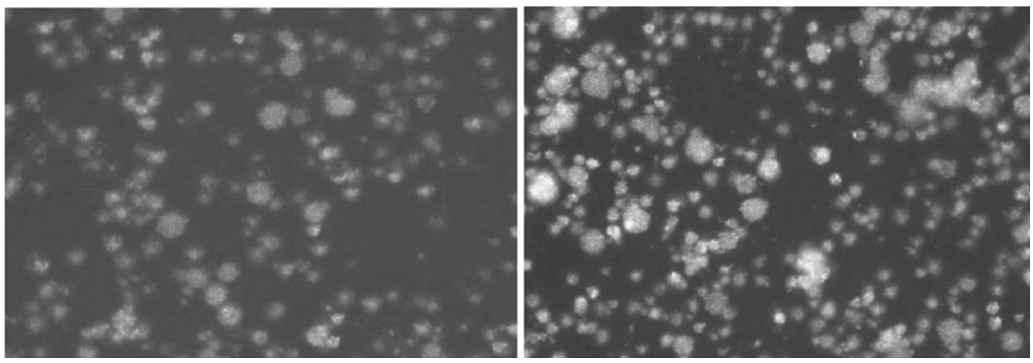


Рисунок 2 — Оптические срезы в позиции z 2,8 мкм и 7,5 мкм СПЭВ, меченных золотыми наночастицами диаметром 40 нм и окрашенных АО, в режиме регистрации флюоресценции и светорассеяния (микроскоп Leica TCS-SP5)

По всей видимости, АО, сорбируясь на частицах золота, увеличивает их сечение рассеяния, тем самым усиливая светимость золотых наночастиц в препаратах животных клеток. Это позволяет исследовать локализацию ПРЧ диаметром менее 50 нм методами темнопольной световой и конфокальной лазерной микроскопии в режиме немультифотонной флюоресценции. Кроме того, использование флюоресцентного красителя PI позволяет проводить дифференциальное окрашивание на предмет выявления неживых клеток, регистрируемых как ярко светящиеся красным объекты при соответствующем режиме люминесцентного освещения.

Окрашенные АО структуры, видимые в проходящем свете как желто-оранжевые (красные в режиме флюоресценции), также могут давать в темном поле желто-оранжевые цвета. Отличить такие окрашенные структуры от ПРЧ можно по выгоранию флюоресценции, в то время как АО и другие флюорофоры, адсорбированные на ПРЧ, полностью или частично гасятся. В последнем случае ПРЧ выглядят темными пятнами на фоне светящихся объектов в режиме флюоресценции (без БО).

В случае использования нами конъюгата флюоресцеинизотиоцианат-туберкулин-КЗ-15 тушение флюоресценции было неполным, что позволило зафиксировать проникновение комплекса внутрь перитонеальных макрофагов крысы в серии оптических срезов (z-стеков), полученных на конфокальном лазерном микроскопе в режиме зеленой флюоресценции. На препаратах клеток, не инкубированных с конъюгатами золотых частиц, все макрофаги выглядят как слабо светящиеся объекты (рисунок 3, А.). Клетки, которые были предварительно инкубированы в течение не менее 2 ч, на препаратах выглядели существенно более контрастно. При этом во многих клетках видны включения оранжевого и розового цвета. Следует отметить, что индивидуальные золотые сферические частицы практически неразличимы в обычных световых микроскопах даже в режимах ТП. Ранее нами было показано, что при агрегации сферических ПРЧ максимум светорассеяния коллективных резонансов смещается в длинноволновую область. Цвет при этом изменяется на красно-оранжевый, что хорошо заметно на рисунке 3, Б.



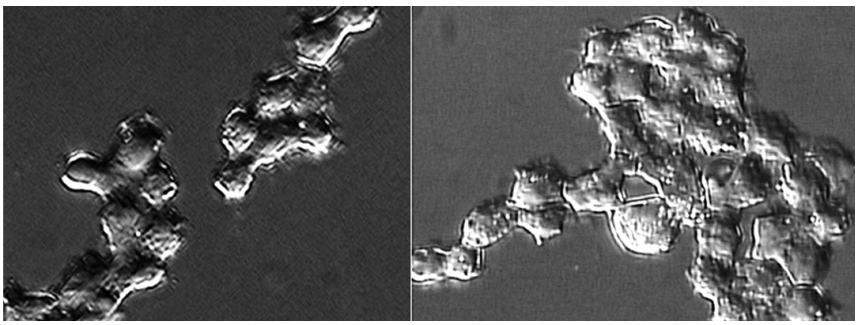
А Б

Рисунок 3 — Темнопольное изображение перитонеальных макрофагов крысы (А), меченных конъюгатом КЗ с туберкулином (Б) (микроскоп Leica DM-2500)

Для выяснения локализации коллоидно-золотых оптических зондов снаружи или внутри клеток были проведены эксперименты по лазерному сканированию препаратов в конфокальном микроскопе. В качестве флюоресцентного зонда был использован флюоресцеинизотиоцианат, конъюгированный с туберкулином.

Регистрацию микроизображений проводили как в режимах люминесценции, характерной для флюоресцеина, так и при возбуждении в зоне поглощения КЗ и приема в ближней стоксовой или антистоксовой области. При этом максимальная светимость была зарегистрирована в позициях, соответствующих центральным областям клеток, что свидетельствовало о нахождении конъюгатов золотых частиц внутри макрофагов.

Весьма перспективным представляется способ комбинированного освещения, сочетающего ДИК и ТП (БО). При настройке призм ДИК для получения максимального затемнения золотые наночастицы (КЗ-50) отчетливо визуализируются в виде желтых и оранжевых пятен на сине-сером фоне клеток. На рисунке 4 приведены изображения клеток HeLa: контроль, и после инкубации с КЗ-50 (примерно 3000 частиц на клетку) в течение 72 ч. Необходимо отметить, что достаточно четкого различия удается достичь лишь на влажных препаратах.



А Б

А — контроль, Б — инкубированных с немодифицированным КЗ-50 (микроскоп — LMD-7000, объектив 63×)

Рисунок 4 — Изображения клеток HeLa в режиме ДИК-БО

Одним из преимуществ темнопольной микроскопии является возможность изучения живых клеток. Принципиальным отличием спектров резонансного светорассеяния является наличие заметного максимума в видимой области в отличие от оптически мягких частиц, имеющих экспоненциальный характер спектра. Вследствие этого при освещении белым светом в ТП светового микроскопа ПРЧ выглядят как цветные точки на серо-голубом фоне клеток. При микроскопии ТП с БО следует учитывать интерференцию рассеянного излучения, дающую различные цветовые эффекты, влияние которой возрастает при использовании некоаксиального освещения.

Для выявления микобактерий мы изучили возможность применения полученных нами поликлональных антител против вакцинного штамма БЦЖ в препаратах для световой микроскопии.

На рисунке 5 показаны препараты *M. bovis* вакцинного штамма БЦЖ. Микробные клетки выявляли поликлональными антителами к туберкулину и контрастировали антикроличьими антителами, конъюгированными с КЗ. Одиночные клетки отчетливо визуализировались как темно-красные палочки даже без каких-либо средств физического контрастирования в просвечивающем режиме.

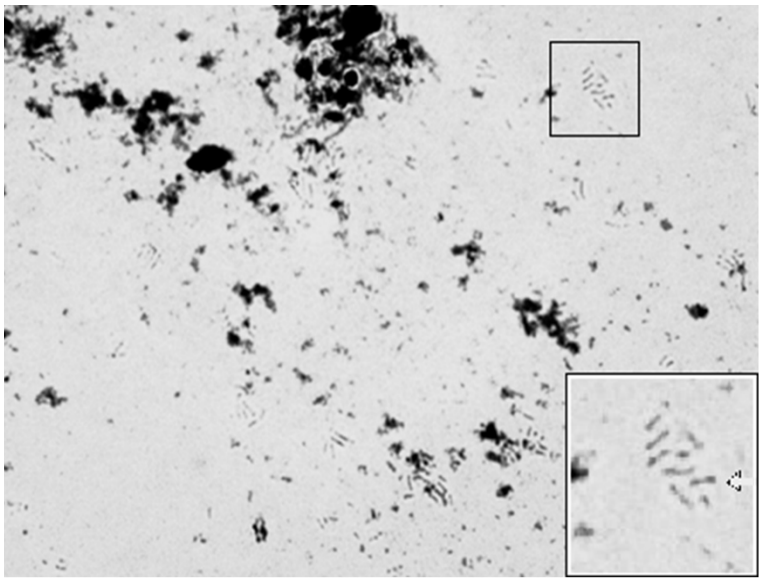


Рисунок 5 — Выявление туберкулинового антигена на клетках *M. bovis* штамма БЦЖ при помощи поликлональных антител. Выявление проводили с использованием конъюгатов антикроличьих антител с КЗ (микроскоп Leica DM-2500, объектив 100×, МИ)

Анализируя полученные результаты, можно отметить, что поликлональные антитела, полученные с использованием КЗ как носителя антигена (туберкулина), можно успешно применять в иммунологических исследованиях с применением самых простых просвечивающих микроскопов.

Заключение. В плане выявления размерной зависимости проникновения золотых наночастиц внутрь живых клеток были проведены эксперименты по инкубированию клеток различных типов с золотыми сферическими наночастицами различных размеров (15–60 нм в диаметре). Использование различных флюоресцентных красителей и зондов (АО, PI, флюоресцеинизотиоцианата) позволило установить локализацию ПРЧ снаружи и внутри клеток методами конфокальной лазерной и световой темнопольной микроскопии с одновременным определением жизнеспособности клеток. Локализация наночастиц или их агрегатов внутри живых клеток была подтверждена как методом оптических срезов (z-stacks), так и по кинетике изменения изображения фиксированного поля зрения. Удобство такой схемы освещения заключается в том, что она может быть совмещена с флюоресцентным возбуждением, кросс-поляризацией и ДИК. Еще одной отличительной особенностью ПРЧ является то, что их цвет (светорассеяния) практически не зависит от pH, ионной силы, показателя преломления среды микроокружения.

Антитела против туберкулина, полученные с использованием в качестве носителя КЗ, при контрастировании конъюгатом КЗ с антикроличьими антителами давали четкое изображение в мазках вакцинного штамма БЦЖ в просвечивающей световой микроскопии. В дальнейшем полученные антитела планируется использовать для создания диагностикума на *M. tuberculosis*.

Литература

1. Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images / S.-H. Wang [et al.] // J. Nanobiotechnology. — 2010. — Vol. 8:33. — doi:10.1186/1477-3155-8-33.

2. El-Sayed, I.H. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer / I.H. El-Sayed, X. Huang, M.A. El-Sayed // Nano Lett. — 2005. — Vol. 5. — P. 829–834.

3. Yguerabide, J. Resonance light scattering particles as ultrasensitive labels for detection of analytes in a wide range of applications / J. Yguerabide, E. guerabide // J. Cell Biochem. — 2001. — Vol. 37. — P. 71–81.

4. Roth, J. The colloidal gold marker system for light and electron cytochemistry / J. Roth // Techniques in Immunocytochemistry / Eds. G.R. Bullock, P. Petrusz. — London: Acad. Press., 1983. — Vol. 2. — P. 217–284.

5. Nanoparticles for applications in cellular imaging / K.T. Thurn [et al.] // Nanoscale Res. Lett. — 2007. — Vol. 2. — P. 430–441.

6. Macrophage scavenger receptor A mediates the uptake of gold colloids by macrophages *in vitro* / A. França [et al.] // Nanomedicine (Lond.). — 2011. — doi: 10.2217/nnm.11.41.

7. He, H. Nonbleaching fluorescence of gold nanoparticles and its applications in cancer cell imaging / H. He, C. Xie, J. Ren // Anal. Chem. — 2008. — Vol. 80. — P. 5951–5957.

8. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions / G. Frens // Nature Phys. Sci. — 1973. — Vol. 241. — P. 20–22.

9. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение / Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев, С.Ю. Щёголев, Н.Г. Хлебцов. — М.: Наука, 2008. — 319 с.

10. Фримель, Г. Иммунологические методы / Г. Фримель. — М.: Медицина, 1987. — 472 с.

Поступила 25.07.2011

GOLD NANOPARTICLES AS A UNIVERSAL AGENT IN DIAGNOSTIC SYSTEMS

Bogatyrev V.A.[1,2], Dykman L.A.[1], Staroverov S.A.[1], Bibikova O.A.[2], Sokolov O.I.[1]

[1]Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms;
[2] N.G. Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia

Diagnostic systems with gold nanoparticles can be used as an alternative to immunofluorescence diagnosticums. Discusses the various combinations of physical and chemical staining allowing to obtain from the gold nanoparticles at the level of dark field light microscopy clearly recorded signals, which allows the use of automated capture and analyze images with large fields of view. In this paper, the possibility of using gold nanoparticles as carriers of antigens with adjuvant properties, means of drug delivery and identifying agents (optical probe) are reviewed.

Keywords: gold nanoparticles, antigens, antibodies, diagnostics, microscopy.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ БИОПЛЕНОК С ПОМОЩЬЮ КОНФОКАЛЬНОЙ И СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Плотников Ф.В., Окулич В.К., Кабанова А.А., Богдан Н.Ю., Сенькович С.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 визуально оценить формирование бактериями биопленки *in vitro* в кратчайшие сроки при помощи окраски специфическими красителями, используя световую и конфокальную микроскопию.

Ключевые слова: биопленка, бактерия, антибиотикорезистентность, конфокальная и световая микроскопия.

Введение. Патогенные микроорганизмы различных видов способны в определенных условиях вызывать инфекционный процесс у человека. Не каждое инфицирование сопровождается развитием инфекционного заболевания, вероятность его определяется многими факторами: состоянием макроорганизма и характеристиками штаммов бактерий [1]. Одной из таких характеристик является способность микроорганизмов образовывать сообщества — биопленки.

До конца прошлого века микробиология развивалась главным образом на основе исследований чистых культур микроорганизмов. Более того, восприятие бактерий как одноклеточных форм жизни глубоко укоренилось именно благодаря исследованиям на чистых культурах. Традиционный путь культивирования бактерий в жидкой среде прояснил многие аспекты физиологии микроорганизмов, однако рост чистой культуры во взвешенном состоянии встречается в природе крайне

редко. В настоящее время признано, что абсолютное большинство микроорганизмов в естественных и на искусственно созданных окружающих средах существует в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ — биопленок [2]. Эти сообщества бактерий, окруженные экзополисахаридным матриксом, функционируют как скоординированный консорциум и демонстрируют изменение фенотипа, выражающееся в изменении параметров роста и экспрессии специфичных генов [3].

В литературе описаны различные механизмы прикрепления микроорганизмов. Некоторые из них требуют вовлечения специальных приспособлений, таких как, фимбрии и пили. Однако наиболее простой и универсальный способ прикрепления заключается в выработке экстрацеллюлярного матрикса с образованием слизи, покрывающей поверхность прикрепления [4].

Экстрацеллюлярный матрикс, состоящий из экзополисахаридов, выделяемый микробами и несущий важные функции в жизнедеятельности биопленки, занимает 85% массы биопленки. Последняя не является однородной субстанцией, она гетерогенна в пространстве и во времени, сквозь нее проходят водные каналы, несущие питательные вещества и вымывающие продукты жизнедеятельности микроорганизмов.

Показано, что микробные биопленки играют роль в патогенезе многих острых и, особенно хронических бактериальных инфекций у человека [5]. Кроме тканей организма хозяина, микробные биопленки колонизируют различные медицинские устройства небиологической природы, внедряемые в организм человека (катетеры, водители ритма, механические протезные сердечные клапаны, ортопедические устройства) [6].

В составе биопленки бактерии защищены от антибактериальных веществ, бактериофагов, простейших, поэтому возбудители инфекций, образующие биопленки, также обладают повышенной устойчивостью к воздействию антибиотиков, успешно противостоят антителам, фагоцитам и другим, потенциально опасным для них факторам окружающей среды [7]. Стандартная терапия способна справиться только с отдельно существующими планктонными клетками, в то время как бактерии внутри биопленки способны размножаться и вновь диссеминировать даже после завершения курса лечения, формируя хронические инфекционные процессы и вызывая рецидивовы заболевания [8].

Прямая визуализация с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), возможно, один из самых важных инструментов для идентификации и изучения структуры биопленки. КЛСМ позволяет получить трехмерное изображение биопленки без ее разрушения, определяя флуоресценцию как бактериальных клеток так и внеклеточных полимерных веществ [9].

Из-за более низкого разрешения световая микроскопия используется не так часто. Однако при помощи разработанной техники окраски процедура визуализации биопленки упрощается и может быть проведена за счет определения наличия межклеточного полисахаридного матрикса, специфичным красителем для которого является Конго красный [4].

Цель исследования — разработать метод визуализации биопленок в культурах микроорганизмов с помощью конфокальной и световой микроскопии.

Материалы и методы. Для разработки метода визуализации биопленок использовали клинический изолят *Pseudomonas aeruginosa* № 539/2011, полученный из микробиологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии».

Выращивание биопленки. Готовили взвесь микроорганизмов в бульоне Мюллера — Хинтона с оптической плотностью на денсометре 0,5 единиц, что соответствует концентрации $1{,}5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Далее добавляли 1 мл полученной бактериальной взвеси к 10 мл бульона Мюллера — Хинтона и вносили в стерильную чашку Петри с покровным стеклом, которое предварительно стерилизовали этиловым спиртом. Инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24 часов.

Для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии использовали микроскоп Leica TCS SPE с программным обеспечением LAS AF. Покровное стекло с биопленкой осторожно извлекали из чашки Петри. С целью очищения и для последующей фиксации протирали с одной стороны этиловым спиртом, осушали ватным тампоном и фиксировали к предметному стеклу бесцветным ацетонсодержащим лаком. Высушивали в течение 20–30 мин. Далее производили окраску препаратов 1% спирто-феноловым раствором ауромина или насыщенным водным раствором Конго красного либо изучали аутофлюоресценцию без окраски. При окраске ауромином для сканирования препа-

ратов использовали: возбуждающий лазер — 488 нм, область детекции — 500–600 нм; при окраске Конго красным: возбуждающий лазер — 532 нм, область детекции — 550 600 нм; при использовании аутофлюоресценции: возбуждающий лазер — 405 нм, область детекции — 400–650 нм. Сканирование производилось на всю толщину препарата с шагом 0,5 мкм, площадь сканирования — 0,013 мм^2, с разрешением микроскопа в горизонтальной плоскости 150 нм. Толщину биопленки определяли как расстояние между границами флюоресценции по оси Z.

Для оценки при помощи световой микроскопии применяли красители — водный раствор Конго красного с добавлением 10% раствора Твин 80 и 10% карболовый фуксин. Для визуализации биопленок использовали микроскоп с иммерсионным объективом 100 при увеличении х1000 и цифровую фотокамеру Leica DFC 295 с программным обеспечением LAS V.3.6.0.

Результаты исследования. В качестве контроля образования биопленок использовали данные КЛСМ. При окраске ауромином биопленка визуализировалась на всю толщину преимущественно за счет бактериальных клеток. На построенных 3D-моделях было четко видно правильное расположение бактериальных клеток в виде сетчатой структуры. При сканировании препаратов, окрашенных Конго красным, бактериальные клетки не визуализировались из-за более интенсивной окраски экзополисахаридного матрикса [4]. Биопленка визуализировалась в виде однородного слоя с относительно четкими верхней и нижней границами. При сканировании неокрашенных препаратов тела бактериальных клеток визуализировались плохо на фоне интенсивной флюоресценции матрикса. Однако аутофлюоресценция позволяла оценить толщину, структуру биопленки, а также измерить интенсивность флюоресценции.

В ходе проведения исследования был разработан метод визуализации биопленки *in vitro* при помощи световой микроскопии. Последовательность выполнения метода: покровное стекло с биопленкой осторожно извлекали из чашки Петри. С целью очищения и для последующей фиксации протирали с одной стороны этиловым спиртом, осушали ватным тампоном и фиксировали к предметному стеклу бесцветным ацетонсодержащим лаком. Обрабатывали аэрозольным фиксатором Aerocell и высушивали в течение 20–30 мин. Препарат окрашивали в течение 15 мин смесью (2:1) насыщенного водного раствора Конго красного с добавлением 10% раствора Твин 80, промывали проточной водой и высушивали. Далее препарат докрашивали в течение 6 мин 10% карболовым фуксином, повторно промывали проточной водой и высушивали. Проводили оценку с помощью светового микроскопа под иммерсионным объективом 100 при увеличении х1000, изображение фиксировали при помощи цифровой фотокамеры Leica DFC 295 с программным обеспечением LAS V.3.6.0. При этом клетки бактерий в результате окрашивания карболовым фуксином имели насыщенный пурпурно-красный цвет, а матрикс, окрашенный Конго красным, — оранжево-розовый.

Также разработан метод определения толщины биопленки при помощи световой микроскопии. Последовательность выполнения метода: под объектив 100 без иммерсии светового микроскопа Leica DFC 295 при увеличении х1000 устанавливали камеру Горяева, заполненную красителем Конго-красным. Определяли точки фокусировки сверху и снизу, отмечая при этом показатели на микровинте микроскопа. Вычисляли разность между наивысшей и низшей точками фокусировки. Вычисляли цену деления микровинта по высоте камеры Горяева, равной 0,1 мм. При использовании иммерсионного объектива необходимо учитывать индекс рефракции, равный 1,33. Под объектив помещали приготовленный препарат окрашенной биопленки. Определяли точки фокусировки сверху и снизу, отмечая при этом показатели на микровинте микроскопа, вычисляли разность. Умножали цену деления на разность точек фокусировки препарата и определяли толщину биопленки.

В настоящее время изучается процесс формирования биопленки во времени и зависимость интенсивности образования биопленки от патогенности бактерий. Разрабатываются методики оценки чувствительности популяций бактерий, образующих биопленки, к антибиотикам.

Выводы:

1. Используя красители аурамин, Конго-красный при помощи КЛСМ возможна визуализация структурных компонентов биопленки, что позволяет оценивать ее основные характеристики: толщину, интенсивность флюоресценции, структуру.

2. Разработан и стандартизован метод получения и учета биопленок с определением их толщины, который позволяет получать результат в течение 18–24 часов, обеспечивает выявление бактерий, образующих биопленку. Предлагаемый метод может быть использован в бактериологических

лабораториях с целью визуальной оценки образования биопленки микроорганизмами, что расширяет возможности дальнейшего изучения данного феномена.

Литература

1. Антибактериальная терапия в гнойной хирургии: руководство / Под ред. А.Н. Косинца. — Витебск: ВГМУ, 2002. — С. 30–31.

2. Davey, M.E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics / M.E. Davey, G.A. O'Toole // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2000. — Vol. 64, N 4. — P. 847–867.

3. Microbial biofilms / J. W. Costerton [et al.] // Annu. Rev. Microbiol. — 1995. — Vol. 49. — P. 711–745.

4. Allison, D.G. A staining technique for attached bacteria and its correlation to extracellular carbohydrate production / D.G. Allison, I.W. Sutherland // J. Microbiol. Meth. — 1984. — Vol. 2. — P. 93–99.

5. Costerton, J.W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // Science. — 1999. — Vol. 284. — P. 1318–1322.

6. Estivill, D. Biofilm formation by five species of Candida on three clinical materials / D. Estivill, A. Arias // J. Microbiol. Meth. — 2011. — Vol. 86, N 2. — P. 238–242.

7. Mechanical robustness of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / O. Lieleg [et al.] // Soft Matter. — 2011. — Vol. 7, N 7. — P. 3307–3314.

8. Differences in metabolism between the biofilm and planktonic response to metal stress / S.C. Booth [et al.] // J. Proteome Res. — 2011. — Vol. 10, N 7. — P. 3190–3199.

9. Optical sectioning of microbial biofilms / J.R. Lawrence [et al.] // J. Bacteriol. — 1991. — Vol. 173. — P. 6558–6567.

Поступила 13.08.2011

VISUALIZATION OF THE BIOFILMS BY CONFOCAL AND LIGHT MICROSCOPY

Plotnikov P.V., Okulich V.K., Kabanova A.A., Bogdan N.J., Senkovich S.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 Congo red in Tween 80 can be used to stain biofilm EPS which often appear pinkish-orange while the organisms appear purplish-red when stained with Ziehl carbol fuchsin. These stain technique expands the possibilities for further study of this phenomenon.

Keywords: biofilm, bacteria, antibiotic resistance.

УПРАВЛЯЕМАЯ ФИКСАЦИЯ КОНФОРМАЦИОННО-ИЗМЕНЕННЫХ БЕЛКОВ НА ЛОКАЛЬНО АКТИВИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТИ КРЕМНИЯ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛОВЕКА

Капитулец С.П.[1], Жавнерко Г.К.[2], Парибок И.В.[2], Капитулец Н.Н.[1], Полещук Н.Н.[1], Агабеков В.Е.[2]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;

[2]Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Резюме. Предложен новый способ управляемой фиксации конформационно-измененных амилоидных белков на локально-активированной поверхности кремния при нейродегенеративных заболеваниях человека и представлены первые результаты его практического использования по выявлению патологического протеазоустойчивого прионного белка (инфекционного коррелята трансмиссивных губкообразных энцефалопатий) в органах и тканях сирийских золотистых хомяков с экспериментальной инфекцией скрепи.

Ключевые слова: нейродегенеративные болезни, аномальный протеазоустойчивый прионный белок, атомно-силовая микроскопия, локально активированная поверхность кремния.

Введение. В настоящее время значительные усилия неврологов, невропатологов и специалистов, работающих в области протеомики и нанотехнологий по-прежнему направлены на разработку прижизненных способов выявления патологических амилоидных белков, ответственных за развитие большой группы нейродегенеративных заболеваний человека: болезнь Альцгеймера, сосудистая деменция, болезни Пика, Гентингтона, Паркинсона и др. [1]. Разработка новых сверхчувствительных преклинических способов анализа и концентрирования молекул патологического амилоидного белка в клинических образцах остается приоритетной задачей и для диагностики прионных инфекций или трансмиссивных губкообразных энцефалопатий (ТГЭ). Используя метод конфокальной двухцветной флуоресцентной спектроскопии, уже удалось обнаружить инфекционную форму приона (PrP^d) в цереброспинальной жидкости, т.е. сделать шаг к прижизненной диагностике ТГЭ [2]. Сейчас предприняты попытки использовать возможности сканирующей зондовой микроскопии для дифференциальной детекции конформационных изоформ молекулы приона, так называемых PrP^C/PrP^d-конформеров [3]. Данные подходы при всей их сложности позволяют получать уникальную информацию о структурных различиях конформационных вариантов молекулы приона, ранее называемых штаммами, (по аналогии с вирусами и бактериями), и различающихся по инкубационному периоду и зонам преимущественного накопления в отделах мозга.

Результаты последних работ, посвященных количественному определению нормальной формы прионного белка и его патогенной изоформы в диссоциированных лимфоузлах и периферических лимфоцитах крови овец, инфицированных скрепи [4, 5], свидетельствуют о том, что уровень чувствительности подобного теста должен соответствовать нескольким атоммолям. По нашему мнению, на современном этапе перспективным для разработки преклинической диагностики прионных инфекций являются современные методы протеомики и нанотехнологий, включающие сканирующую зондовую и атомно-силовую микроскопию [6].

Обнаружение конформационно-измененных белков в анализируемой пробе посредством направленного концентрирования этого белка или его фрагментов на заданных участках локально активированной моноклональными антителами и белком-сравнения поверхности твердой подложки («иммуночип») с последующей оценкой результата методом атомно-силовой микроскопии до настоящего времени нигде не проводилось**.**

Цель исследования: разработать способ управляемой фиксации конформационно-измененных белков на локально активированной поверхности кремния при нейродегенеративных заболеваниях человека (на модели аномальной протеазоустойчивой изоформы прионного белка PrP27-30).

В задачи исследования входило: 1) отработать условия гидрофилизации поверхности кремния; 2) провести локальную активацию поверхности кремния методом микроконтактной печати (МКП); 3) отработать условия стабилизации антиприонных антител на гидрофильной поверхности кремния; 4) отработать условия взаимодействия «антиген — антитело» в процессе инкубации исследуемой пробы на локально-активированной поверхности кремния и 5) осуществить избирательную адсорбцию исследуемого конформационно-измененного белка на гидрофильной поверхности кремния.

Материалы и методы. В работе использовали аутоптаты органов 3 золотистых сирийский хомяков с экспериментальной инфекцией скрепи, штамм 263 К (головной мозг, селезенка, печень, почки) и мононуклеары периферической крови (МПК). Инфекцию скрепи на лабораторных животных воспроизводили как описано ранее [7]. Кусочки органов (0,5–0,7 г) помещали в контейнер для гомогенизации Prypcon, добавляли десять объемов рабочего раствора (фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), pH 7,4, содержащий 0,5% нонидет P-40 и 1% дезоксихолат натрия) и обрабатывали в гомогенизаторе PrioGENIZER™ (Швейцария) при 20 000 ± 1 000 об/мин в течение 45 ± 5 с. Получали 10% суспензию. В исследованиях использовали 10-кратные разведения аутоптатов органов на ФСБ, pH 7,4, от 10^{-1}до 10^{-6}.

Аликвоты полученных разведений (по 100 мкл) отбирали в промаркированные микропробирки типа «Эпендорф». Затем в них добавляли протеиназу К (P5568, Sigma, США) до конечной концентрации 100 мкг/мл и обрабатывали в микропланшетном инкубаторе при 47 ± 1 °С в течение 1 часа. Реакцию протеолиза останавливали добавлением 10 мкл раствора для остановки переваривания (1 мМ фенилметилсульфонил флюорида (P7626, Sigma, США). До исследования пробы хранили при –20 °С.

Кровь от лабораторных животных, находящихся в терминальной стадии инфекции, собирали в отдельную коническую пробирку и дефибринизировали покачиванием с использованием стеклянных бус (диаметр 2 мм), пока кровь не свернется. Дефибринизированную кровь разбавляли ФСБ, pH 7,4, в соотношении 1:1 и наслаивали в пробирку объемом 15 мл на 3 мл 9% градиента плотности метризоат — фиколл. Центрифугировали при 1500 об/мин при комнатной температуре. Слой мононуклеаров на градиенте раздела фаз собирали в чистую центрифужную пробирку, разбавляли 4-кратным избытком ФСБ, pH 7,4, перемешивали и центрифугировали при 300 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. Осадок МПК ресуспендировали в 1 мл раствора для гомогенизации (ФСБ, pH 7,4, 0,5% нонидет Р-40, 1% дезоксихолат натрия).

В качестве антиприонных антител использовали коммерческие анти-PrP моноклональные антитела (МАТ): 3F4 (P1115, Sigma, США) и 6H4 (Prionics AG, Швейцария) в рабочих разведениях 1:5000, имеющих высокую специфичность к PrP человека и многих видов животных. Дополнительно использовали МАТ: 6A5, 7F7, 2C8 и 9C12 (пр-во Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН РФ, Москва), которые были получены к рекомбинантному прионному белку скрепи PrP^{Sc} (120–240 а.о.) методом гибридом путем иммунизации мышей рекомбинантным PrP, культивированием спленоцитов из селезенки с миеломными клетками $SP_{2/0}$-Ap14 с последующим выделением и очисткой специфических IgG. Активность МАТ колебалась в пределах 1:3000–1:5000. Рабочие концентрации антиприонных МАТ получали разведением буфером TBST (0,05 М трис-HCl, pH 7,4, 0,138 М NaCl, 0,0027 М KCl, 0,05% твин-20) и использовали в объеме 50 мкл (30 мин при 37 °С). В серии экспериментов исследовали комбинации антиприонных МАТ в соотношении 1:1.

Взаимодействие PrP^{Sc} из анализируемых гомогенатов органов с антиприонными МАТ, иммобилизованными на поверхности кремния, проводили путем добавления 50 мкл анализируемого образца на 30 мин при 37 °С с последующей тщательной отмывкой буфером TBST.

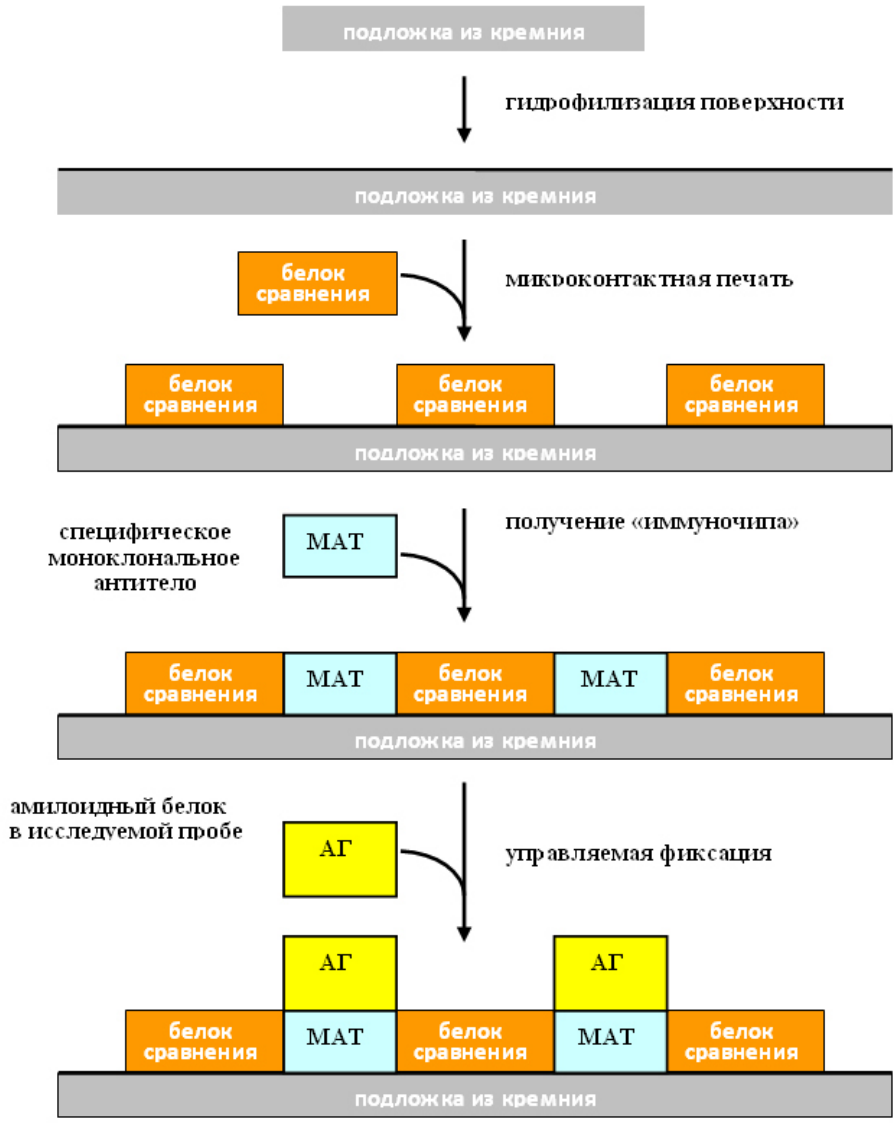
Выявление белковых агрегатов на кремневой подложке осуществляли методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) путем сканирования поверхности подожки с помощью микроскопа Nanoscope IIIa (Veeco, США), оборудованного «D-сканером» в контактном режиме (contact mode) и в режиме прерывистого контакта (tapping mode). Были использованы контактные 100- и 200-мкм кантилеверы «Nanoprobe» из Si_3N_4 с константой упругости 0,12 и 0,36 N/m и тейпинговые иглы из кремния с резонансной частотой ~315 кГц. Сила воздействия иглы на образец в контактном режиме составляла единицы нН. Частоту строчной развертки при получении изображения варьировали от 1 до 5 Hz.

Основные результаты и обсуждение. Предложенный нами алгоритм управляемой фиксации конформационно-измененного амилиоидного белка из исследуемого образца на локально активированную поверхность кремния представлен на рисунке 1.

В соответствии с предложенной идеей в серии экспериментов были приготовлены специфически активированные подложки кремния для сканирования методом АСМ. На первом этапе были улучшены условия активации/пассивации кремневой поверхности для повышения качества микроструктурированных белковых пленок, используемых для анализа методом АСМ.

Подложки из кремния подвергали гидрофилизации путем нагревания в смеси H_2O:H_2O_2:NH_4OH (в отношении 5:1:1) в течение 10–15 мин при температуре 67–72 °С с последующей тщательной промывкой бидистиллированной водой и сушкой в токе азота.

Для проведения микроконтактной печати в качестве «мастера» использовали кремневую калибровочную решетку для атомно-силового микроскопа TGZ3 (высота «ступенек» 540 ± 2 нм, шаг 3 мкм). Реплику (микроштамп) получали, сшивая полидиметилсилоксановый олигомер (ПДМС) на «мастере». Для этого форполимер и катализатор смешивали в массовом соотношении 10:1, смесь деаэрировали с помощью водоструйного насоса в течение 15–20 минут, после чего наносили тонким слоем (~0,5 мм) на поверхность «мастера». Далее проводили термополимеризацию при температуре 100 ± 5 °С в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры микроштамп отделяли от «мастера» (рисунок 2).

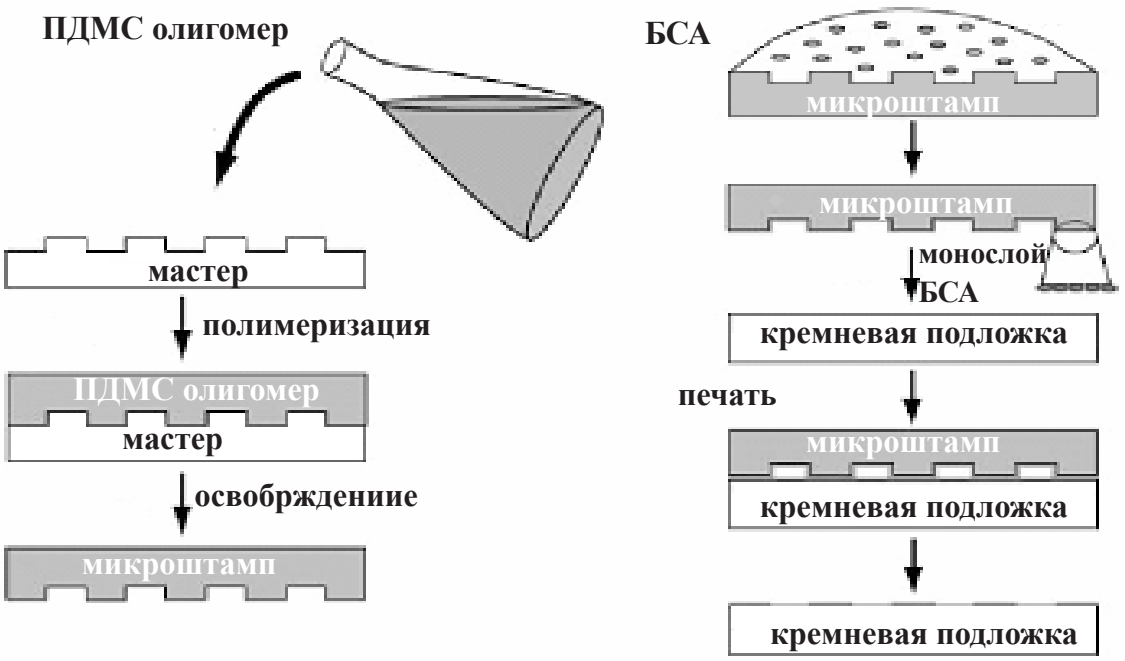


МАТ — моноклональное антитело; АГ — антиген

Рисунок 1 — Алгоритм управляемой фиксации конформационно-измененного белка на локально активированной поверхности кремния при нейродегенеративных заболеваниях человека

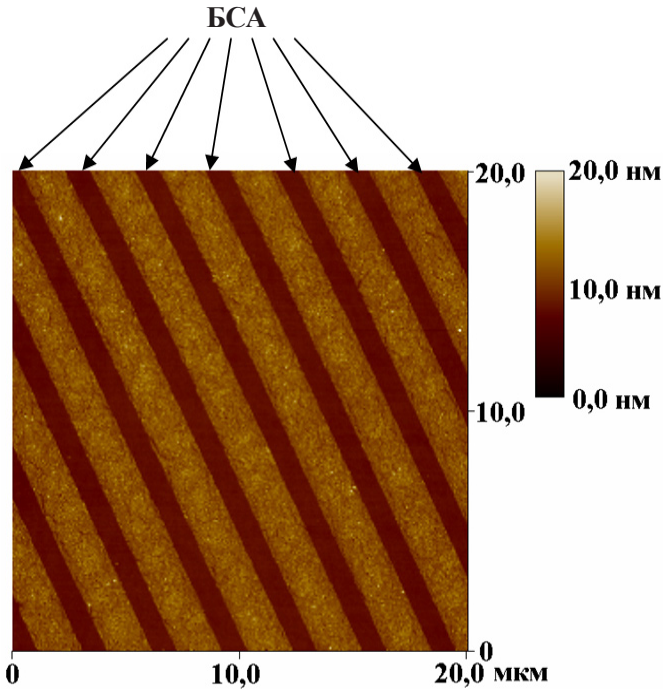
В качестве белка-сравнения использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) для иммунологичесиких исследований (A3294, Sigma, США). БСА адсорбировали на поверхность микроштампа из водного раствора с концентрацией 1 мг/мл, помещая каплю раствора на поверхность штампа на 15 минут. Затем поверхность микроштампа отмывали от избытка адсорбата и высушивали в токе азота.

Адсорбированное на микроштампе вещество (БСА) переносили на твердую поверхность гидрофильного кремния, приводя в соприкосновение с модифицируемой поверхностью на 40–60 с. В результате на поверхности кремния «отпечатывались» полосы БСА. Полученный образец высушивали при комнатной температуре и хранили до использования. Контроль иммобилизации БСА на поверхность гидрофильного кремния осуществляли методом атомно-силовой микроскопии (рисунок 3).



ПДМС — полидиметилсилоксановый олигомер; БСА — бычий сывороточный альбумин

Рисунок 2 — Локальная модификация гидрофильной поверхности кремния методом микроконтактной печати



БСА — бычий сывороточный альбумин (1 мг/мл)

Рисунок 3 — Образец с микроконтактной печатью

Причем эти полосы четко отличались от немодифицированных участков подложки, служащих поверхностью сравнения (рисунок 3). Перепад высот у БСА при МКП составил 1,66 ± 0,2 нм. БСА блокировал неспецифическую адсорбцию на модифицированной поверхности, что обеспечивало эффективную иммобилизацию МАТ в промежутки между полосами БСА.

Иммобилизацию МАТ на локально-активированные БСА кремневые поверхности проводили, как описано в «Материалах и методах». При этом БСА служил в качестве белка, промотирующего адсорб-

цию МАТ. Рабочие разведения МАТ наносили на подложку в объеме 50 мкл и обрабатывали 15 мин при комнатной температуре. Затем подложки тщательно промывали и высушивали на воздухе.

При анализе АСМ-изображений, полученных после иммобилизации МАТ на поверхность гидрофильного кремния, было установлено, что уровень полос иммобилизованных МАТ был лишь незначительно ниже уровня полос БСА (≤0,1 нм).

Модифицированная кремневая подложка с локально нанесенными полосами бычьего сывороточного альбумина и иммобилизованными в промежутках между ними различными антиприонными МАТ или их комбинациями представляет собой иммуносенсор («иммуночип»), специально разработанный нами для управляемой фиксации патологическиого прионного белка (PrP^d) или его компонента (PrP27-30) на подложке при диагностике прионных инфекций. Для работы использовали «иммуночипы», поверхность которых при сканировании АСМ являлась практически ровной, без четко регистрируемых углублений и впадин.

Управляемую фиксацию PrP27-30 осуществляли последующим нанесением на поверхность кремния («иммуночипа») серийных десятикратных разведений (от 10^{-1} до 10^{-6}) аутоптатов органов сирийских хомяков с экспериментальной инфекцией скрепи до и после ферментативной обработки протеиназой К (100 мкг/мл, 37 °С, 1 час). Отмывание и высушивание образцов проводили, как описано выше.

Эффективность взаимодействия иммобилизованных на поверхности МАТ с PrP27-30 из гомогенатов органов исследовали на участках между полосами БСА. В серии экспериментов ферментативное переваривание проводили непосредственно на поверхности гидрофильного кремния. Анализ образующихся макромолекулярных белковых комплексов антиген — антитело на поверхности кремния проводили на воздухе в контактном режиме и режиме прерывистого контакта. «Иммуночипы» с нанесенным материалом помещали во влажную камеру и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После инкубации «иммуночипы» тщательно промывали дистиллированной водой (5 раз по 200 мкл) и высушивали на воздухе.

Присутствие протеазоустойчивой формы прионного белка (PrP^d) в исследуемой пробе устанавливали при сканировании поверхности «иммуночипов» методом АСМ по обнаружению узких полос белковых комплексов, превышающих уровень полос БСА.

На АСМ-изображениях выявлялись узкие, равномерно чередующиеся полосы белкового материала высотой 1,1–3,1 нм (в среднем 1,6 ± 0,2 нм), ограниченные широкими полосами-сравнения БСА (контрольные полосы). Таким образом, высота комплекса «МАТ+PrP27-30» составила в среднем 3,2 ± 0,4 нм. Перекрестного взаимодействия БСА с PrP^d не было выявлено, белковые пики на полосах БСА не были отмечены ни в одном случае. Количество белковых комплексов на полосах МАТ и их плотность увеличивались пропорционально кратности разведения анализируемого материала (при уменьшении кратности разведения число выявляемых пиков увеличивалось примерно на порядок).

Таблица — Показатели высоты иммунных комплексов «МАТ+PrP^d» в различных органах и тканях сирийского хомяка с экспериментальной инфекцией скрепи, выявляемых методом атомно-силовой микроскопии

Моноклональное антитело	Высота иммунных комплексов «МАТ+PrP^d» относительно полос-сравнения БСА, в нм				
	Головной мозг	Селезенка	Печень	Почки	МПК
3F4	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,2
6H4	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,1
6A5	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,1
7F7	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,2
2C8	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,2
9C12	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2
3F4+6A5	1,9 ± 0,4	1,8 ± 0,3	1,7 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,3
3F4+9C12	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,4	2,0 ± 0,2	1,8 ± 0,2
6H4+7F7	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,3
6H4+9C12	2,0 ± 0,4	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,2
3F4+6A5+2C8	2,4 ± 0,5	1,9 ± 0,2	2,1 ± 0,4	1,9 ± 0,4	2,1 ± 0,2
3F4+2C8+9C12	2,8 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,2 ± 0,2	2,4 ± 0,5	2,2 ± 0,4

Разница между средним показателем высоты белковых пиков с учетом средней ошибки в опытных полосах (МАТ + PrP^d) и контрольных (БСА) статистически значима, т.е. отмечено специфическое взаимодействие антиген — антитело.

Высокое пространственное разрешение и фазовый контраст были достигнуты в режиме прерывистого контакта, который позволил идентифицировать малые агрегаты, возможно индивидуальные молекулы (мономеры) прионного белка, которые имеют Y-образную форму. Следует отметить высокую однородность полученных образцов и отсутствие агрегатов PrP на поверхности. Можно допустить, что более крупные PrP-структуры удалялись с поверхности кремния при процедуре промывания образцов.

Установлено также, что PrP27-30 адсорбируется на полоски МАТ как из исходного гомогената, так и из растворов после их обработки ферментазой (протеиназой К). При этом комплексы удавалось наблюдать при разведениях образцов 10^{-2} 10^{-4} и 10^{-6}, что превышает чувствительность, например метода иммунного блоттинга, на несколько порядков.

Факт выявления только малых агрегатов PrP, специфически связывающихся с МАТ, свидетельствует о том, что подобное взаимодействие может эффективно осуществляться только когда PrP27-30 находится в состоянии, близком к мономерному, и его вторичная и третичная структуры обеспечивают расположение активных антиген-связывающих сайтов на поверхности глобулы, разрешающее специфическое связывание с антителом.

Таким образом, решение поставленной задачи — реализация фиксации на заданных участках твердой поверхности искомых прионных белков, активированных специфическими моноклональными антителами, — достигается тем, что аномальная протеазоустойчивая форма прионного белка (PrP27-30), полученная после протеолитической обработки анализируемой пробы протеиназой К, примененной в концентрации, деградирующей все клеточные белки, концентрируется на заданных участках поверхности кремния, активированных специфическими антиприонными моноклональными антителами, с последующей визуализацией результатов анализа методом атомно-силовой микроскопии, что позволяет доказать наличие патогенного прионного белка в пробе.

Высокую концентрацию PrP27-30 из образцов с низким содержанием прионного белка при адсорбции их на участке поверхности «иммуночипа» порядка 100 мкм (что более чем достаточно для дальнейших исследований с помощью АСМ) обеспечивает специфичность взаимодействия антиген — антитело. При этом немодифицированные участки служат поверхностью сравнения для оценки размеров анализируемых биообъектов.

В описанном формате метод микроконтактной печати обеспечивает формирование однородных полос белка БСА на поверхности гидрофильного кремния. БСА блокирует неспецифическую адсорбцию на модифицированной поверхности и обеспечивает эффективную иммобилизацию антиприонных моноклональных антител в промежутки между полосами БСА.

Выводы:

1. Локально-активированная специфическими антителами кремневая подложка («иммуночип») позволяет производить управляемую фиксацию патологического амилоидного белка из исследуемой пробы на микронных участках поверхности. Благодаря использованию введенных критериев оценки можно в течение 6 8 часов точно обнаружить патологический прионный белок (PrP^d) или его часть (PrP27-30) при ТГЭ человека (прионные инфекции). Наблюдаемый эффект является новым и нигде еще не описанным.

2. Способ управляемой фиксации конформационно-измененных белков на локально активированной поверхности нетрудоемок, легко воспроизводим и может найти широкое применение в лабораторной диагностике заболеваний прионной этиологии как посмертной, так и, возможно, прижизненной.

3. Данный подход может быть использован в научно-исследовательских учреждениях, занимающихся изучением этиологии и патогенеза других форм медленно прогрессирующих и вяло текущих инфекций ЦНС человека, сопровождающихся накоплением амилоида и дегенеративным поражением мозга (в настоящее время их известно более 30 нозоформ) для проведения дифференциальной диагностики и установления истинной причины заболевания, а также окажется полезным при проведении поиска эффективных химиопрепаратов при данных состояниях.

Литература

1. Международная классификация болезней десятого пересмотра МКБ-10 (принята 43-ей Всемирной Ассамблеей Здравоохранения), 2007. — [Электронный ресурс]. — 2011. — Режим доступа: http://www.mkb10.ru. — Дата доступа: 15.06.2011.

2. Ultrasensitive detection of pathological prion aggregate by dual-color scanning for intensely fluorescent targets / J. Bieschke [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97. — P. 5468–5473.

3. Copper (II)-induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular PrP / K. Qin [et al.] // J. Biol. Chem. — 2000. — Vol. 275. — P. 19121–19126.

4. Preclinical detection of PrP-Sc in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep / K.I. O'Rourke [et al.] // Vet. Rec. — 1998. — Vol. 142. — P. 489–491.

5. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue / K.I. O'Rourke [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2000. — Vol. 38. — P. 3254–3259.

6. Molecular recognition imaging and force spectroscopy of single biomolecules / F. Kienberger [et al.] // Acc. Chem. Res. — 2006. — Vol. 39. — P. 29–36.

7. Капитулец, С.П. Экспериментальная инфекция скрепи у сирийских хомячков, инфицированных в гипоталамус: клиника, патогенез, репродукция PrP^{Sc} в ЦНС и селезенке / С.П. Капитулец, Н.Н. Полещук, П.А. Красочко // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. — 2006. — № 2. — С. 18–26.

Поступила 18.08.2011

CONTROLLED FIXING OF THE MISFOLDED PROTEINS ON LOCALLY ACTIVATED SURFACE OF SILICON AT NEURODEGENERATIVE DISEASES

Kapitulets S.P.[1], Zavnerko G.K.[2], Paribok T.V.[2], Kapitulets N.N.[1], Poleschuk N.B.[1], Agabekov V.E.[2]

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Institute of New Materials Chemistry of NAS of Belarus, Minsk, Belarus

The new method of controlled fixing misfolded amyloidogenic proteins on the locally-activated silicon surface at neurodegenerative diseases was developed. The results of its practical use were presented. It was shown that application of atomic force microscopy allowed to reveal infective abnormal protease resistant prion proteins in brain, spleen, kidney, liver and blood from Syrian golden hamsters with experimental scrapie.

Keywords: neurodegenerative diseases, abnormal protease resistant prion protein, atomic force microscopy, locally activated silicon surface.

РАЗРАБОТКА И ПОЛУЧЕНИЕ АДЕНОВИРУСНОГО АНТИГЕНА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Штыров А.А., Орлова С.В., Асташонок А.Н., Бореко Е.И.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Целью работы являлась разработка технологии изготовления аденовирусного антигена для серологических реакций. Были исследованы и оптимизированы условия культивирования аденовируса. Также изучены кинетические характеристики и морфологические изменения вируса после инактивации УФ-излучением и теотропином А24. Полученный инактивированный аденовирусный антиген в реакции ИФА работал на уровне положительного контроля тест-системы производства «RDG» (Германия).

Ключевые слова: аденовирус, культура клеток, константа инактивации, электронное микроскопирование, иммуноферментный анализ.

Введение. Системный анализ острых респираторных заболеваний показывает наличие совокупности объективных предпосылок и причин, обусловливающих необходимость дальнейшего их лабораторного исследования с целью повышения достоверности диагностирования заболеваний. До настоящего времени острые респираторные заболевания (ОРЗ) остаются одной из актуальных проблем здравоохранения и педиатрии в частности, поскольку имеют наибольший удельный вес в структуре детской инфекционной заболеваемости, составляя до 90% всей инфекционной патологии у детей. Возбудителями ОРЗ чаще являются вирусы, на их долю приходится 95% всех случаев острых поражений дыхательных путей у детей. Полиэтиологичность заболеваний, нередкое участие в процессе нескольких возбудителей, нестойкость и строгая типоспецифичность иммунитета являются причиной частых повторных заболеваний. Общепризнано, что наиболее значимыми возбудителями ОРВИ у детей являются вирусы гриппа, адено-, респираторно-синцитиальный, парагриппозный, коронавирусы и др. Согласно данным Национального центра по гриппу, доля

аденовируса в этиологической структуре ОРВИ достигала выше 30% в 2007–2008 гг. и превышала долю всех остальных вирусов [1, 2].

На начальной стадии заболевания сходство клинических проявлений, отсутствие патогномоничных симптомов не позволяют проводить раннюю этиологическую диагностику ОРВИ без лабораторных исследований. Это может приводить к различного рода ошибкам в диагностике и определении перспективы лечения заболеваний. Используемые в вирусологических лабораториях РБ методы диагностики аденовирусной инфекции в материале от больных (экспресс-метод (МФА), молекулярный метод (ПЦР) или по совокупности клинико-эпидемиологических данных) не всегда обеспечивают достоверность этиологической роли выделенного вируса. Поэтому необходимо дополнительное проведение подтверждающих серологических тестов (РСК, РН и ИФА), направленных на выявление антител разных типов. В этой связи получение антигена для серодиагностики аденовируса приобретает в последние годы все большую практическую значимость [3, 4].

Целью работы являлось получение аденовирусного антигена для серологических реакций. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

– выбор штамма аденовируса для культивирования;

– выбор оптимальных систем культивирования вируса;

– отработка методики инактивации вируса и проверки отсутствия инфекционности;

– проверка специфичности полученного антигена в серологических реакциях.

Материалы и методы исследования. *Культура клеток.* В работе использовались перевиваемые культуры клеток, которые были получены из коллекции клеточных культур ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии». Для роста клеток использовалась среда Игла, модифицированная Дульбеко (DMEM), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 мМ глутамина, 50 мкг/мл гентамицина. При длительном культивировании клеток проводилась еженедельная смена ростовой среды на среду поддержки, содержащую 2% сыворотки [4].

Заражение культуры клеток биологическим материалом. Перевиваемую культуру клеток, выращенную в пенфлаконах, инфицировали вирусом в необходимом разведении, затем вносили поддерживающую среду ДМЕМ. Через 72 часа инкубации в термостате при температуре 37 °С оценивали под микроскопом состояние клеточного монослоя [4].

Иммуноферментный анализ. Постановку ИФА осуществляли по методу, описанному Егоровым А.М. (1991) с нашими модификациями. Индекс активности (ИА) рассчитывали на основании соотношения значений оптической плотности (ОП) положительной/отрицательной проб [5].

Инактивация вируса. Инактивацию аденовируса осуществляли путем добавления в вирусную суспензию теотропина А24 в различных концентрациях при постоянном помешивании на магнитной мешалке инкубированием при температуре 37 °С в течение 24 часов. Кроме этого, проводили исследование на инактивирующую способность полихромного воздействия УФ-излучения в дозе $1{,}4 \cdot 10^6$ мВт/см^2.Через определенные промежутки времени отбирали пробы для определения уровня снижения титра и полноты инактивации вируса.

Полноту инактивации проверяли методом трехкратных «слепых» пассажей в культуре Нер-2С на питательной среде Игла, модифицированной Дульбеко (ДМЕМ). Отсутствие цитопатических изменений в культуре клеток в течение 5–7 суток подтверждает полноту инактивации вируса.

Электронная микроскопия. Исследование проводили на электронном микроскопе JEM-1011 (*Jeol, Япония*) при различных увеличениях: х6000–х100 000. Вирус осаждали ультрацентрифугированием на 50 % глицериновую подушку (0,1 М ФСБ pH = 7,1) в течение 2 часов при 30 000 g. Вирус предварительно прокрашивали уранилацетатом.

Статистическая обработка данных. Константу скорости инактивации вируса $К_{ин}$ определяли на основании данных по инактивации вируса в дебрисе клеток за разные промежутки времени инкубации, предполагая, что уменьшение концентрации вируса V(t) в момент времени t описывается экспоненциальной функцией $V(t) = V(0) \times e^{-Kt}$. Тогда в этом случае константа $К_{ин}$ вычисляется по формуле $К_{ин.} = -[\ln V(t_2) - \ln V(t_1)]/(t_2 - t_1)$. Кроме этого, снижение титра вируса после обработки выражали отношением $\lg \frac{V_t}{V_0}$, где V_0 — титр вируса до обработки; V_t — титр вируса после обработки в течение определенного времени [6].

Инфекционную активность полученных вирусов определяли путем титрования в чувствительных культурах клеток, выражая титр вируса в lg $ТЦД_{50/мл}$, по общепринятой методике Reed и Mench (1938).

Результаты и их обсуждение. Получение аденовирусного антигена занимает важное место в изготовлении инактивированного антигена для серологических реакций. В настоящее время известно 52 серотипа аденовирусов, которые патогенны для человека. Наибольшее значение в развитии заболеваний имеют серотипы 1–8, 12, 14, 21, причем все перечисленные серотипы кроме 8-го вызывают заболевания респираторного тракта. По данным Головиной Г.И., аденовирусы серотипов 3 и 7 часто этиологически связаны с развитием эпидемических вспышек ОРЗ, особенно среди детей младшего возраста. Они играют ведущую роль в генезе ОРЗ, пневмоний, конъюнктивитов, энтеритов, фарингокоъюнктивальной лихорадки и нередко в генезе осложнений — менингитов и энцефалитов [7].

Серологическая классификация аденовирусов основана на иммулогической специфичности антител против антигенных детерминант гексона, пептона и фибриллы. Причем за нейтрализацию вируса отвечает участок гексона. При этом у некоторых типов аденовирусов выявляются перекрестные взаимоотношения (в связи с их антигенной общностью). Так, у серотипов группы В и С наблюдаются перекрестные взаимодействия в серологических реакциях и слабые перекресты с низкими разведениями сывороток [3, 4].

На основании вышесказанного, в качестве производственного штамма аденовируса наш выбор был остановлен на 3 серотипе.

Успех получения антигена во многом обусловлен качеством исходного биологического сырья. Поэтому культивирование вируса является одним из основных этапов в технологии изготовления аденовирусного антигена.

Главной задачей данного этапа работы был подбор культуры клеток для оптимального культивирования и накопления максимального титра вируса.

При разработке оптимальной системы культивирования аденовируса проводили поиск высокоэффективной клеточной системы для получения антигена и вирусного сырья в разных культурах клеток. Для этого использовали аденовирус 3 серотипа и культивировали его на культурах клеток Нер-2С (эпидермальная карцинома гортани), HeLa (карцинома шейки матки), СПЭВ (почка эмбриона свиньи), Vero-E6 и BGM (почка зеленой мартышки), FL (амниотические клетки человека), L (фибробласты мыши), RD (рабдомиосаркома человека). При этом культуру клеток RD (клетки, не содержащие рецепторы к аденовирусу) использовали в качестве отрицательного контроля. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Результаты накопления вируса по развитию ЦПД при различной множественности инфицирования культур

Культура клеток	Титр вируса, lg $ТЦД_{50}$/мл		
	Множественность инфицирования, $ТЦД_{50}$/клетка		
	2	1	0,1
Нер-2С	1,2	1,74	2,45
HeLa	0,9	1,6	1,9
СПЭВ	0,97	1,54	1,7
Vero-E6	0,8	0,52	0
BGM	0,83	0,41	0
FL	0,74	0,36	0
L	0,57	0	0
RD	0	0	0

Как видно из таблицы 1, аденовирус культивировался на использованных культурах клеток с низким инфекционным титром, который не превышал 2,5 lg $ТЦД_{50}$/мл. При этом наиболее чувствительными оказались культуры клеток Нер-2С и HeLa, где максимальный титр достигал 2,45 lg $ТЦД_{50}$/мл и 1,9 lg $ТЦД_{50}$/мл соответственно. Накопление вируссодержащего материала уменьшалось при высокой множественности инфицирования. Это связано с тем, что каждый вирион, попавший в клетку, пытается реализовать свою генетическую информацию. Поэтому это приводило к быстрому истощению энергетических запасов клетки и, как следствие, формирование дефектных частиц, не приводящих к развитию ЦПД.

Культура клеток СПЭВ оказалась тоже чувствительной к аденовирусу, но его титр был ниже по сравнению с культурами эпителиального происхождения. Кроме этого, инфицирование культур

клеток Vero-E6, BGM, FL и L тоже приводило к накоплению антигена, но при высокой множественности инфицирования и в более низких титрах. Из таблицы видно, что при десятикратном уменьшении множественности инфицирования выход вируса уменьшался, и цитопатической деструкции не наступало. Заметна закономерность, заключающаяся в том, что накопление аденовируса в основном происходит в эпителиоподобных культурах клеток, а в фибробластных стабильного накопления вируса не происходит. В контрольной культуре клеток RD, не имеющих специфических рецепторов, при заражении не наблюдалось цитопатического эффекта. Это свидетельствует о том, что проникновение осуществляется с помощью виропексиса и отсутствует неспецифическое проникновение посредством фагоцитоза.

В связи с полученным результатом для накопления максимального «урожая» аденовируса 3 серотипа была выбрана культура клеток Hep-2C с инфицированием 0,1 lg $ТЦД_{50}$/клетка.

После получения оптимальной схемы накопления вируса была проведена работа по выбору эффективного инактивирующего метода, оптимальных параметров инактивации, обеспечивающих полное подавление инфекционности вируса при максимальном сохранении антигенных свойств.

В опытах изучали инактивирующее действие теотропина А24 и УФ-излучения на аденовирус. В экспериментах по инактивации аденовируса использовали вируссодержащую культуральную суспензию аденовируса 3 серотипа с ифекционным титром 2,45 ± 0,29 lg $ТЦД_{50}$/мл. Изучали воздействие теотропина А24 в конечных концентрациях 0,2; 0,5 и 1%. Кроме этого, проводили исследование на инактивирующую способность полихромного воздействия УФ-излучения в дозе $1{,}4 \cdot 10^6$ мВт/см^2.

Полноту инактивации вируса определяли путем 3-кратных последовательных пассажей на культуре Hep-2C. Данные по инактивации аденовируса представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Данные кинетики инактивации аденовируса

Метод инактивации			Значение V_t/V_0, lg					Константа инактивации, $ч^{-1}$
			Время экспозиции инактиватора, ч					
			0,5	1	6	12	24	
УФ-излучение			0,55	0,29	0	0	0	1,2 ± 0,018
Теотропин А24	Концентрация, %	0,2	0,76	0,67	0,56	0,33	0,07	0,47 ± 0,22
		0,5	0,63	0,55	0,49	0,16	0	0,46 ± 0,15
		1	0,46	0,32	0,26	0	0	0,34 ± 0,075

Данные, приведенные в таблице 2 показывают, что теотропин в зависимости от концентрации в вируссодержащей суспензии обладал различной степенью инактивирующего действия на вирус. Так, в концентрации 0,5% он инактивировал вирус через 24 часа, в то время как при содержании 1% препарата потеря инфекционной активности наступала уже через 12 часов. При концентрации 0,2% теотропина А24 инактивация вируса наступала практически полностью. При действии УФ-излучения на вируссодержащий материал инактивация наступала после часа инкубации.

Значения снижения вирусной активности в первые часы инкубации в дебрисе клеток оказались равными, что подтверждает возможность использования экспоненциальной зависимости для описания инактивации вируса в среде культивирования. Среднее значение константы инактивации $К_{ин.}$ равнялось 1,2 ± 0,078 $ч^{-1}$ для УФ-излучения и от 0,34 ± 0,075 до 0,47 ± 0,22 $ч^{-1}$ для теотропина А24 в зависимости от концентрации.

Необходимо отметить, что величина эмпирического коэффициента является справедливой только для приведенных разведений теотропина А24 и дозы УФ-излучения. С изменением концентрации аденовируса в суспензии, равно как и инактиванта, изменятся как продолжительность, так и константа скорости инактивации. Кроме этого, отметим также, что значение снижения активности вируса ($\lg \frac{V_t}{V_0}$) и константы его скорости инактивации ($К_{ин.}$) пропорционально уменьшалось в зависимости от концентрации теотропина А24 и времени экспозиции.

Хотя скорость инактивации вируса под действием УФ-излучения было больше почти в 3 раза по сравнению с теотропином А24, это не означает что антигенные свойства для серологической реакции остались сохранены. Быстрая скорость инактивации может приводить к изменению поверхностных структур.

Чтобы убедится в оптимальном режиме инактивации, изучали морфологию интактных и инактивированных аденовирусов посредством электронной микроскопии. Вирионы предварительно осаждали ультрацентрифугированием. Сравнительный анализ электрофореграмм нативного и инактивированного аденовируса, обработанных уранилацетатом, позволил выявить небольшие различия в поверхностных структурах вириона. Результаты сравнительного электронно-микроскопического анализа морфологических свойств аденовируса до и после инактивации УФ-излучением и теотропином А24 представлены на рисунке.

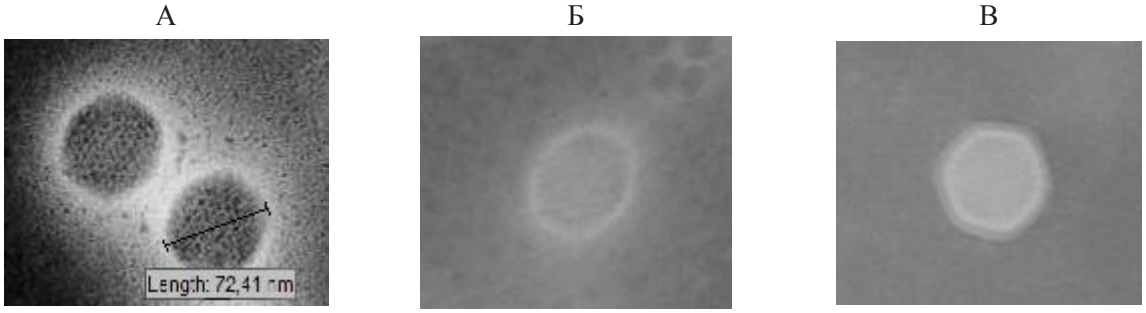


Рисунок —Электронограмма интактного аденовируса 3 серотипа (А) и вируса после инактивации УФ-излучением (Б) и теотропином А24 (В)

Установлено, что морфологические свойства аденовируса в контрольных препаратах соответствуют норме, о чем свидетельствует икосаэдрическая форма и размер вириона (диаметр вириона равен 72 нм), а также наличие четко выделяющихся структурных гексоновых и пентоновых белков на поверхности. К сожалению, при выбранном констрастировании уранилацетатом фибриллы аденовируса не видны. Вирионы не имели деструктивных изменений, и большая часть популяции (около 97% вирионов) находилась в физиологически активном состоянии.

На электроннограмме вириона после обработки УФ-излучением не видны какие-либо существенные изменения поверхности нуклеокапсида. Четко видны мажорные поверхностные белки. Форма вириона осталась без изменения. Прямого воздействия УФ на белковую структуру, которая способствует реализации инфекционных свойств, не выявлено. Потеря инфекционности заключается в прямом воздействии на генетический материал вируса, при котором происходит димеризация в ДНК соседних пиримидиновых оснований с образованием «циклобутановых продуктов». В результате димеризации нарушаются нормальные водородные связи между цепями и, следовательно, разрушается структура двойной спирали в этом участке ДНК. Как следствие, это приводит к ошибкам при репликации. Около 40% популяции вирионов после обработки имели деструктивные изменения в виде разрушения нуклеокапсида. Можно предположить, что по закону сохранения энергии, часть световой энергии переходило в тепловую, поэтому проба дополнительно нагревалась, что приводило к поверхностным дефектам в виде деградации белка.

После обработки аденовируса теотропином А24 на электроннограмме видно, что целостность вириона не была повреждена. Поверхностные структурные белки менее заметны и вирион более гладкий. Из литературы известно, что теотропин «нарезает» вирусные поверхностные белки. Таким образом, можно предположить, что потеря инфекционности происходит за счет отрезания фибрилл аденовируса, который ответственен за прикрепление к рецептору. Около 90% популяции вирионов после обработки имели деструктивные изменения.

Таким образом, теотропин был выбран в качестве основного инактивирующего вещества для получения инактивированного антигена как наиболее оптимальный метод.

Важным показателем инактивированного аденовируса является его антигенная активность в серологических реакциях. Специфическую антигенную активность полученных инактивированных аденовирусов оценивали по их взаимодействию с положительными и отрицательными контрольными

сыворотками в непрямом варианте ИФА. В качестве положительного контроля использовали иммуноасцитическую жидкость (ИАЖ) от экспериментально зараженных мышей, поливалентную сыворотку к аденовирусу (НИИ гриппа РАМН, Санкт-Петербург) и моноклональные антитела к аденовирусу тест-системы фирмы «RDG» (Германия). В качестве отрицательного контроля использовали ИАЖ от здоровых, не иммунизированных мышей. Для сравнения активности прохождения реакции использовали коммерческий аденовирусный антиген тест-системы фирмы «RDG» (Германия). Результаты проверки антигенной активности инактивированных аденовирусов отражены в таблице 3.

Таблица 3 — Оценка специфической активности аденовирусного антигена в ИФА

Вид антигена/ тип антител	ИАЖ к аденовирусу	Сыворотка к аденовирусу (НИИ гриппа РАМ)	Антитела к аденовирусу (DRG)	Нормальный ИАЖ
Интактный аденовирус	+	+	+	–
Инактивированный аденовирус	+	+	+	–
Коммерческий антиген (RDG)	+	+	+	–
Гетерологичный антиген	–	–	–	–

Примечания:
1. + — положительная реакция
2. – — отсутствие реакции

Исследование специфической активности разработанного инактивированного аденовирусного антигена с коммерческими антителами (DRG, Германия) и антителами из сыворотки (НИИ гриппа РАМН, Санкт-Петербург) показало, что антиген связывается с коммерческими антителами на уровне положительного контроля тест-системы DRG. Полученный ИАЖ реагирует с разработанным антигеном и интактным аденовирусом на уровне контроля с коммерческим антигеном. При этом инактивированный аденовирус не реагировал с геторологичными антителами (нормальный ИАЖ). С этими же антителами не проходила реакция и с интактным вирусом и коммерческим антигеном. Гетерологичный антиген в реакции ИФА не связывался со специфическими антителами к аденовирусу.

Так же хотелось бы отметить, что в коммерческой тест-системе фирмы DRG (Германия) для определения антигена в фекалиях используются моноклональные антитела для определения аденовируса 40 и 41 серотипов. Эти диагностируемые серотипы вызывают только гастроэнтериты и не вызывают смежных перекрестов с респираторными заболеваниями. При использовании коммерческих моноклональных антител регистрировалось связывание с инактивированным аденовирусом во всех трех разведениях на уровне контроля. Это свидетельствует о том, что аденовирусный антиген обладает единым вируснейтрализующим детерминантом на поверхности вириона. Эти данные согласуются с литературными сведениями, приведенными выше.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что полученный инактивированный антиген специфичен, может быть использован для проведения серологических реакций.

Заключение. В ходе проведенной работы был разработан аденовирусный антиген для серологических реакций. Для накопления максимального «урожая» аденовируса была выбрана культура клеток Нер-2С с инфицированием 0,1 lg $ТЦД_{50}$/клетка. В качестве щадящего инактивирующего агента использовали теотропин А24 в конечной концентрации 1% на 6 часов. Электронограмма инактивированного аденовируса не показала каких-либо дефектных изменений в нуклеокапсиде. В реакции ИФА полученный аденовирусный антиген работал на уровне контроля.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГНТП (проект № ГНТП 02.18).

Литература

1. Баранов, А.А. Педиатрия. Клинические рекомендации / А.А. Баранов. — М., 2005.
2. Определение генетических маркеров резистентности к противогриппозным препаратам эпидемических штаммов вируса гриппа А (H1N1) / Н.П. Шмелёва [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск, 2008. — Вып. 1. — С. 58–60.
3. Жданова, В.М. Общая и частная вирусология / В.М. Жданова, С.Я. Гайдамович. — М., 1982.
4. Дрейзина, Р.С. Аденовирусные инфекции / Р.С. Дрейзина, В.М. Жданова. — М., 1962.

5. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.]. — М., 1991.
6. Мейнелл, Д. Экспериментальная микробиология / Д. Мейнелл, Э. Мейнелл. — М., 1967.
7. Головина, Г.И. Геномный полиморфизм и эволюционная изменчивость природных популяций аденовирусов серотипов 3 и 7 в процессе их эпидемической циркуляции в СССР: дис. … канд. биол. наук: 03.00.06 / Г.И. Головина. — Л., 1991. — 218 с.

Поступила 10.08.2011

DEVELOPMENT AND PRODUCTION OF ADENOVIRUS ANTIGEN FOR SEROLOGICAL TESTS

Shtyrau A.A., Orlova S.V., Astashonok A.N., Boreko E.I.

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

The aim of research was to develop manufacturing technology adenoviral antigen for serological tests. Adenovirus cultivation were investigated and optimized. The kinetic characteristics and morphological changes of the virus after inactivation by UV radiation and teotropin A24 have been studied. The inactivated adenovirus antigen was working in the ELISA reaction at the level of positive control test of the production system «RDG» (Germany).

Keywords: adenovirus, biocytoculture, constant of inactivation, electronic microscopy, ELISA.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛЕПТОСПИРОЗА

Капитулец С.П.[1], Ничипорук О.И.[1], Капитулец Н.Н.[1], Петкевич А.С.[1], Фидаров Ф.М.[2], Клавсуть Г.А.[2], Кононович С.И.[3], Галенчик А.В.[3]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;
[2]Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья;
[3]Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь

Резюме. В работе проведена сравнительная оценка диагностической эффективности трех стандартных серологических тестов для изучения гуморального ответа к лептоспирозу у больных с лабораторно подтвержденным диагнозом, а именно: реакции микроагглютинации, непрямой реакции иммунофлюоресценции и иммуноферментного анализа. Изучены операционные характеристики тестов: чувствительность, специфичность, точность, процент ложноположительных и ложноотрицательных результатов, прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов. Показано, что чувствительность и специфичность серологических тестов напрямую зависят от сроков забора клинического материала у больного. При этом чем чувствительнее тест, тем выше прогностическая ценность его отрицательного результата, чем специфичнее — тем выше прогностическая ценность его положительного результата.

Ключевые слова: лептоспироз, серологические тесты, операционные характеристики.

Введение. Лептоспироз — инфекционное природно-очаговое зооантропонозное заболевание, протекающее у людей с явлениями острой лихорадки и различной степенью тяжести: от легкой формы с благоприятным исходом до скоротечной с высоким процентом летальности [1]. Инфекция имеет наиболее широкое распространение среди всех зоонозов и представляет важную социально-экономическую проблему для здравоохранения во всем мире [2]. В Европейском регионе, в том числе в странах СНГ, отмечаются как отдельные вспышки, так и спорадические случаи лептоспироза. В Российской Федерации за последние годы показатель заболеваемости варьирует от 0,45 до 1,7 на 100 тыс. населения. За период 2002–2006 гг. в России умерло 196 человек (смертность 3,4%). В Украине ежегодно лептоспирозом заболевает от 0,54 до 2,8 на 100 тыс. населения [3]. В Республике Беларусь ситуация по лептоспирозу спокойная: за последние 5 лет показатель заболеваемости не превышает 0,1–0,2 на 100 тыс. населения. Тем не менее существует опасность возникновения вспышек заболеваемости вследствие выявления на территории республики многочисленных природных очагов инфекции [4, 5].

Для лабораторной диагностики лептоспирозов применяют микроскопический, биологический, бактериологический и серологический методы. Материалом для исследования служит кровь, ликвор, моча, в случае смерти — внутренние органы и тканевые жидкости [6].

Темнопольная микроскопия цитратной крови, спинномозговой жидкости (СМЖ), мочи, взвеси органов позволяет диагностировать заболевание на ранних сроках, но имеет ориентировочное значение, так как отрицательный результат анализа не исключает лептоспирозной инфекции. Выделение лептоспир из крови и заражение лабораторных животных проводят в течение первой недели заболевания (в период бактеримии), из ликвора — на 2–3 неделе, мочи — с конца 2-й недели.

Рутинная серодиагностика лептоспироза осуществляется, главным образом, с помощью реакции микроагглютинации (РМА) («золотой стандарт») с живыми культурами лептоспир, непрямой реакцией иммунофлюоресценции (нРИФ) и иммуноферментным анализом (ИФА). Все они имеют свои преимущества и недостатки [6].

Целью работы явилось проведение сравнительной оценки диагностической ценности стандартных серологических тестов (РМА, нРИФ, ИФА) при изучении гуморального иммунитета у больных лептоспирозом с лабораторно подтвержденным диагнозом.

Материалы и методы исследования. В работе использовали 38 сывороток крови больных лептоспирозом с лабораторно и клинически подтвержденным диагнозом, полученные в течение 2005–2010 гг. из Республиканского и Минского областных центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья. Референс-тестом на лептоспироз служила РМА с 7 серогруппами живых культур диагностических штаммов лептоспир, диагностический титр не ниже 1:100 [6]. Положительные сыворотки были разбиты на 3 группы. Первую группу составили сыворотки, полученные в острую фазу инфекции на 1–7 день от начала болезни (n = 9). Во вторую группу вошли сыворотки, собранные от больных спустя 8–14 дней болезни (n = 11). Третья группа включала сыворотки больных, полученные спустя 15 дней и более от начала первых симптомов заболевания (n = 18). Парные сыворотки для исследования были получены от 10 больных с интервалом 8–15 дней. В качестве отрицательных использовали 40 сывороток здоровых доноров.

Сыворотки больных лептоспирозом анализировали с использованием «Набора реагентов для выявления патогенных лептоспир и антител к ним в реакции микроагглютинации на стекле «Лепт-АгАт», ТУ РБ 100558032.099-2005 изм «1» (рег. удостоверение № ИМ-7.6549/1105), «Тест-системы иммунофлюоресцентной для выявления суммарных антител к возбудителю лептоспироза в сыворотке крови человека «ЛептоФлюоСкрин», ТУ РБ 100558032.100-2005 изм «1» (рег. удостоверение № ИМ-7.6548) и «Тест-системы иммуноферментной для выявления антител класса G к возбудителю лептоспироза *Leptospira interrogans* в сыворотке и плазме крови человека «Лепто-ИФА-IgG», ТУ РБ 100558032.169-2010 (рег. удостоверение № ИМ-7.97183) производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь. Работу с диагностикумами проводили в соответствии с инструкцией по применению.

Статистическую обработку результатов исследований проводили путем расчета основных операционных характеристик тестов: чувствительность (sensitivity), Se = a/(a+c)x100; специфичность (specificity), Sp = d/(b+d)x100; точность (accuracy), Ac = a+d/(a+b+c+d)×100; процент ложноположительных результатов (false positive), FP = b/(b+d)×100; процент ложноотрицательных результатов (false negative), FN = c/(a+c)×100; положительную прогностическую ценность (positive predictive value), PPV = a/(a+b)×100) и отрицательную прогностическую ценность (negative predictive value), PNV = (d/(c+d)×100], где a — количество истинно положительных сывороток, b — количество ложноположительных сывороток, c — количество ложноотрицательных сывороток и d — количество истинно отрицательных сывороток.

Результаты исследования. Сравнение эффективности трех серологических тестов диагностики лептоспироза проводили с использованием отечественных диагностикумов Лепт-АгАт, ЛептоФлюоСкрин и Лепто-ИФА-IgG. Было установлено, что ИФА проявлял наивысшую чувствительность (Se = 92,7%), чувствительность нРИФ была несколько ниже (Se = 84,4%), более низкая чувствительность отмечена у РМА (Se = 76,0%). Аналогичная тенденция отмечена для точности тестов: $Ac_{ИФА}$ = 92,9%, $Ac_{нРИФ}$ = 84,4%, $Ac_{РМА}$ = 85,7%. Специфичность тестов (Sp), напротив, была выше у РМА и несколько ниже у нРИФ и ИФА и составила 97,6, 95,2 и 93,0% соответственно (таблица 1).

Таблица 1 — Оценка эффективности отечественных диагностикумов для лабораторной диагностики лептоспироза

Операционные характеристики	Лепт-АгАт		ЛептоФлюоСкрин		Лепто-ИФА-IgG	
	больные	доноры	больные	доноры	больные	доноры
Всего случаев	38	40	38	40	38	40
- положительных	26	1	31	2	35	3
- отрицательных	12	39	7	38	3	37
Чувствительность	76,0		84,4		92,7	
Специфичность	97,6		95,2		93,0	
Точность	85,7		89,7		92,9	
Ложноположительный результат	2,4		4,8		7,0	
Ложноотрицательный результат	24,0		15,6		7,3	
Положительная прогностическая ценность	97,4		95,0		92,7	
Отрицательная прогностическая ценность	76,9		85,1		93,0	

Все тесты были положительны у 28 из 38 сывороток (73,7%). ИФА давал наивысший процент ложноположительных результатов (FP = 7,0%), а РМА — наименьший (FP = 2,4%). Напротив, процент ложноотрицательных результатов (FN) у РМА был выше, чем у нРИФ и ИФА: 24,0, 15,6 и 7,3% соответственно.

Прогностические ценности положительного/отрицательного результатов, характеризующие вероятность наличия/отсутствия заболевания при положительном/отрицательном результатах теста, свидетельствуют о различной эффективности применяемых тестов при верификации диагноза у больного (таблица 1). Так, PPV превышал значимый уровень (90%) у всех тестов, тогда как значение NPV только в ИФА было значимым, а в $NPV_{РМА}$ и $NPV_{нРИФ}$ — недостаточным, чтобы исключить вероятность наличия инфекции у человека.

В связи с полученными результатами было интересным выяснить, почему РМА при наивысшей специфичности проявляла в нашем исследовании самую низкую чувствительность и точность? Для этого был проанализирован источник и сроки забора сывороток больных лептоспирозом. По срокам забора положительные на лептоспироз сыворотки были ранжированы нами на 3 группы. В первую вошли 9 сывороток, полученных в сроки до 1 недели после развития симптомов заболевания; во вторую — 11 сывороток, отобранных в период 1–2 недели болезни; в третью — 18 сывороток, полученных спустя 2 недели развития заболевания. Количество отрицательных на лептоспироз контрольных сывороток крови здоровых доноров для всех групп оставалось постоянным (n = 40). Операционные характеристики серологических тестов при диагностике лептоспироза в клиническом материале, отобранном в различные сроки от начала заболевания, представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Операционные характеристики серологических тестов при диагностике лептоспироза

Операционные характеристики	РМА			нРИФ			ИФА		
	< 1нед	1–2 нед	>2 нед	< 1нед	1–2 нед	>2 нед	< 1нед	1–2 нед	>2 нед
Всего случаев	9	11	18	9	11	18	9	11	18
- положительных	2	7	17	5	9	17	6	9	17
- отрицательных	7	4	1	4	2	1	3	2	1
Чувствительность	56,3	73,3	94,7	69,2	84,6	94,7	75,0	84,6	94,7
Специфичность	97,6	97,6	97,6	95,2	95,2	95,2	93,0	93,0	93,0
Точность	86,0	91,1	96,7	89,1	92,7	95,1	89,1	91,1	93,5
Ложноположительный результат	2,4	2,4	2,4	4,8	4,8	4,8	7,0	7,0	7,0
Ложноотрицательный результат	43,8	26,7	5,3	30,8	15,4	5,3	25,0	15,4	5,3
Положительная прогностическая ценность	90,0	91,7	94,7	81,8	84,6	90,0	75,0	78,6	85,7
Отрицательная прогностическая ценность	85,1	90,9	97,6	90,9	95,2	97,6	93,0	95,2	97,6

Из данных таблицы 2 видно, что чувствительность (Se) и точность (Ac) анализируемых тестов существенно повышается, если исследовать сыворотки, полученные через 2 недели от начала заболевания: для РМА — с 56,3 и 86,0% (1 неделя болезни) до 94,7 и 96,7% (спустя 2 недели болезни), для нРИФ — с 69,2 и 89,1% до 94,7 и 95,1%, для ИФА — с 75,0 и 89,1% до 94,7 и 93,5% соответственно.

Аналогично при тестировании повторных сывороток, полученных от больных спустя 8–14 дней после забора первых, отмечено увеличение количества положительных результатов и снижение ложноотрицательных результатов. При этом диагностическая чувствительность всех тестов была удовлетворительной и составила: для РМА — 93,3%, нРИФ — 96,6% и ИФА — 100%.

Показатели прогностической ценности положительного/отрицательного результатов тестов болезни варьируют в пределах ±15%, достигая максимальных значений на более поздних сроках инфекции. Вероятность наличия заболевания при положительном результате теста была наивысшей у РМА в течение всех сроков инфекции (PPV варьировала от 90,0 до 94,7%), достигала значимых показателей в 90% у нРИФ на 2-ю неделю после развития симптомов болезни (PPV = 90,0%) и была относительно высокой у ИФА (PPV ≤85,7%). Вероятность отсутствия заболевания (NPV) при отрицательном результате теста была высокой у всех анализируемых серологических тестов (таблица 2).

Диагностические препараты, разработанные на основе РМА и нРИФ, уже активно используются в практическом здравоохранении (Лепто-ИФА-IgG находится на этапе внедрения) для микробиологических (бактериологических) и серологических исследований больных с подозрением на лептоспироз, а также в рамках проведения эпидемиологического мониторинга за циркуляцией возбудителя среди мышевидных грызунов в природных и антропургических очагах инфекции (таблица 3).

Таблица 3 — Эпидемиологический мониторинг за лептоспирозом на территории Минской области за 2006–2010 гг. (по данным Минского облЦГЭиОЗ)

Категории обследуемых	Срок наблюдения				
	2006	2007	2008	2009	2010
Больные с диагнозами, не исключающими лептоспироз/из них положительных	31/0	26/1	45/0	24/0	28/0
Работники мясоперерабатывающих предприятий/из них положительных*	1135/92	1134/90	1305/82	1294/82	1292/52
Мышевидные грызуны/из них положительные	1139/27	1698/38	1478/30	1449/44	1427/48

Примечание — * — первичный скрининг сывороток работников мясоперерабатывающей промышленности проводили в соответствии с требованием постановления Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 08.08.2000 № 33 «О порядке проведения обязательных медицинских осмотров»

Из результатов таблицы 3 видно, что эффективность лабораторной диагностики с использованием разработанных диагностикумов определяется их медицинским назначением и выражается, в основном, в сероэпидемиологическом и эпизоотологическом обследовании населения и мелких мышевидных грызунов путем обнаружения в исследуемом материале преимущественно суммарных антител (IgM, IgG) к возбудителю лептоспироза. Применимость диагностических препаратов при остром лептоспирозе ограничена как патогенезом заболевания, так и возможностями самих серологических тестов, лежащих в их основе.

Обсуждение. Лептоспироз относится к числу глобальных природно-очаговых инфекций, для которых не характерна приуроченность к узко определенной природной зоне [1, 5, 6]. Для начала заболевания характерны внезапная лихорадка, острая головная боль, тошнота, рвота, анорексия и мышечные боли, т.е. неспецифические симптомы, характерные и при других лихорадочных состояниях [1, 6]. Это зачастую приводит к ошибкам в диагностике [1, 6, 7]. Отсутствие своевременного этиотропного лечения приводит к высоким рискам для жизни заболевших вследствие мультиорганных поражений многих систем и органов, включая нарушение функций почек, печени, массивное легочное кровоизлияние, сердечную аритмию и сердечную недостаточность [1, 6, 8].

Ведущую роль в лабораторной диагностике лептоспироза во всем мире играют серологические тесты: РМА, нРИФ, ИФА. Противолептоспирозные антитела в крови обнаруживаются через 5–7 дней заболевания, а иногда только через 10 дней. Неспецифические антитела класса М (IgM)

появляются раньше, чем антитела класса G (IgG) и часто остаются в низких титрах на протяжении многих месяцев и даже лет. Выработка специфических IgG-антител растянута во времени: иногда они могут быть вообще недетектируемыми или обнаруживаться в течение только относительно короткого периода, но обычно их концентрация в крови постепенно возрастает до максимума в соответствии с фазами болезни и затем снижается до низких титров, сохраняясь в течение нескольких лет [1, 6].

Проведенная оценка эффективности рутинных тестов диагностики лептоспироза свидетельствует о том, что диагностическая ценность каждого теста зависит от количественной репрезентативности выборки. При этом чувствительность и специфичность теста служат мерами вероятности того, что примененный тест является положительным у каждого с имеющейся патологией и отрицательным у всех здоровых людей. В свою очередь чувствительность и специфичность напрямую зависят от принятых в исследовании критериев оценки, основными из которых являются сроки забора и анализа клинического материала у больного. Чувствительность теста повышалась, если исследовали сыворотки, отобранные на более поздних сроках заболевания, когда иммунный ответ организма на проникновение возбудителя развивался достаточно эффективно, а концентрация специфических антител в крови достигала оптимального для детекции уровня. При этом любое отклонение гуморального ответа фиксируется, однако это же может приводить к росту ложноположительных результатов и снижать специфичность теста. И, наоборот, у высокоспецифичного теста с низким уровнем ложноположительных результатов возникает опасность упустить некоторые истинноположительные результаты.

Кроме чувствительности и специфичности одной из важных операционных характеристик диагностического теста является его прогностическая ценность, выражающая вероятность положительного/отрицательного результата в значениях от 0 до 1 или в процентах от 0 до 100. При этом положительная прогностическая ценность представляет собой отношение истиннопозитивных результатов к сумме истинно- и ложноположительных результатов, а отрицательная прогностическая ценность определяет отношение истинноотрицательных результатов к сумме истинно- и ложноотрицательных результатов.

Из вышеизложенного видно, что прогностическая ценность определяет меру значимости положительного/отрицательного результата для постановки диагноза. Более высокая прогностическая ценность дает большую уверенность в том, что положительный результат теста действительно означает наличие заболевания, а отрицательный — свидетельствует об его отсутствии. Эти параметры напрямую зависят от процента ложных результатов.

Анализ показывает, что чем чувствительнее тест, тем выше прогностическая ценность его отрицательного результата (т.е. возрастает вероятность того, что отрицательные результаты теста отвергают наличие заболевания). В свою очередь, чем специфичнее тест, тем выше прогностическая ценность его положительного результата (т.е. возрастает вероятность того, что положительные результаты теста подтверждают предполагаемый диагноз) (таблица 1). В нашем исследовании NPV для диагностики у больных спустя 2 недели после начала болезни была практически одинаковая для всех используемых тестов (процент ложноотрицательных результатов тестов стремиться к минимальному в прямой зависимости от увеличения сроков забора сывороток от начала болезни), хотя PPV уменьшалась в связи с повышением процента ложноположительных результатов тестов и, как следствие, снижения их специфичности (таблица 2).

Выводы:

1. Возможности отечественных диагностических препаратов (Лепт-АгАт, ЛептоФлюоСкрин, Лепто-ИФА-IgG) и их эффективность при диагностике лептоспироза напрямую определяются операционными характеристиками заложенных в них тестов (РМА, нРИФ и ИФА соответственно).

2. В настоящее время они используются в основном для сероэпидемиологического мониторинга за циркуляцией в республике возбудителя лептоспироза в природных и антропургических очагах инфекции среди мелких мышевидных грызунов — резервуаров инфекции, и больных с диагнозами, не исключающими лептоспироз, в том числе и лиц из группы риска по лептоспирозу. Применимость их при диагностике острого лептоспироза предстоит еще изучить.

3. Чрезвычайно актуальным направлением дальнейших исследований в республике является разработка новых диагностических тест-систем для экспресс-диагностики лептоспироза,

характеризующихся высокими диагностическими показателями при выявлении ранних IgM-антител. В качестве альтернативного подхода, лептоспирозные белки (антигены), идентифицированные тестом иммунного блоттинга при выявлении IgM- и IgG-антител, могут служить компонентами быстрого и точного диагностического теста на ранний лептоспироз.

Литература

1. Levett, P.N. Leptospirosis / P.N. Levett // Clin. Microbiol. Rev. — 2001. — Vol. 14. — P. 296–326.

2. Leptospirosis: an emerging public health problem // Weekly Epidemiol. Rec. — 2011. — Vol. 86, № 6. — P. 45–50.

3. ProMED-mail web site [Электронный ресурс] / International Society for Infectious Diseases. — 2011. — Режим доступа: http://www.promedmail.org. — Дата доступа: 01.06.2011.

4. О санитарно-эпидемической обстановке в Республике Беларусь в 2009 году: государственный доклад / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. — Минск, 2010. — 170 с.

5. Эпидемиолого-эпизоотологическая характеристика лептоспирозной инфекции в Беларуси / С.П. Капитулец [и др.] // Роль антропогенных и природных патогенов в формировании инфекционных и неинфекционных болезней человека. Медико-экологические аспекты: материалы междун. конф. — Минск, ИНПРЕДО. — 2002.– С. 109–119.

6. Инструкция о клинике, диагностике, лечении и профилактике лептоспироза: утв. приказом М-ва здравоохр. Респ. Беларусь 21.03.2006 № 200. — Минск, 2006. — 48 с.

7. Comparison of the clinical and serologic diagnosis of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and leptospirosis / A. Antoniadis [et al.] // Eur. J. Epidemiol. — 1995. — Vol. 8. — P. 228–232.

8. Daher, E.F. Leptospirosis-associated acute kidney injury / E.F. Daher, K.L.S. Abreu, G.B. Silva Júnior // J. Bras. Nefrol. — 2010. — Vol. 32, № 4. — P. 400–407.

Поступила 30.08.2011

COMPARATIVE ESTIMATION OF SEROLOGICAL METHODS FOR LABORATORY DIAGNOSTICS OF LEPTOSPIROSIS

Kapitulets S.P.[1], Nichiporuk O.I.[1], Kapitulets N.N.[1], Petkevich A.S.[1], Fidarov F.M.[2], Klavsut G.A.[2], Kononovich S.I.[3], Galenchik A.V.[3]

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Republican Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health;
[3] Minsk's Regional Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus

The paper is devoted to comparative estimation of diagnostic value of three standard serological tests for diagnose of leptospirosis: MAT, IF and ELISA. Operational characteristics of tests are studied: sensitivity (Se), specificity, accuracy, false positive, false negative, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV). It was shown that sensitivity and specificity of the tests directly depend on the timing of the collection of a clinical material from patient. Than test was more Se, that it was above NPV, than it was more specific – that above PPV.

Keywords: leptospirosis, serological tests, the operating characteristics.

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ И ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ НА ТУБЕРКУЛИН И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

Дыкман Л.А., Староверов С.А., Богатырев В.А.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Резюме. Несмотря на более чем вековую историю применения предложенных Пирке и Манту проб, эффективность диагностики туберкулеза продолжает оставаться достаточно низкой. Это связано с особенностями формирования иммунного ответа на инфицирование бактериями рода *Mycobacterium.* Целью данного исследования было получение поликлональных антител на туберкулин с использованием конъюгата туберкулина с золотыми наночастицами и мини-антител с использованием комбинаторной фаговой библиотеки. Были изучены возможные механизмы взаимодействия туберкулина с фагоцитирующими клетками иммунной системы. Полученные антитела предложено применять для различных вариантов детекции микобактерий.

Ключевые слова: микобактерии, туберкулин, золотые наночастицы, фаговый дисплей, диагностика.

Введение. При диагностике туберкулеза используют туберкулин, который представляет собой вытяжку из микобактерий, включающую в себя термостабильные белки и жирные кислоты. Препарат применяется в качестве кожных тестов (пробы Пирке и Манту) [1]. Многие вопросы, связанные с механизмами воздействия туберкулина на организм животного или человека, до сих пор остаются открытыми. Известно, например, что антитела на туберкулин при его внутрикожном введении почему-то не образуются. Выяснить причину этой закономерности представляется важной задачей.

Получение специфических антител на туберкулин связано с определенной сложностью, так как в его состав входит целый набор белков с молекулярной массой от 9 до 65 кДа. Известно, что входящий в состав туберкулина мажорный полипептид 9,7 кДа способен вызывать ингибирование миграции макрофагов и частичное угнетение бласттрансформации (у морских свинок), тем самым, тормозя выработку антител [2].

Получение антител к низкомолекулярным и слабо иммуногенным антигенам (гаптенам) является актуальной задачей современной иммунохимии. Традиционно такая задача решается с использованием химического присоединения гаптена к белковому носителю, применением адъювантов и напряженных схем иммунизации животных полученным конъюгатом. Однако при этом образуются антитела как против гаптена, так и против иммунодетерминантных участков носителя. Причем далеко не всегда этот иммунный ответ четко выражен. Последующая очистка и скрининг этих антител — процесс весьма трудоемкий и дорогой, а их титр и аффинность зачастую оказываются низкими.

Был описан способ получения антител к ряду гаптенов *in vivo* с использованием коллоидного золота в качестве носителя антигенов. В работе [3] было отмечено, что коллоидное золото и его конъюгаты обладают адъювантными свойствами. Однако многие вопросы взаимодействия золотых наночастиц с клетками иммунной системы остаются невыясненными.

Существуют ситуации, когда иммунизация животных по какой-либо причине невозможна или не удается обойти их толерантность к выбранному антигену. Для решения этой проблемы в настоящее время предложены методы молекулярного клонирования фрагментов генов антител. Одним из таких методов является технология фагового дисплея. К достоинствам этого метода можно отнести возможность отбора клонов-продуцентов мини-антител *in vitro*, минуя стадию иммунизации животных, возможность получения антител к аутоантигенам, токсинам и слабоиммуногенным соединениям, сокращение времени получения индивидуальных клонов до 10–14 дней по сравнению с несколькими месяцами в случае гибридомной технологии, относительную простоту получения мини-антител и их низкую себестоимость, возможность создания гибридных молекул антител с маркерными белками [4].

Целью данного исследования было получение поликлональных антител на туберкулин с использованием конъюгата туберкулина с золотыми наночастицами и мини-антител с использованием комбинаторной фаговой библиотеки. Были изучены возможные механизмы взаимодействия туберкулина с фагоцитирующими клетками иммунной системы. Полученные антитела предложено применять для различных вариантов детекции микобактерий.

Материалы и методы исследования. В качестве антигена применяли туберкулин PPD (Purified Protein Derivate). Туберкулин конъюгировали с коллоидным золотом со средним диаметром частиц 15 нм, полученным с использованием реакции восстановления золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия при 100 °С. Конъюгат туберкулина с коллоидным золотом получали простым смешением реактивов без использования сшивающих агентов [5].

Полученный конъюгат по 1 мл вводили 3 кроликам породы шиншилла внутримышечно четырехкратно с интервалом в 14 дней. Кровь у животных на проверку наличия антител брали спустя 10 дней после четвертой инъекции. Контрольной группе вводили туберкулин, не конъюгированный с коллоидным золотом, в аналогичной дозе (1,2 мкг). Титр полученных сывороток определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием меченных пероксидазой хрена антикроличьих антител. Чувствительность сывороток определяли методом дот-анализа [5]. Для этого проводили двойное титрование антигена в иммунологическом планшете. На PVDF-мембрану наносили пробы антигена объемом 1 мкл и высушивали. Мембрану блокировали в 2% сухом обезжиренном

молоке и инкубировали в полученных нами поликлональных сыворотках. Выявление реакции антигена с антителом проводили антикроличьими антителами, меченными коллоидным золотом или золотыми нанооболочками.

Мини-антитела на тубекулин были получены из овечьей комбинаторной фаговой библиотеки антител Griffin.1. Для этого было проведено 3 раунда селекции по методу, описанному в работе [6]. Полученные специфичные фаги были проверены методом дот-анализа. Основные принципы дот-анализа и его реализация с частицами коллоидного золота и золотыми нанооболочками детально описаны в работе [7].

Выделение перитонеальных макрофагов крыс проводилось по стандартной методике [8]. При постановке эксперимента макрофаги ресуспендировали в среде RPMI до концентрации 2×10^8 клеток на мл. Исследовали клетки, культивированные с конъюгатами туберкулина с коллоидным золотом; клетки, культивированные с туберкулином; нативные клетки (контроль). Измерение дыхательной активности клеток проводили с использованием МТТ-теста по общепринятому методу [9]. Пробы культивировали при 37 °С в течение 6 ч, после чего измеряли оптическую плотность восстановленного формазана через 4 и 6 ч после начала культивирования.

Конъюгирование туберкулина с флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) проводили по методу [8]. Полученные конъюгаты туберкулин + ФИТЦ с коллоидным золотом вносили к перитонеальным клеткам крыс и культивировали в течение 2 ч при 37 °С. После культивирования пробы центрифугировали при 2000 *g* 10 мин, надосадочную жидкость отбирали, клетки ресуспендировали в 2 мл свежей RPMI-среды и повторно центрифугировали при 2000 *g* 10 мин. После центрифугирования клетки ресуспендировали в 1 мл RPMI-среды и готовили влажные препараты для микроскопии.

Микроскопические исследования проводили на микроскопе Leica DM 2500 в режиме темного поля и флуоресценции. Для получения оптических срезов использовали конфокальный лазерный микроскоп Leica TCS SP5. Электронную микроскопию осуществляли на просвечивающем электронном микроскопе LIBRA 120.

Результаты и обсуждение. Возможность получения антител на антигены, являющиеся составными компонентами препарата туберкулин, имеет значение как с научной, так и с практической точки зрения. В частности, это связано с тем, что термостабильные белки, входящие в состав данного препарата, могут обладать биоактивными свойствами. Так как в большинстве случаев данные белки являются слабыми иммуногенами, в начальной стадии наших исследований мы поставили перед собой задачу определить способность самого туберкулина вызывать выработку антител при иммунизации с использованием наночастиц коллоидного золота как носителя антигена.

В результате иммунизации кроликов конъюгатами туберкулина с коллоидным золотом титр полученных сывороток у всех трех кроликов составил 1:1024. У контрольной группы животных, которым вводили неконъюгированный туберкулин, антител к нему в сыворотке крови не обнаружили. Предел обнаружения туберкулина с использованием полученной кроличьей сыворотки, определенный методом дот-анализа, составил 0,78 мкг.

Следующим этапом наших исследований было изучение механизмов взаимодействия полученных нами конъюгатов с фагоцитирующими клетками иммунной системы. Мы исследовали динамику изменения дыхательной активности перитонеальных клеток крыс, культивированных в присутствии туберкулина и конъюгата туберкулина с коллоидным золотом в МТТ-тесте (таблица). Было установлено, что туберкулин обладает токсичностью в отношении перитонеальных клеток и дыхательная активность у них через 4 ч снижается на 37%, а через 6 ч — на 40% по сравнению с дыханием клеток контрольной группы. При культивировании с конъюгатом туберкулина с коллоидным золотом дыхательная активность клеток через 4 ч снижается на 17%, после чего, однако, активность клеток начинает постепенно восстанавливаться и через 6 ч различие между пробой и контролем составляет всего лишь 8% ($P \leq 0,05$).

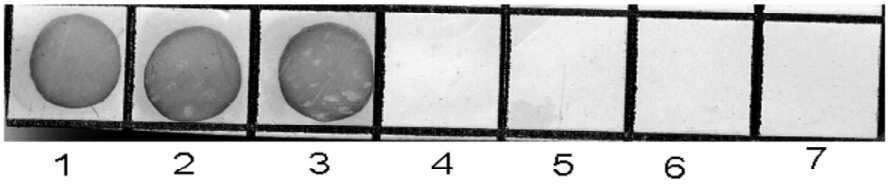
Таблица — Динамика изменения дыхательной активности перитонеальных клеток крыс, культивированных в присутствии туберкулина и конъюгатов с коллоидным золотом

Время реакции	Концентрация формазана, мкг/мл		
	Туберкулин	Контроль	Коллоидное золото + туберкулин
4 ч	7,57	12,01	9,93
6 ч	6,79	11,33	10,44

Оставался открытым вопрос о локализации конъюгата туберкулина с коллоидным золотом в фагоцитирующих клетках. Поэтому мы провели микроскопические исследования препаратов клеток, культивированных в присутствии туберкулина и его конъюгатов с золотыми наночастицами. При микроскопическом исследовании взаимодействия перитонеальных клеток с конъюгатом коллоидного золота с туберкулином, меченным ФИТЦ, мы обнаружили зеленое свечение, что указывает на вероятность проникновения антигена во внутриклеточное пространство. Для уточнения локализации конъюгата (проникает ли он внутрь макрофагов или локализуется на мембране) мы использовали конфокальную лазерную микроскопию. Оптические срезы продемонстрировали проникновение золотых наночастиц в цитоплазму макрофагов.

Следующим этапом работы стало получение антител на туберкулин из овечьей фаговой библиотеки (мини-антител) и сравнение их активности с полноценными поликлональными антителами. Было проведено три раунда селекции мини-антител. При постановке иммунодот-анализа с использованием мини-антител, меченных золотыми нанооболочками, было показано, что чувствительность метода составила 10^4–10^3 микробных клеток в 1 мкл, тогда как при использовании поликлональных сывороток мы детектировали 400–200 микробных клеток в 1 мкл.

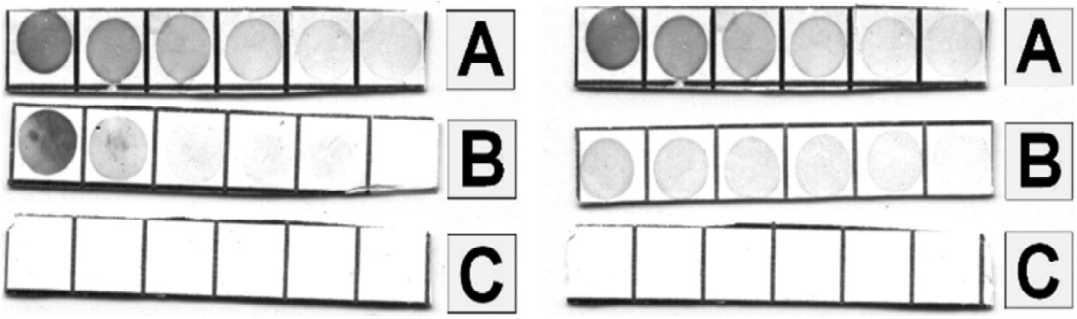
При оценке специфичности полученных нами антител мы установили (рисунок 1), что мини-антитела реагируют как с туберкулином, так и с клетками *Mycobacterium bovis*. С такими микроорганизмами, как *E. coli* XL-1 blue, *S. aureus* 209-R, *B. abortus* вакцинный шт. 82, полученные нами мини-антитела не реагировали. При тестировании поликлональных сывороток нами были получены аналогичные результаты.



Выявление фаговых частиц проводили с использованием конъюгатов антифаговых антител с золотыми нанооболочками: 1 — мини-антитела в концентрации 10^{13} частиц в мл; 2 — туберкулин в концентрации 1 мг/мл; 3 — *M. bovis* вакцинный шт. БЦЖ; 4 — *E. coli* XL-1 blue; 5 — *S. aureus* 209-R; 6 — *B. abortus* вакцинный шт. 82; 7 — бруцеллин в концентрации 1 мг/мл

Рисунок 1 — Оценка специфичности антител, полученных при помощи фаговой библиотеки

В дальнейших исследованиях специфичности полученных антител проводили анализ возможности появления перекрестной реакции между *M. bovis* и атипичными штаммами микобактерий, такими как *M. phlei* и *M. smegmatis*. Было установлено (рисунок 2, А), что полученные мини-антитела давали частичный перекрест в больших концентрациях (от $2{,}5 \cdot 10^8$ клеток в мл и выше) с *M. smegmatis*. Перекрест мини-антител с *M. phlei* в иммунодот-анализе нами обнаружен не был. При использовании поликлональных антител наблюдалась сходная реакция (рисунок 2, Б).



А Б

А — *M. bovis;* В — *M. smegmatis;* С — *M. phlei*

Рисунок 2 — Дот-анализ микобактерий (двойные разведения) с использованием мини-антител (А) и поликлональных антител (Б) на туберкулин

Следующим этапом работы стало применение полученных антител для микроскопических исследований клеток микобактерий. На рис. 3 приведены данные электронной микроскопии по выявлению антигенных детерминант на клеточной поверхности микобактерий при помощи фаговых антител и антител, полученных *in vivo* с использованием коллоидного золота. Из фотографий видно, что мини-антитела выявляют туберкулин на одном из субполярных концов клеточной поверхности микобактерий. При использовании поликлональных антител отмечено диффузное распределение антигена по всей клеточной поверхности микобактерий.

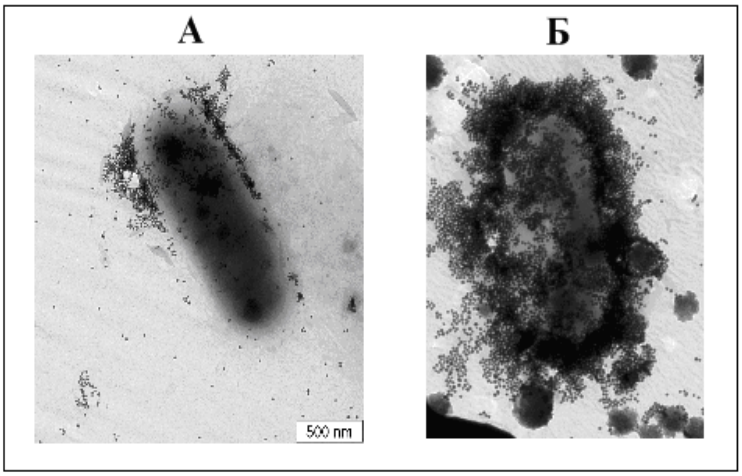


Рисунок 3 — Электронно-микроскопическое выявление туберкулинового антигена на клетках *M. bovis* шт. БЦЖ при помощи мини-антител (А) и поликлональных антител (Б)

После проведения электронной микроскопии мы оценили возможность применения полученных нами мини-антител для иммунохимического обнаружения микобактерий в препаратах методом световой микроскопии с использованием коллоидного золота в качестве контрастирующего агента. Можно отметить, что при использовании как фаговых, так и поликлональных антител клетки микобактерий в световой микроскопии обнаруживаются как полиморфные палочки, окрашенные в красный цвет. Данным методом можно, вероятно, обнаруживать микобактерии в различных объектах окружающей среды, что становится хорошим дополнением к имеющимся уже методам традиционной окраски.

Заключение. Исходя из приведенных выше результатов, можно отметить, что, по-видимому, коллоидное золото способствует повышению дыхательной активности клеток ретикулоэндотелиальной системы и тем самым увеличивает фагоцитирующую активность клеток. Золотые наночастицы за счет проникновения во внутриклеточное пространство частично снимают токсический эффект, оказываемый туберкулином на перитонеальные макрофаги крыс. Это способствует более активному развитию гуморальной реакции и выработке антител на туберкулин. Поэтому коллоидное золото можно рекомендовать к использованию в качестве носителя для получения антител на вещества, обладающие токсическим эффектом. Комплекс коллоидного золота с антигеном не только усиливает активность фагоцитирующих клеток, но и повышает титр антител к вводимому антигену, что может указывать на стимуляцию золотыми наночастицами клеток лимфоидного ряда. На основании полученных данных мы предложили варианты иммунологических тест-систем с использованием поликлональных и фаговых антител для детекции и изучения микроорганизмов методами твердофазного иммуноанализа, электронной и световой микроскопии.

Литература

1. Lalvani, A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy / A. Lalvani // Chest. — 2007. — Vol. 131. — P. 1898–1906.

2. Kuwabara, S. Amino acid sequence of tuberculin active protein from *Mycobacterium tuberculosis* / S. Kuwabara // J. Biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 2543–2568.

3. Адъювантные свойства наночастиц золота / Л.А. Дыкман [и др.] // Рос. нанотехнол. — 2010. — Т. 5. — С. 58–68.

4. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains / J. McCafferty [et al.] // Nature. — 1990. — Vol. 348. — P. 552–554.

5. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение / Л.А. Дыкман [и др.]. — М.: Наука, 2008. — 319 с.

6. Analysis of the diversity of a sheep antibody repertoire as revealed from a bacteriophage display library / K.A. Charlton [et al.] // J. Immunol. — 2000. — Vol. 164. — P. 6221–6229.

7. A solid-phase dot assay using silica/gold nanoshells / B.N. Khlebtsov [et al.] // Nanoscale Res. Lett. — 2007. — Vol. 2. — P. 6–11.

8. Фримель, Г. Иммунологические методы / Г. Фримель. — М.: Медицина, 1987. — 472 с.

9. Bernas, T. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC / T. Bernas, J.W. Dobrucki // Arch. Biochem. Biophys. — 2000. — Vol. 380. — P. 108–116.

Поступила 27.07.2011

PRODUCTION OF POLYCLONAL AND PHAGE ANTIBODIES TO TUBERCULIN AND THEIR USE FOR THE DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC TEST SYSTEMS

Dykman L.A., Staroverov S.A., Bogatyrev V.A.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, Russia

Despite the more than a century-old history of using the Pirquet and Mantoux tests for the rapid diagnosis of tuberculosis, the effectiveness of determination of Koch's bacillus infection remains relatively low. This fact is related to the peculiarities of the immune response of warm-blooded animals to *Mycobacterium* infection. In this work, the polyclonal antibodies to tuberculin with the use of tuberculin gold nanoparticles conjugate and mini-antibodies with the use of combinatorial phage library were produced. The interaction of tuberculin with the phagocytizing cells of the immune system was studied. Application of the obtained antibodies in developing a diagnostic test for *Mycobacterium* is offered.

Keywords: *Mycobacterium*, tuberculin, gold nanoparticles, phage display, diagnostics.

КОЭФФИЦИЕНТ СООТНОШЕНИЯ ЛИМФОЦИТЫ/СЕГМЕНТОЯДЕРНЫЕ НЕЙТРОФИЛЫ У ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Горбач Л.А.

РНПЦ «Мать и дитя», Минск, Беларусь

Резюме. В работе проведено изучение коэффициента соотношения лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы по данным общего анализа крови и параметров спирометрии у 175 пациентов с туберкулезом органов дыхания. Выявлено достоверное различие средних значений коэффициента в группах пациентов с разными видами нарушений функции внешнего дыхания. Уменьшение коэффициента сопровождалось снижением легочных объемов. Результаты исследования показали диагностическую значимость вычисления коэффициента лимфоцитарно-нейтрофильного соотношения для выявления нарушений функции внешнего дыхания и определения степени их выраженности у пациентов с легочным туберкулезом.

Ключевые слова: туберкулез, лимфоциты, сегментоядерные нейтрофилы, соотношение.

Введение. Реактивность организма тесно связана с возникновением, развитием, эффективностью лечения и исходом любого патологического состояния [1, 2]. Для количественной оценки состояния реактивности в последнее время все чаще используется условный интегральный гематологический показатель — коэффициент соотношения содержания лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов в общем анализе крови [3]. В одних работах исследователи рассчитывают этот показатель как соотношение количества лимфоцитов к количеству нейтрофилов [3, 4]. В других публикациях авторы определяют данный коэффициент противоположным методом, рассчитывая соотношение количества нейтрофилов к количеству лимфоцитов [5–9].

Солошенко Э.Н. в своей работе указывает на целесообразность использования индекса соотношения нейтрофилов и лимфоцитов для прогнозирования рецидивов дерматоза, а также для оценки

тяжести течения заболевания и эффективности проводимой терапии [3]. В исследовании K. Matsuo et al. показано, что увеличение соотношения лимфоциты/нейтрофилы может быть ассоциировано с усталостью, переутомлением или стрессом у атлетов, бегунов на 3000 метров [4].

Значение нейтрофильно-лимфоцитарного соотношения для прогноза возникновения фибрилляций предсердий после аорто-коронарного шунтирования описано в работе P.H. Gibson et al. [5]. В публикации S. Xu-hua et al.указывается, что нейтрофильно-лимфоцитарное соотношение является независимым показателем прогноза летальности пациентов с инфарктом миокарда [6]. Исследование H. Ubukata et al. доказывает значимость нейтрофильно-лимфоцитарного соотношения для прогноза выживаемости пациентов с раком желудка [7]. W. Chua et al. указывает на возможность прогнозирования результатов химиотерапии пациентов с колоректальным раком по уровню нейтрофильно-лимфоцитарного соотношения [8]. Mesut Yazıcı с группой исследователей описывает ценность нейтрофильно-лимфоцитарного соотношения для постановки диагноза аппендицита у детей [9]. Таким образом, по данным литературы, применение простого интегрального гематологического показателя — коэффициента соотношения лимфоцитов/нейтрофилов — позволяет, не прибегая к специальным методам исследования, не только оценить в динамике состояние здоровья пациента, контролировать тяжесть течения заболевания, эффективность проводимой терапии, но и прогнозировать исход патологического процесса, наступление рецидивов [3].

Целью данного исследования было изучение диагностической значимости коэффициента соотношения лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы по данным общего анализа крови у пациентов с туберкулезом органов дыхания.

Материал и методы исследования. Объектом исследования были пациенты с туберкулезом органов дыхания, находившиеся на стационарном лечении. Общее число обследуемых составило 175 человек. Всем пациентам было проведено стандартное клинико-лабораторное обследование, включающее рентгенологическое исследование, бактериологический анализ мокроты на микобактерии туберкулеза, общеклинические анализы крови и мочи, спирометрию. У каждого пациента определялся индекс массы тела по формуле: частное от деления массы тела в килограммах на рост в метрах, возведенное в квадрат. Значение массо-ростового индекса ниже 19 оценивалось как астенический тип телосложения, 19–26 — нормостенический, выше 26 — гиперстенический. Для каждого пациента по данным процентного содержания клеток в общем анализе крови рассчитывался коэффициент соотношения лимфоцитов к сегментоядерным нейтрофилам. Исследование функции внешнего дыхания проводилось по общепринятой методике с помощью многофункционального автоматизированного спирометра «МАС-1». Измерялся стандартный набор параметров функции внешнего дыхания: жизненная емкость легких (ЖЕЛ), дыхательный объем (ДО), минутный объем дыхания (МОД), резервный объем выдоха ($РО_{выд}$), резервный объем вдоха ($РО_{вд}$), частота дыхания (ЧД в минуту), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду ($ОФВ_1$), соотношение объема форсированного выдоха за первую секунду к форсированной жизненной емкости легких ($ОФВ_1$/ФЖЕЛ), соотношение объема форсированного выдоха за первую секунду к жизненной емкости легких (индекс Тиффно), пиковая объемная скорость форсированного выдоха ($ПОС_{выд}$), максимальные скорости на уровне выдоха 25, 50, 75% ФЖЕЛ ($МОС_{25}$, $МОС_{50}$, $МОС_{75}$), средняя объемная скорость на уровне выдоха 25–75% ФЖЕЛ ($СОС_{25–75}$). Оценка параметров спирометрии выполнялась по трем градациям — норма, обструктивные и рестриктивные нарушения функции внешнего дыхания (в соответствии с рекомендациями Британского торакального общества [10]). Обструктивные нарушения функции внешнего дыхания диагностировались при сниженном показателе $ОФВ_1$ (<80% от ожидаемой нормы), нормальном или сниженном показателе ФЖЕЛ, уменьшенном соотношении $ОФВ_1$/ФЖЕЛ (<70%). Рестриктивные нарушения отмечались при условии сниженного показателя $ОФВ_1$ (<80% от ожидаемой нормы), сниженного показателя ФЖЕЛ (<80% от ожидаемой нормы), нормального соотношения $ОФВ_1$/ФЖЕЛ (>70%). Функция внешнего дыхания оценивалась как норма в том случае, когда показатели $ОФВ_1$ и ФЖЕЛ были >80%, соотношение $ОФВ_1$/ФЖЕЛ — >70%. Обработка полученных данных проводилась с помощью методов описательной статистики, построения таблиц сопряженности и вычисления критерия χ^2, дисперсионного и корреляционного анализа.

Результаты исследования и обсуждение. В соответствии с результатами измерения функции внешнего дыхания пациенты была разделены на три группы. Первая группа включала 58 пациентов

с нормальной функцией внешнего дыхания, вторая — 60 пациентов с обструктивными нарушениями и третья — 57 пациентов с рестриктивными нарушениями.

В первой группе было 45 мужчин (77,6%) и 13 женщин (22,4%), во второй — 53 мужчины (88,3%) и 7 женщин (11,7%), в третьей — 42 мужчины (73,7%) и 15 женщин (26,3%). При построении таблиц сопряженности и вычислении критерия χ^2 достоверных различий по полу в анализируемых группах не выявлено $\chi^2 = 4,24$ $\nu = 2$, $p = 0,12$. Средний возраст пациентов первой группы составил 38,07 ± 12,92 года, второй группы — 43,85 ± 10,96 года, третьей — 40,42 ± 15,06 года. При сравнении возраста пациентов трех групп с помощью дисперсионного анализа достоверных различий не получено ($F = 2,93$; $p = 0,06$). Таким образом, анализируемые группы пациентов были идентичны по поло-возрастному составу.

Средний показатель индекса массы тела у пациентов первой группы составил 22,16 ± 0,42, второй группы — 20,93 ± 0,51, третьей группы — 21,62 ± 0,52. При проведении дисперсионного анализа показателей индекса массы тела не выявлено достоверных различий между группами ($F = 1,61$; $p = 0,20$). Следовательно, пациенты анализируемых групп не отличались между собой по типу телосложения. Преобладал нормостенический тип телосложения.

Методом дисперсионного анализа проведено сравнение коэффициентов соотношения лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы в трех группах. Результаты исследования показаны на рисунке 1.

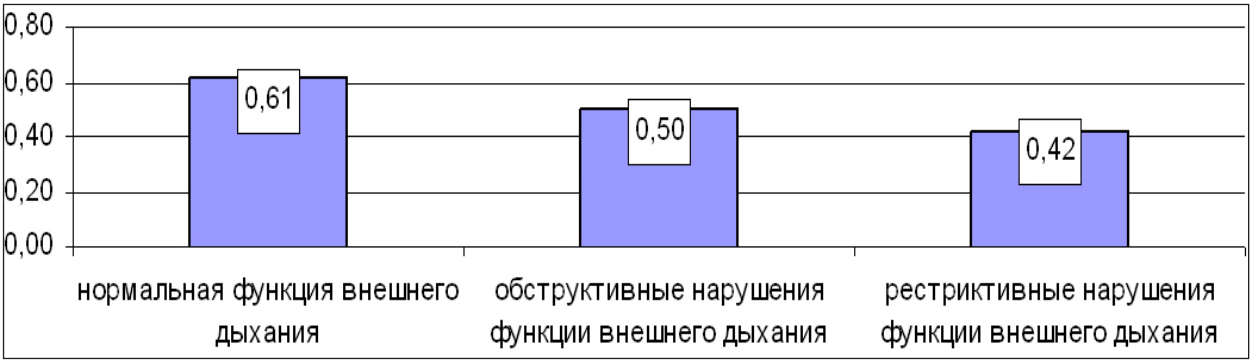


Рисунок 1 — Коэффициент соотношения лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы у пациентов с туберкулезом органов дыхания

Как показало наше исследование, самый высокий уровень среднего значения коэффициента соотношения лимфоциты/нейтрофилы отмечен в группе пациентов с нормальной функцией внешнего дыхания (0,61 ± 0,04). Несколько ниже этот показатель был у пациентов с обструктивными нарушениями — 0,50 ± 0,03. Самое низкое среднее значение коэффициента зарегистрировано в группе пациентов с рестриктивными нарушениями — 0,42 ± 0,03. Методом дисперсионного анализа установлено достоверное различие лимфоцито-нейтрофильных коэффициентов у пациентов трех анализируемых групп ($F = 8,41$; $p = 0,000$). Таким образом, уровень коэффициента соотношения лимфоциты/нейтрофилы был связан с видом нарушений функции внешнего дыхания. Это свидетельствовало об определенной диагностической значимости данного показателя при выявлении нарушений функции внешнего дыхания.

Методом корреляционного анализа проведено изучение связи лимфоцито-нейтрофильного коэффициента и параметров спирометрии у пациентов трех групп. Эти данные представлены на рисунке 2.

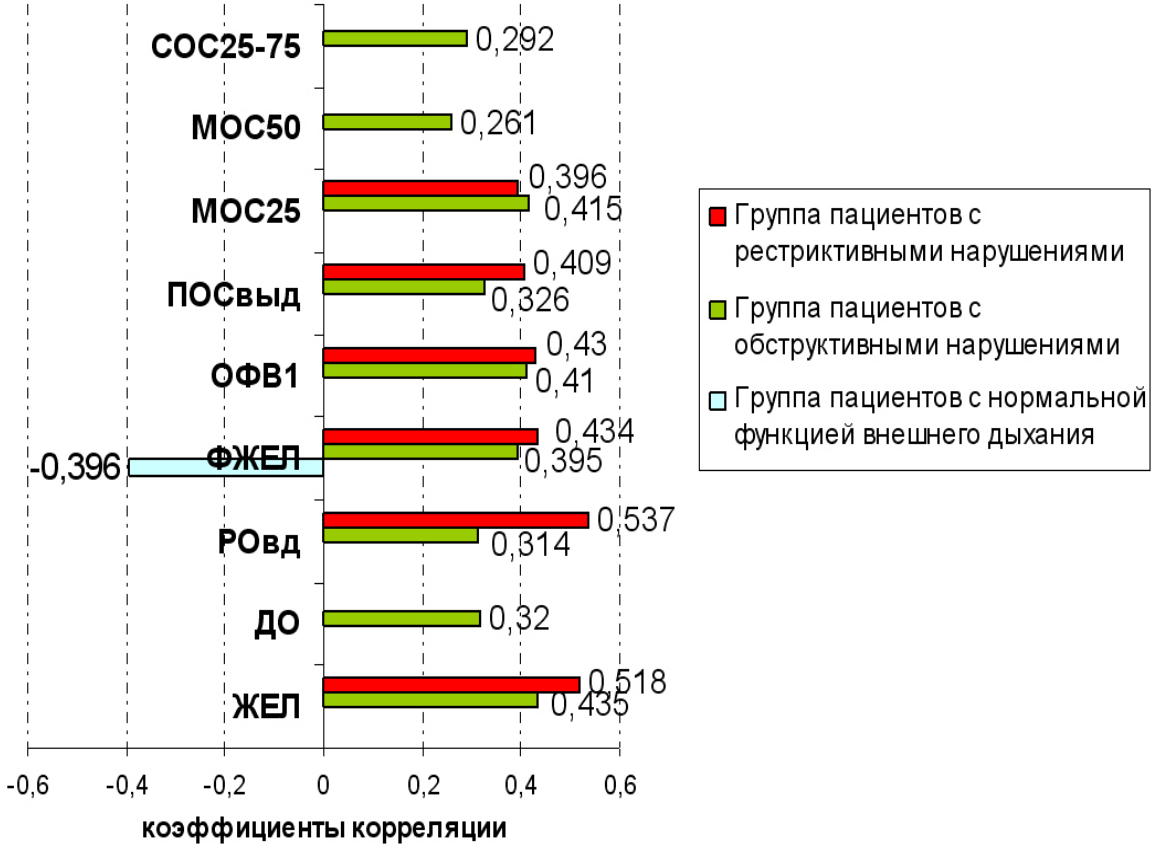


Рисунок 2 — Корреляция коэффициента соотношения лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы и параметров спирометрии у пациентов с туберкулезом органов дыхания

Как видно из рисунка 2, выявлено наличие корреляционных связей между коэффициентом соотношения лимфоциты/нейтрофилы и параметрами спирометрии. Наибольшее число корреляционных связей отмечено в группе пациентов с обструктивными нарушениями функции внешнего дыхания (9). У пациентов с нормальной функцией внешнего дыхания коэффициент соотношения коррелировал только с одним параметром спирометрии, у пациентов с рестриктивными нарушениями — с 6 параметрами.

Во всех группах наблюдения выявлена достоверная корреляционная связь лимфоцито-нейтрофильного коэффициента и параметра форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ). У пациентов с нормальной функцией внешнего дыхания данная корреляционная связь имела обратную направленность (коэффициент корреляции = –0,396; p = 0,002). У пациентов двух других групп корреляционная связь имела прямую направленность, то есть при уменьшении лимфоцито-нейтрофильного коэффициента отмечалось уменьшение параметра форсированной жизненной емкости легких. В группе пациентов с рестриктивными нарушениями коэффициент корреляции составил 0,434 (p = 0), в группе пациентов с обструктивными нарушениями — 0,395 (p = 0,002).

Помимо параметра ФЖЕЛ, в группе пациентов с рестриктивными нарушениями лимфоцито-нейтрофильный коэффициент коррелировал с ЖЕЛ (коэффициент корреляции = 0,518; p = 0), $РО_{вд}$ (коэффициент корреляции = 0,537; p = 0), $ОФВ_1$ (коэффициент корреляции = 0,430; p = 0), $ПОС_{выд}$ (коэффициент корреляции = 0,409; p = 0,001), $МОС_{25}$ (коэффициент корреляции = 0,396; p = 0,002). В группе пациентов с обструктивными нарушениями лимфоцито-нейтрофильный коэффициент коррелировал с ЖЕЛ (коэффициент корреляции = 0,435; p = 0), ДО (коэффициент корреляции = 0,320; p = 0,012), $РО_{вд}$ (коэффициент корреляции = 0,314; p = 0,015), $ОФВ_1$ (коэффициент корреляции = 0,410; p = 0,001) $ПОС_{выд}$ (коэффициент корреляции = 0,326; p = 0,011), $МОС_{25}$ (коэффициент корреляции = 0,415; p = 0), $МОС_{50}$ (коэффициент корреляции = 0,261; p = 0,044), $СОС_{25–75}$ (коэффициент корреляции = 0,292; p = 0,023). Таким образом, коэффициент соотношения лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы коррелировал с основными параметрами спирометрии.

Уменьшение коэффициента сопровождалось снижением легочных объемов и, следовательно, указывало на наличие нарушений функции внешнего дыхания. Степень уменьшения коэффициента соотношения лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы была связана со степенью выраженности обструктивных и рестриктивных нарушений.

Выводы. На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Расчет коэффициента соотношения лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы по данным общего анализа крови имеет диагностическую значимость для выявления нарушений функции внешнего дыхания и определения степени их выраженности у пациентов с легочным туберкулезом.

2. Выявлено достоверное различие средних значений коэффициента соотношения лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы в группах пациентов с разными видами нарушений функции внешнего дыхания. Максимальное среднее значение коэффициента отмечалось у пациентов с нормальной функцией внешнего дыхания, минимальное — у пациентов с рестриктивными нарушениями.

3. Установлено наличие корреляционных связей между коэффициентом соотношения лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы и параметрами спирометрии. Наибольшее число корреляционных связей отмечено в группе пациентов с обструктивными нарушениями, наименьшее — в группе пациентов с нормальной функцией внешнего дыхания.

4. Во всех группах пациентов выявлена достоверная корреляционная связь средней силы между лимфоцито-нейтрофильным коэффициентом и параметром форсированной жизненной емкости легких. У пациентов с нормальной функцией внешнего дыхания данная связь была обратная, у пациентов с дыхательными нарушениями корреляционная связь была прямая.

5. Уменьшение лимфоцитарно-нейтрофильного соотношения сопровождалось уменьшением легочных объемов.

6. Выявлена прямая корреляционная связь между коэффициентом соотношения лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы и степенью выраженности обструктивных и рестриктивных нарушений.

Литература

1. Антистрессорные реакции и активационная терапия / Л.Х. Гаркави [и др.]. — Екатеринбург: Филантроп, 2002. — Ч. 1. — 196 с.

2. Антистрессорные реакции и активационная терапия / Л.Х. Гаркави [и др.]. — Екатеринбург: Филантроп, 2003. — Ч. 2. — 336 с.

3. Солошенко, Э.Н. Прогноз рецидивов у больных аллергическими и распространенными дерматозами по интегральным гематологическим показателям / Э.Н. Солошенко // Междунар. мед. журн. — 2011. — № 2. — С. 69–71.

4. The association of the blood lymphocytes to neutrophils ratio with overtraining in endurance athletes / K. Matsuo [et al.] // New Studies in Athletics. — 2009. — Vol. 24, N 4. — P. 23–29.

5. Usefulness of neutrophil/lymphocyte ratio as predictor of new-onset atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting / P.H. Gibson [et al.] // Am. J. Cardiol. — 2010. — Vol. 105, N 2, — P. 186–191.

6. Association of neutrophil/lymphocyte ratio with long-term mortality after ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention / S. Xu-hua [et al.] // Chinese Med. J. — 2010. — Vol. 123, N 23. — P. 3438–3443.

7. Evaluations of interferon-γ/interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients / H. Ubukata [et al.] // J. Surg. Oncol. — 2010. — Vol. 102, N 7. — P. 742–747.

8. Neutrophil/lymphocyte ratio predicts chemotherapy outcomes in patients with advanced colorectal cancer / W. Chua [et al.] // Brit. J. Cancer. — 2011. — Vol. 104. — P. 1288–1295.

9. Neutrophil/lymphocyte ratio in the diagnosis of childhood appendicitis / M. Yazıcı [et al.] // Turk. J. Pediat. — 2010. — Vol. 52, N 4. — P. 400–403.

10. Bellamy, D. Spirometry in practice. A practical guide to using spirometry in primary care / D. Bellamy / 2nd ed.; Brit. Thoracic Society (BTS) COPD Consortium. — London, 2005. — 23 p.

Поступила 30.08.2011

RATIO OF LYMPHOCYTE/SEGMENTONUCLEAR NEUTROPHIL IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Gorbach L.A.

Republican Research & Practical Center «Mother and Child», Minsk, Belarus

The objective of this study was to research of ratio lymphocyte/segmentonuclear neutrophil (L/N) in 175 patients with pulmonary tuberculosis. The association of ratio L/N and parameters of spirometry is

revealed. Ratio L/N correlated with 9 parameters VC, TV, IRV, FVC, FEV_1, PEF, MEF_{50}, MEF_{75}, $FEF_{25–75,}$ in patients with obstruction. Ratio L/N correlated with 6 parameters: VC, IRV, FVC, FEV_1, PEF, MEF_{75} in patients with restrictive impairment. Decrease in ratio L/N correlated with reduction of respiratory volumes. Calculation of ratio L/N mattered for definition of respiratory disorders.

Keywords: tuberculosis, lymphocytes, segmentonuclear neutrophils, ratio.

ПНЕВМОКОККОВЫЕ НЕЙРОИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ: ПЕРСПЕКТИВЫ ЛЕЧЕНИЯ

Астапов А.А., Вареник В.М., Пенязь Т.В.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Резюме. Проведен анализ 51 истории болезни детей с пневмококковыми нейроинфекциями, находившихся на лечении в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница» г. Минска с 1990 по 2010 гг. На основании исследования выявлено, что в 21-м веке произошла селекция пневмококков, устойчивых к пенициллину и амикацину, что должно учитываться в клинических рекомендациях по терапии. По данным антибиотикограмм, для лечения пневмококковых нейроинфекций нужно использовать цефтриаксон или левомицетин сукцинат для парентерального введения.

Ключевые слова: пневмококк, менингит, менингоэнцефалит, чувствительность к антибиотикам.

Введение. Пневмококковая инфекция, согласно оценкам ВОЗ, продолжает оставаться «одной из основных причин смертности и заболеваемости людей во всем мире». Ежегодно от пневмококковой инфекции в мире умирает более миллиона человек [1].

Пневмококковый менингит характеризуется сверхострым началом, тяжелым инфекционным токсикозом с развитием отека головного мозга, гнойного васкулита, воспалительного процесса в оболочках и веществе мозга, что проявляется быстрым нарастанием общемозговой и очаговой неврологической симптоматики. Успех лечения гнойных бактериальных менингитов во многом зависит от своевременной диагностики заболевания и адекватного назначения антибактериальных препаратов, при этом этиологическая диагностика менингитов является определяющим фактором успешной антибактериальной терапии [2]. В настоящее время повсеместной проблемой является возрастающая устойчивость *Streptococcus pneumoniae* к антибиотикам [1]. Основными причинами постоянно возрастающей устойчивости пневмококков исследователи называют неоправданное применение мощных антибиотиков в амбулаторной практике, назначение препаратов без учета спектра антимикробной активности и биологических свойств возбудителя, ошибки в выборе дозировки и продолжительности курса лечения, использование антибиотиков широкого спектра действия для профилактики осложнений при вирусных инфекциях [3].

Источником инфекции являются больные и носители (от 25 до 50% детей дошкольного возраста и 20–25% взрослых лиц). Основной путь передачи — воздушно-капельный, но может быть и контактный. Входными воротами для пневмококка является слизистая оболочка носоглотки [4]. Пневмококки проникают в оболочки мозга в основном гематогенным путем [5]. Развитие пневмококкового менингита мало чем отличается от развития первичных менингитов. Пневмококковый менингит может возникать и как следствие пневмонии, отита, синуситов, бактериального эндокардита и других воспалительных процессов, вызванных пневмококком. В отличие от менингококкового менингита и других гнойных менингитов для пневмококковой инфекции характерно значительное разнообразие путей проникновения возбудителя в мозговые оболочки [6].

В зависимости от механизма развития вторичных пневмококковых гнойных менингитов их можно разделить на три группы: а) контактные, б) метастатические, в) посттравматические. Вторичные пневмококковые менингиты часто возникают повторно. Если причину развития пневмококкового менингита не находят, то тогда говорят о первичном пневмококковом менингите.

Пневмококковый менингит по распространенности стоит на втором месте после менингококкового, и частота его составляет 12–33% от таковой всех гнойных менингитов [6].

Наблюдаются следующие клинические формы пневмококкового поражения оболочек и вещества головного мозга: гнойный менингит с острым и затяжным течением, менингоэнцефалит, пнев-

мококцемия и менингит с лимфоцитарным плеоцитозом [7]. Пневмококковый менингит следует исключать при наличии у пациентов в анамнезе пневмоний.

Клиническая картина пневмококкового менингита сходна с клиникой менингококкового, но отличается более тяжелым течением с ранним присоединением энцефалитической симптоматики и развитием менингоэнцефалита. Уже в первые дни заболевания отмечается нарушение сознания, очаговые симптомы, патологические рефлексы. Возникают парезы, параличи, поражения черепных нервов (чаще глазодвигательных — III пара). Раннее появление очаговых симптомов, иногда на 1–2-й день заболевания, отличает пневмококковый менингит от менингококкового.

В общем анализе крови (ОАК) выявляются лейкоцитоз, увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов со сдвигом влево, анэозинофилия, увеличение СОЭ. В то время как нормоцитоз и тем более лейкопения — прогностически неблагоприятные признаки течения заболевания [6].

При люмбальной пункции ликвор вытекает под повышенным давлением и часто с зеленоватым оттенком. В ликворе пропорционально цитозу увеличено содержание белка, цитоз — более 1000*10*6/л, в основном за счет нейтрофильных гранулоцитов. В первые дни заболевания может быть снижено содержание глюкозы в ликворе.

Характерной особенностью пневмококкового менингита является склонность к затяжному, рецидивирующему течению. При затяжной форме часто наблюдается подострое начало, длительное волнообразное течение. В значительной мере это связано с поздней диагностикой и вследствие этого дефектами терапии.

У 30% больных проникновение пневмококка в ЦНС вызывает менингоэнцефалит, что в значительной мере определяет тяжесть заболевания и увеличивает частоту летальных исходов.

У некоторых больных пневмококковый менингит имеет отклонения от типичного течения. Так, Н.В. Бондарева с соавторами (1985) наблюдали больных пневмококковым менингитом с преобладанием лимфоцитов в ликворе [7]. У всех больных менингит возникал первично и протекал в среднетяжелой форме, но из ликвора был выделен пневмококк.

При пневмококковых нейроинфекциях наблюдается самая высокая летальность в группе гнойных менингитов — 51–64% [3].

Таким образом, для менингита пневмококковой этиологии более характерным является: более старший возраст больных; наличие предшествующей патологии ЦНС; более тяжелое и бурное течение заболевания; высокая вероятность неблагоприятного исхода; изменения ЦСЖ, включающие: цитоз, превышающий 1000 клеток в 1 мкл (70,0% больных); удельный вес нейтрофилов, превышающий 80% (80,0% больных); уровень белка, превышающий 1 г/л (80,0% заболевших) [8].

Резистентность пневмококков к пенициллину в настоящее время возрастает, в странах Европы частота выделения пенициллинорезистентных пневмококков колеблется от 4 до 62% [9, 10]. Часто такие штаммы устойчивы и к другим антибактериальным препаратам — макролидам, тетрациклину, хлорамфениколу, сульфаниламидам, — однако сохраняют высокую чувствительность к цефалоспоринам 3-го поколения [10]. Поэтому препаратами выбора при пневмококковом менингите являются цефалоспорины 3-го поколения и левомицетин. Длительность антибактериальной терапии обычно составляет 10–14 дней, а при гладком течении — 7–10 дней [6].

Целью настоящего исследования являлось изучение уровня чувствительности *Str. pneumoniae* к антибиотикам различных групп за 10 лет в конце XX и в начале XXI века (1991–2000 и 2001–2010 гг.) и оценка эффективности лечения в зависимости от стартовых антибиотиков.

Материалы и методы. Проведен анализ 51 истории болезни детей с нейроинфекциями пневмококковой этиологии, находившихся на лечении в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница» г. Минска, за 20 лет (1991–2010 гг.). У всех больных диагноз был подтвержден выделением *Str. pneumoniae* из ликвора или крови. В 1991–2000 гг. (1-я группа) пневмококковая этиология острого бактериального менингита выявлена у 19 больных, а в 2001–2010 гг. (2-я группа) — у 32 больных. Наиболее достоверным лабораторным методом подтверждения этиологии заболевания остается бактериологический. В наблюдениях также проводили бактериоскопическое исследование мазков ликвора и «толстой капли» крови, окрашенных по Граму, выделение и идентификацию культур возбудителя из ликвора и крови общепринятыми методами, определяли чувствительность выделенных штаммов *Str. pneumonia* к антибактериальным препаратам, осуществляли общепринятые лабораторные исследования. Полученные результаты обработаны статистически.

Результаты. В ходе исследования был проведен анализ клинического течения, лабораторной диагностики, чувствительности пневмококков к антибиотикам и эффективности стартового лечения. Также сравнивали заболеваемость и летальность за последние 10 лет прошлого века и 10 лет нынешнего века.

Под наблюдением находился 51 ребенок, из них 19, которые заболели в прошлом веке и 32 — в нынешнем. Распределение пациентов по возрасту и годам наблюдения представлено в таблице 1.

Таблица 1 — Характеристика обследованных пациентов

Годы	Распределение по возрасту					Всего
	до года	1–3 года	3,1–7 лет	7,1–14 лет	>14 лет	
1991–2000	4 21,1 ± 9,6%	4 21,1 ± 9,6%	3 15,8 ± 8,6%	7 36,8 ± 11,4%	1 5,2 ± 5,2%	19 100%
2001–2010	6 18,8 ± 6,9%	13 40,5 ± 8,7%	6 18,8 ± 6,9%	1 3,1 ± 3,1%	6 18,8 ± 6,9%	32 100%
Всего	10 19,6 ± 5,6%	17 33,4 ± 6,6%	9 17,6 ± 5,3%	8 15,7 ± 5,1%	7 13,7 ± 4,8%	51 100%

Как можно отметить из полученных данных, в 1991–2000 гг. достоверно чаще болели дети в возрасте от 7,1 до 14 лет ($p < 0,01$) по сравнению с детьми в 2001–2010 гг. Наибольшая заболеваемость пневмококковой нейроинфекцией набюдается у детей до 3-х лет — в первой группе 42,2% и во второй — 59,3%, т.е. практически половина наблюдавшихся больных. Заболеваемость в первом десятилетии 21 века практически в 2 раза превышала заболеваемость в конце 20 века, что может быть связано с улучшением лабораторной диагностики или истинным ростом заболеваемости. При анализе половой принадлежности больных установлено, что доставерно чаще болели мальчики (66,7 ± 6,6%) по сравнению с девочками (33,3 ± 6,6%). Также выявлено, что летом дети реже болели пневмококковыми нейроинфекциями.

При анализе сроков поступления в стационар выявлено, что каждый третий больной ребенок был госпитализирован в 1 сутки от начала заболевания, что свидетельствует об остроте развития патологического процесса и наличии клинических показаний для госпитализации в стационар. Однако в инфекционную больницу на 3–5 сутки поступало практически такое же количество больных с запущенным патологическим процессом (32,7%).

Нами проведен анализ гематологичесих сдвигов при пневмококковых инфекциях в зависимости от возрастных показателей.

Таблица 2 — Показатели общего анализа крови при пневмококковых нейроинфекциях

	Лейкоциты, 10^9/л	Палочкоядерные	Сегментоядерные	СОЭ, мм/ч
Норма	8 15,7 ± 5,1%	4 7,8 ± 3,8%	40 78,4 ± 5,8%	16 31,4 ± 6,5%
< нормы	1 2,0 ± 2,0%	—	8 15,7 ± 5,1%	—
>нормы	42 82,3 ± 5,3%	47* 92,2 ± 3,8%	3 5,9 ± 3,3%	35 68,6 ± 6,5%
Всего	51 100%	51 100%	51 100%	51 100%

Примечание — * — у 4 детей наблюдались юные формы лейкоцитов

Изменения со стороны общего ОАК были разнонаправленные, но следует выделить лейкоцитоз (82,3 ± 5,3%%), палочкоядерный сдвиг (92,2 ± 3,8%) и увеличенное СОЭ (68,6 ± 6,5%). Однако содержание лейкоцитов у каждого 7-го больного было в пределах нормы, а у каждого 3-го были нормальные показатели СОЭ.

Таблица 3 — Показатели ликвора при пневмококковых нейроинфекциях

Цитоз, 10^6/л		Нейтрофилы, %		Белок, г/л		Глюкоза, ммоль/л/час	
Норма	1 2,1 ± 2,1%	Норма	—	< 0,3	7 14,3 ± 5,0%	< 2,5	19 39,6 ± 7,1%
11-1000	16 33,3 ± 6,8%	< 50	2 4,2 ± 2,9%	0,3-1,0	18 36,7 ± 6,9%	2,5-3,5	13 27,1 ± 6,4%
>1000	31 64,6 ± 6,9%	>50	46 95,8 ± 2,9%	>1,0	24 49,0 ± 7,1%	>3,5	16 33,3 ± 6,8%
Всего	48* 100%	Всего	48* 100%	Всего	49 100%	Всего	48 100%**

Примечания:

* — получен детрит и клетки не дифференцируются;

** — у 1 ребенка глюкоза не определялась

Цитоз в ликворе превышал 1000*10*6/л у 64,6 ± 6,9% больных и в 95,8 ± 2,9% случаев преобладали нейтрофильные клетки.

При исследовании ликвора у 33,3 ± 6,8%, т.е. практически у каждого 3-го больного, клеток в ликворе было меньше 1000*10*6/л, что не представляло возможности во время пункции определить характер гнойного или серозного ликвора и у 2 больных (4,2 ± 2,9%) содержание сегментоядерных клеток в ликворе было меньше 50%, что не позволяло даже после люмбальной пункции определять характер менингита и только после бактериологического исследования уточнялась этиология менингита.

Содержание белка больше 0,3 г/л было у 85,7 ± 5,0% больных, но у 7 (14,3 ± 5,0%) было в пределах нормы. Разнонаправленные изменения отмечались и в содержании глюкозы в спинномозговой жидкости: у 13 (27,1 ± 6,4%) уровень глюкозы в пределах нормы, у 16 (33,3 ± 6,8%) — повышен и у 19 (39,6 ± 7,1%) — снижен. Снижение глюкозы в ликворе создает определенные трудности в дифференциальной диагностике с менингитом туберкулезной этиологии, особенно при лимфоцитарном цитозе.

Таким образом, общеклиническое исследование ликвора подтверждает диагноз гнойного менингита, но не может уточнить этиологию заболевания.

Микробиологическое обследование больных проводилось по программе диагностики генерализованных форм менингококковой инфекции с исследованием «толстой капли» крови для обнаружения диплококкков в ликворе и/или крови с помощью бактериоскопии и бактериологического исследования больных детей.

При бактериоскопии обнаруживались грамположительные диплококки, в отличие от грамотрицательных менингококков. Данные микробиологического обследования больных детей с пневмококковой нейроинфекцией приведены в таблице 4.

Таблица 4 — Диагностика пневмококковой нейроинфекции у детей

Годы	Ликвор				Кровь			
	Бактериологически		Бактериоскопически		Бактериологически		«Толстая капля» крови на менингококк	
	Иссл-но образцов	+	Иссл-но образцов	+	Иссл-но образцов	+	Иссл-но образцов	+
1991–2000	19	15 78,9 ± 9,6%	19	11 57,9 ± 11,6%	19	11 57,9 ± 11,6%	19	7 36,8 ± 11,4%
2001–2010	30	22 73,3 ± 8,1%	30	22 73,3 ± 8,1%	32	22 68,8 ± 8,2%	32	18 56,3 ± 8,8%
Всего	49*	37 75,5 ± 6,1%	49*	33 67,3 ± 6,7%	51	33 64,7 ± 6,7%	51	25 49 ± 7,0%

Примечание — * — 2 ребенка не пунктировано

Как можно отметить из приведенных данных, при бактериоскопии ликвора у 67,3 ± 6,7% больных детей обнаруживались диплококки и несколько реже возбудители обнаруживались в «толстой капли» крови — 49,0 ± 7,0%.

Однако «золотым» стандартом диагностики пневмококковой нейроинфекции является выделение пневмококка из ликвора и/или крови, что позволяет не только достоверно подтвердить диагноз, но и определить чувствительность возбудителя для последующей коррекции этиотропного лечения.

Как можно отметить из приведенных данных, бактериологическое исследование было более информативным, чем бактериоскопия. Это и понятно, так как не всегда количество возбудителей в крови или ликворе может достаточным для проведения и получения успешного результата бактериоскопии. Так, при бактериологическом исследовании ликвора пневмококк выделен у 37 (75,5 ± 6,1%) больных из 49, а крови — у 33 (64,7 ± 6,7%) из 51 обследованного больного ребенка. Полученные данные подтверждают гипотезу, что в патогенезе пневмококковых нейроинфекций играет роль гематогенное распространение пневмококка.

В двух средах (ликворе и крови) бактериоскопически возбудитель обнаруживался у 16 (31,4%) больных детей, а выделился одновременно из ликвора и крови у 21 (41,2%) больного ребенка.

Диагноз пневмококковой нейроинфекции был подтвержден бактериологически у всех больных, что позволило с учетом клинических данных выделить следующие клинические формы болезни (таблица 5).

Таблица 5 — Клинические формы пневмококковых нейроинфекций (1991–2010)

Клинические формы заболеваний	Возраст					
	до года	1–3 года	3,1–7 лет	7,1–14 лет	старше 14 лет	всего
Менингит	1 2,0 ± 2,0%	6 11,8 ± 4,5%	4 7,8 ± 3,8%	2 3,9 ± 2,7%	4 7,8 ± 3,8%	17 33,3 ± 6,6%
Менингоэнцефалит	7 13,7 ± 4,8%	9 17,6 ± 5,3%	5 9,8 ± 4,2%	6 11,8 ± 4,5%	3 5,9 ± 3,3%	30 58,9 ± 6,9%
Септицемия	2 3,9 ± 2,7%	2 3,9 ± 2,7%	—	—	—	4 7,8 ± 3,8%

Как можно отметить из приведенных данных, пневмококковые нейроинфекции достоверно чаще протекали в виде менингоэнцефалита ($p < 0,05$) у детей до 3 лет, а также в общей выборке обследованных больных ($p < 0,01$). Следует отметить, что у 2 больных была только сыпь на кожных покровах без изменений со стороны ликвора.

При анализе эффективности лечения установлено, что за 1991–2000 гг. умерло 4 больных, что составило 21,1 ± 9,4%, в то время как за 2001–2010 гг. не было ни одного летального исхода.

Для выяснения причины таких неблагоприятных исходов нами проанализирована чувствительность пневмококков к антибиотикам. В 1991–2000 гг. из 15 выделенных пневмококков из ликвора и/или крови 11 (73,3%) были чувствительны к пенициллину, а 4 (26,7%) уже в 1999–2000 гг. были устойчивы к данному антибиотику, 90% культур были чувствительны к цефтриаксону и ампициллину. Установлено, что в 2000–2010 гг. к левомицетину были чувствительны 100% выделенных культур, 93,3% — к цефтриаксону, 91,7% — к цефуроксиму, 93,3% — к меронему, 91,8% — к цефотаксиму, к пенициллину — только 12,5%, амикацину — 6,2%.

При анализе стартового этиотропного лечения в последнее десятилетие 20-го века было выявлено, что в 81,3% случаев назначался пенициллин самостоятельно или в комбинации с другими антибиотиками, при этом более чем в 50% случаев приходилось проводить смену антибактериальной терапии.

В 21-м веке перешли на схему лечения с использованием цефалоспоринов, так как прогрессивно нарастала резистентность к пенициллину (87,5% устойчивых штаммов).

В 21-м веке только одному (3,2%) больному был назначен пенициллин и, скорее всего, по инерции, а в 90,4% случаев в виде моно- или комбинированной терапии назначались цефалоспорины 3-го поколения. Чаще всего использовали монотерапию с использованием цефтриаксона (56,3%), т.е. каждому второму ребенку.

Заключение. Проведенное исследование показало, что пневмококковые нейроинфекции продолжают оставаться наиболее тяжелыми формами бактериальных гнойных менингитов. Несмотря на своевременную диагностику, значительные успехи в этиотропной и патогенетической терапии

более чем у трети переболевших наблюдаются остаточные нарушения в психо-неврологическом статусе. Снизить риск возникновния заболевания способны профилактические меры, включающие специфическую вакцинацию от пневмококковой инфекции детей из группы риска.

Выводы:

1. В последние 10 лет количество больных с пневмококковыми нейроинфекциями увеличилось пратически в 2 раза, что может быть связано с улучшением лабораторной диагностики или истинным ростом заболеваемости.

2. Половина (50,3%) случаев заболеваний приходится на возраст до 3 лет, чаще у мальчиков.

3. Пневмококковые нейроинфекции протекают достоверно чаще в виде менингоэнцефалита (58,9 ± 6,9%).

4. Для диагностики пневмококковой нейроинфекции микробиологическое исследование высокоинформативно, но должно быть комплексным с исследованием ликвора и крови.

5. В последние годы произошла селекция пневмококков, устойчивых к пенициллину (87,5%) и амикацину (93,8%), что должно учитываться в клинических рекомендациях по лечению больных с пневмококковыми нейроинфекциями.

6. Своевременная смена стартовой антибактериальной терапии с учетом чувствительности и других возбудителей гнойных менингитов привели к ликвидации летальности от пневмококковых менингитов/менингоэнцефалитов в 21-м веке.

Литература

1. Пневмококковая инфекция и её профилактика: пособие для практич. врачей / С.М. Харит [и др.]. — СПб.: НИИДИ, 2009. — 48 с.

2. Обзор практических рекомендаций по ведению пациентов с бактериальным менингитом Американского общества инфекционных болезней / И.А. Карпов [и др.]. // Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотерапия. — 2006. — № 3. — С. 217–242.

3. Белошицкий, Г.В. Лекарственная устойчивость пневмококков, выделенных из спинномозговой жидкости и крови больных менингитами / Г.В. Белошицкий, И.С. Королева // Эпидемиол. и инфекц. болезни. — 2006. — №3. — . 32–35.

4. Богадельников, И.В. Первичные гнойные менингиты у детей: Клінічні лекції / И.В. Богадельников // Здоровье ребенка. — 2009. — № 2. — С. 1–4.

5. Покровский, В.И. Гнойные менингиты (клиника, диагностика, лечение): автореф. дис. …д-ра мед. наук / В.И. Покровский. — М., 1966. — 32 с.

6. Кудин, А.П. Бактериальные менингиты у детей : учеб. пособие / А.П. Кудин, А.А. Астапов, Г.В. Барановская. — Минск: БГМУ, 2003. — 48 с.

7. Некоторые особенности пневмококкового менингита / Н.В. Бондарева [и др.] // Сов. мед. — 1985. — № 6. — С. 104–107.

8. Носительство *Strep. pneumoniae* у детей / В.В. Скворцова [и др.] // Журн. охраны материнства и детства. — 2006. — № 1. — С. 115–118.

9. The prevalence of drug resistant *Streptococcus pneumonia* in Atlanta / J. Hoffman [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1995. — Vol. 333. — P. 481–486.

10. Resistance to penicillin and cephalosporin and mostly from server pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain / R. Pillars [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1995. — Vol. 333. — P. 474–480.

Поступила 03.08.2011

CHILDREN PNEUMOCOCCAL NEUROINFECTION: PROSPECTS FOR TREATMENT

Astapov A.A., Varenik V.M., Peniaz T.V.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

An analysis of 51 case histories of children with pneumococcal neuroinfection treated in Municipal Children Infectious Diseases Hospital in Minsk from 1990 to 2010 has been conducted. Based on the research it was revealed that in the 21st century there was a selection of pneumococci resistant to penicillin and amikacin, which should be considered in clinical recommendations for therapy. According to antibiograms cefrtiaxone or chloramphenicol succinat should be applied for the treatment of pneumonococcal neuroinfections in parenteral administration.

Keywords: pneumococcus, meningitis, meningoencephalitis, sensitivity to antibiotics.

КОМПЛЕКСНАЯ СИСТЕМА ДИАГНОСТИКИ АНАЭРОБНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

Окулич В.К., Шилин В.Е., Чередняк А.Н., Мацкевич Е.Л., Плотников Ф.В.

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

Резюме. Работа посвящена актуальной проблеме создания комплексной системы диагностики анаэробных возбудителей хирургической инфекции. Изучение этиологической структуры возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний и осложнений, резистентности выделенной микрофлоры к антимикробным препаратам необходимо для разработки схем рациональной антибиотикотерапии, использование которых дает возможность оптимизировать результаты лечения больных и замедлить рост резистентности к антимикробным препаратам. Микробиологический мониторинг позволяет повысить эффективность этиологической диагностики, лечения и уменьшить частоту необоснованных назначений более дорогостоящих препаратов [1].

Ключевые слова: тест-система, анаэробные микроорганизмы, идентификация, чувствительность к антибиотикам.

Введение. Анаэробные микроорганизмы в настоящее время занимают одно из ведущих мест в этиологической структуре хирургических инфекций [2]. По современным представлениям, примерно в 81,52% случаев инфекции в хирургии смешанные аэробно-анаэробные. Анаэробная микрофлора играет значимую роль в развитии раневой инфекции [3], инфекций женской половой системы [2, 4], инфекций головы и шеи [4, 5] и ряда других. В развитии гнойно-септических процессов у человека среди анаэробной микрофлоры преобладают *Bacteroide sspp.* [3, 4, 6]. Кроме того, в качестве возбудителей хирургических инфекций часто выступают *Fusobacterium spp.*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Prevotella spp.* [3–6].

В настоящее время определение чувствительности анаэробов к антибиотикам производится для проведения целенаправленной терапии у пациентов с тяжелыми угрожающими жизни инфекциями, для выявления резистентности к новым антибактериальным препаратам с целью оценки возможности их использования в клинической практике [3].

Цель. Разработать тест-системы для идентификации и определения чувствительности анаэробных микроорганизмов к антибиотикам.

Материалы и методы. В работе использованы стандартные бактериологические методы. Для идентификации анаэробов и определения их чувствительности к антибиотикам использовались стрипы фирмы «bioMerieux»: rapidID 32 A и ATB® ANA. Учет опытов производили в автоматическом режиме на биохимическом анализаторе ATB Expression.

Для определения чувствительности к антибиотикам использовали стандартные диски Becton Dickinson (США), содержащие определенное количество антибиотиков и стандартные питательные среды, необходимые для роста данного вида микроорганизма. Для интерпретации полученных результатов использовали таблицы, рекомендованные Национальным комитетом по клиническим лабораторным стандартам США, путем сопоставления диаметра зон задержки роста испытанной культуры с пограничными значениями диаметра зоны в таблице.

Статистическую обработку полученных цифровых материалов производили на персональном компьютере с помощью программ Microsoft Excel 2000, StatgraphicsPlus, Version 5.1.

Результаты и обсуждение. Учитывая этиологическую структуру ведущих анаэробных возбудителей хирургической инфекции, для определения видовой принадлежности анаэробов разработана тест-система «ИД-АНА».

Тест-система включает стандартный планшет, содержащий 96 лунок с высушенными питательными средами и субстратами для 24 тестов с добавленным индикатором для определения уреазной активности; утилизации D-маннозы, D-раффинозы, глютаминовой кислоты, калия нитрата, 2-нафтилфосфата, аргинина; определения активности соответствующих ферментов с использованием хромогенных субстратов: 4-нитрофенил-αD-галактопиранозид, 4-нитрофенил-βD-галактопиранозид, 4-нитрофенил-αD-глюкопиранозид, 4-нитрофенил-βD-глюкопиранозид, 4-нитрофенил-βD-глюкуронид, 4-нитрофенил-N-ацетил-βD-глюкозаминид, 4-нитрофенил-αL-фукопиранозид, L-аргинин-β-нафтиламид,L-пролин-β-нафтиламид, L-лейцин-β-нафтиламид,

L-тирозин-β-нафтиламид,L-глицин-β-нафтиламид, L-гистидин-β-нафтиламид, L-серин-β-нафтиламид, L-Glutamaticacid-β-нафтиламид; а так же выработки индола (L-триптофан).

При постановке тест-системы для идентификации анаэробов первоначально готовили взвесь микроорганизмов. Для этого бактериологической петлей вносили одну или более колоний анаэробных бактерий (выращенных на селективной среде для анаэробов в течение 18–24 ч при 37 °С) в ампулу с 2 мл стерильного раствора хлорида натрия с массовой долей 0,9%. Оптическая плотность взвеси в ампуле после внесения микроорганизма должна была соответствовать 4 оптическим единицам (*McFarland*).

Переносили в ампулу с питательной средой 5 мкл приготовленной взвеси бактерий, тщательно перемешивали. Далее вносили в каждую лунку планшета, содержащего дегидрированные субстраты с индикатором или хромогенные субстраты, по 135 мкл питательной среды с микроорганизмами (≈10^7 КОЕ/мл). Планшет накрывали крышкой и инкубировали в термостате при 36 ± 2 °С в течение 4 ± $4^{1/2}$ часов.

После инкубации в аэробных условиях производили визуальный или инструментальный учет. Штаммы, имеющие ферментативную способность, расщепляли соответствующие субстраты с изменением цвета содержимого лунок планшета. При отсутствии ферментативной способности изменения цвета содержимого лунок не происходило. Создана тест-система с учетом результатов после 4–6-часовой инкубации в неанаэробных условиях за счет использования более концентрированной микробной взвеси. При таких условиях не наблюдается роста анаэробных бактерий. Однако за счет высокой микробной концентрации на субстрат действует большое количество соответствующего фермента, что обеспечивает срабатывание теста при непродолжительной инкубации и создает возможность создания экспресс-системы.

Инструментальный учет производили с помощью многоканального спектрофотометра Ф300 и компьютера с программным обеспечением NewID для идентификации микроорганизмов по их субстратному профилю (компьютерная программа зарегистрирована в Национальном центре интеллектуальной собственности 13.02.2008 № 015).

Стандартизованный подход к комплектации тест-систем, наличие в них дегидрированных субстратов с индикатором или хромогенных субстратов позволяет увеличить их срок годности до года с момента выпуска и создает возможности по организации промышленного производства.

Для оценки чувствительности выделенных изолятов анаэробов к антибиотикам была разработана тест-система «АБ-АН». Основой систем является планшет, который содержит 8 рядов по 12 лунок и позволяет определять чувствительность 4 микроорганизмов к 12 антибиотикам. Последняя лунка каждого четного ряда не содержит антибиотика и служит для определения положительного контрольного роста. В двух лунках содержатся две пороговые концентрации препарата. Антибиотики в виде растворов вносили в лунки, после чего планшет сушился в специальных условиях.

Набор антибиотиков в системах разработан нами в результате анализа литературных источников и проведенного исследования, которое позволило установить наиболее часто используемые препараты в хирургических отделениях РБ. Он включает: пенициллин, амоксициллин + клавуланат, тикарциллин + клавуланат, цефокситин, имипенем, меропенем, клиндамицин, хлорамфеникол, метронидазол, моксифлоксацин, амоксициллин, тикарциллин.

Для постановки опыта по определению чувствительности готовили взвесь микроорганизмов. Для этого бактериологической петлей вносили одну или более колоний анаэробных бактерий, выращенных в течение 18–24 ч при 37 °С на селективной среде для анаэробов в ампулу (флакон) с 2 мл стерильного раствора хлорида натрия с массовой долей 0,9%. Оптическая плотность взвеси в ампуле после внесения микроорганизма должна была соответствовать 0,5 оптическим единицам (*McFarland*). Переносили в ампулу с питательной средой 5 мкл приготовленной взвеси бактерий, тщательно перемешивали. Затем вносили в каждую лунку планшета, содержащего лиофильно высушенные антибиотики, по 135 мкл питательной среды с микроорганизмами (≈10^7 КОЕ/мл). Планшет накрывали крышкой и инкубировали 18 24 ч при 35–37 °С в анаэростате, в котором создавали анаэробные условия.

После инкубации производили визуальный или инструментальный учет. При визуальном учете при отсутствии роста в лунках с 1-й и 2-ой концентрацией антибиотика штамм считали чувствительным, при наличии роста в лунках с 1-й и 2-ой концентрацией штамм считали устойчивым,

при наличии роста в лунке с 1-й концентрацией, но отсутствии в лунке со 2-ой штамм обладал промежуточной чувствительностью.

Инструментальный учет производили с помощью многоканального спектрофотометра Ф300 и компьютера с программным обеспечением Sensitiv (компьютерная программа зарегистрирована в Национальном центре интеллектуальной собственности 05.10.2009 № 106).

Комплектация систем позволяет осуществлять постановку метода непосредственно после вскрытия комплекта, а возможность визуального и инструментального учета результатов создает значительные удобства для пользователя. Таким образом, разработанная нами тест-система характеризуется большим разнообразием антибиотиков, относительной дешевизной, простотой в изготовлении, эксплуатации и сможет найти широкое применение для определения чувствительности штаммов возбудителей инфекции в бактериологических лабораториях различного профиля.

Выводы:

1. Разработана тест-система «ИД-АНА» для идентификации анаэробов однократного использования, предназначенная для определения видовой принадлежности анаэробных микроорганизмов и характеризующаяся относительной дешевизной, простотой в изготовлении и эксплуатации.

2. Разработана тест-система для определения чувствительности анаэробных бактерий к антибиотикам, которая в отличие от общепринятых методов (метод с использованием бумажных дисков, метод серийных разведений антибиотиков в жидкой или плотной питательной среде) является более стандартизированным подходом, т.к. все необходимые реагенты поставляются в комплекте, что существенно сокращает время постановки теста.

3. Создание автоматизированного комплекса, включающего тест-системы для идентификации и определения чувствительности к антибиотикам анаэробных бактерий; иммуноферментного анализатора; компьютерной программы позволит улучшить диагностику анаэробных микроорганизмов в бактериологических лабораториях любого уровня, что поможет в определении ведущих этиологических факторов хирургической инфекции, назначении адекватных лечебных и профилактических мероприятий гнойно-воспалительных заболеваний, разработке схем антимикробной терапии.

Литература

1. Jenkens, S.G. Infections due to anaerobic bacteria and the role of antimicrobial susceptibility testing of anerobes / S.G. Jenkens // Rew. Med. Microbiol. — 2001. — Vol. 12, № 1. — P. 1–12.

2. Состояние и перспективы этиологической диагностики анаэробных инфекций в лечебных учреждениях хирургического профиля / В.И. Кочеровец [и др.] // Интенсивная терапия и профилактика хирургических инфекций: тез. 4-й Всеарм. междунар. конф. — М., 2004. — С. 114.

3. Антибактериальная терапия в гнойной хирургии: руководство / под ред. А.Н. Косинца. — Витебск: ВГМУ, 2002. — 600 с.

4. Колесов, А.П. Анаэробные инфекции в хирургии / А.П. Колесов, А.В. Столбовой, В.И. Кочеровец. — Л.: Медицина, 1989. — 150 с.

5. Микробиология и иммунология гнойной хирургической инфекции, вызванной неспорообразующими анаэробами / Э.В. Малофеева [и др.] // Вест. РАМН. — 1996. — № 2. — С. 44–45.

6. Стручков, В.И. Хирургические инфекции / В.И. Стручков, В.К. Гостищев, Ю.В. Стручков. — М., 1991. — 560 с.

Поступила 29.07.2011

INTEGRATED DIAGNOSTICS SYSTEM FOR ANAEROBIC AGENTS OF SURGICAL INFECTIONS

Okulich V.K., Shilin V.E., Charadniak A., Mackevich, E.L., Plotnikov F.V.

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

The work deals with an urgent problem of creating a comprehensive system of diagnosis of anaerobic surgical infection pathogens. The study of the etiologic agents of the structure of inflammatory diseases and complications of resistance selected microorganisms to antimicrobial drugs is need to develop management schemes of antibiotic therapy, the use of which makes it possible to optimize the results of treatment and slow the growth of antimicrobial resistance. Microbiological monitoring can improve the etiologic diagnosis, treatment, and reduce the frequency of unnecessary prescriptions of more expensive drugs.

Keywords: test system, anaerobic microorganisms, identification, sensitivity to antibiotics.

ФАКТОРЫ, СПОСОБСТВУЮЩИЕ ФОРМИРОВАНИЮ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У БАКТЕРИЙ

Сирица А.В., Конь Е.В.

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

Резюме. Запуск процессов формирования антибиотикорезистентности у бактерий тесно связан с частым и неконтролируемым применением антимикробных препаратов. Данные анкетирования 96 студентов медицинского университета свидетельствуют о том, что более половины (53,1%) опрошенных принимали антибиотики в последние 12 месяцев, из них 25% — без назначения врача. Выявлен значительный удельный вес нерационального использования антибиотиков (грипп — 43,4%, ОРЗ и кашель — по 38,5%). Целесообразное назначение препаратов (фарингит, бронхит, пневмония и др.) не превышало 10%. Результаты исследования указывают на необходимость повышения уровня знаний населения о правилах приема антибиотиков.

Ключевые слова: антибиотикотерапия, антибиотикорезистентность, антропогенные факторы.

Введение. В основе механизма развития резистентности у бактерий лежит, с одной стороны, селекция устойчивых штаммов во время экспозиции антибиотика, а с другой — передача генов резистентности от устойчивых микробов к чувствительным. Из-за частого и бесконтрольного использования антибиотиков процесс приобретения устойчивости ускоряется и происходит естественный отбор резистентных штаммов [1].

Статистика динамики развития устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам свидетельствует о прогрессирующем росте числа выделения таких полирезистентных бактерий, как метициллинрезистентные стафилококки, ванкомицин-резистентные энтерококки, синегнойная и кишечная палочки, устойчивые к фторхинолонам. Часто отмечается появление полирезистентных штаммов не только среди нозокомиальных возбудителей, но и среди микроорганизмов, вызывающих внебольничные инфекции [2–5].

Традиционно проблему устойчивости бактерий решают путем синтеза новых антибиотиков или химической модификации известных [6]. Однако приобретение резистентности микроорганизмами является естественным процессом и формирование устойчивости к новому препарату — вопрос времени. Кроме того, для создания нового антибиотика требуются крупные материальные затраты и длительные сроки, что привело к сокращению объема исследований по разработке новых антимикробных препаратов.

В настоящее время особое внимание уделяется борьбе с бесконтрольным и нерациональным приемом антибиотиков. Основной сложностью является отсутствие единой политики относительно назначения антибактериальных средств на национальном и международном уровнях [7].

В сложившейся ситуации особенно актуально выявление и устранение факторов, способствующих развитию антибиотикоустойчивости бактерий, а также поиск и использование эффективных форм просвещения населения в вопросах применения антибиотиков.

Цель работы. Оценка значимости наиболее часто встречающихся факторов, обуславливающих развитие и распространение антибиотикорезистентности у бактерий.

Материалы и методы исследования. 96 студентов 2-го курса Харьковского национального медицинского университета опрошены по анкетам Special Eurobarometer N338 «Anti-microbial resistance» [8]. Средний возраст респондентов составлял 21 год, среди опрошенных насчитывалось 26% женщин и 74% мужчин.

Анализ и оценка полученных данных проведены с помощью эпидемиологического метода.

Результаты исследования и обсуждение. По результатам опроса более половины респондентов (53,1%) в последние 12 месяцев принимали антибиотики, из них 75% — по назначению врача. Остальные 25% занимались самолечением, притом 17% опрошенных приобрели препараты в аптеке без рецепта, а 8% — использовали антибиотики, оставшиеся от предыдущего курса лечения.

Прием антибиотика без назначения врача зачастую нерациональный и характеризуется неправильным выбором препарата, дозы и продолжительности курса лечения. Большинство современных антибактериальных средств обладает высокой степенью безопасности и хорошей переносимостью, поэтому население не боится их принимать. В аптеках фармацевты отпускают антибиотики

без рецепта врача. Проблема самолечения усугубляется отсутствием государственного регулирования и надлежащего просвещения населения.

По данным анкетирования, 69% студентов ошибочно считали, что антибиотики убивают вирусы, 64,1% думали, что антибиотики эффективны при гриппе и ОРЗ. Общую картину дополняет рейтинг причин приема антибиотиков респондентами, представленный на рисунке 1.

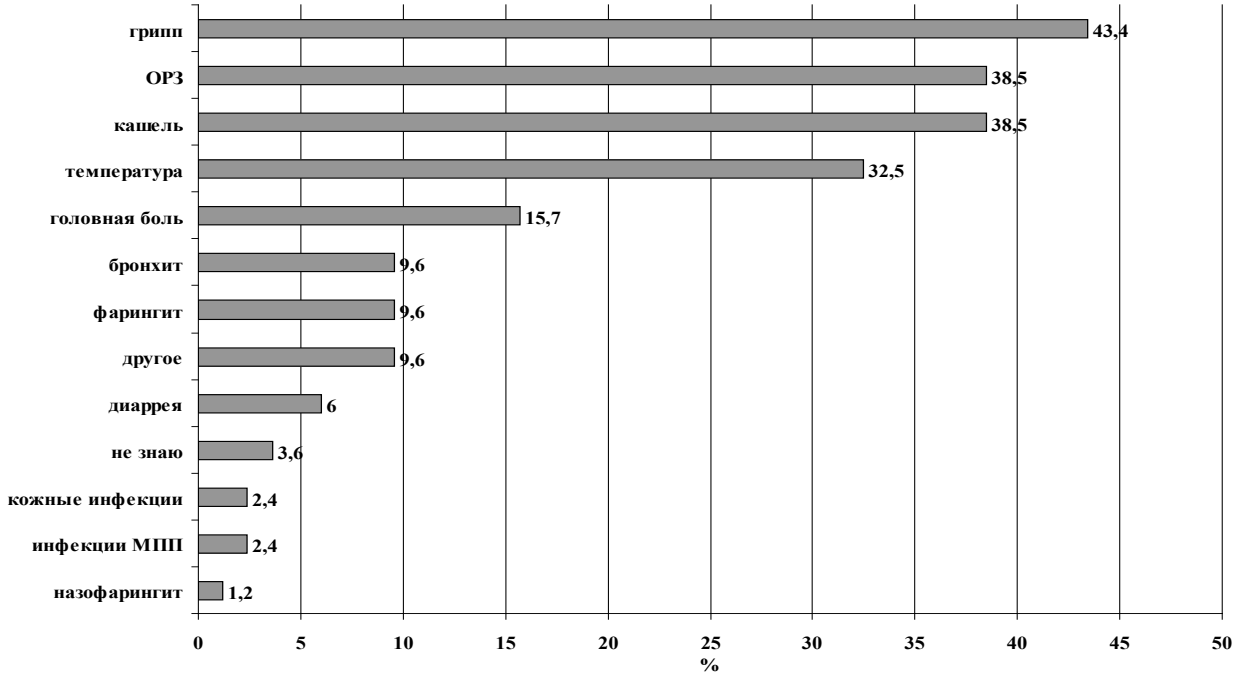


Рисунок 1 — Поводы для приема антибиотиков
(респонденты указывали несколько причин приема антибиотиков)

Таким образом, ведущей причиной приема антимикробных препаратов назван грипп (43,4%), на втором месте в рейтинге причин оказались ОРЗ и кашель (по 38,5%), на третьем — повышенная температура (32,5%). Правильное назначение антибиотиков (при фарингите, бронхите, пневмонии, кожных инфекциях, инфекциях мочеполовых путей, диарее и др.) отмечено менее чем в 10% случаев.

Таким образом, доступность препаратов и низкий уровень знаний населения приводит к частому необоснованному использованию антибиотиков.

Важное место в борьбе с антибиотикорезистентностью занимает поиск и использование эффективных форм просвещения населения в вопросах применения антибиотиков. Довольно большая доля опрошенных знала о последствиях неправильного приема антибиотиков: 71,3% респондентов были осведомлены о снижении эффективности антибиотиков при частом использовании и 53% — об опасности развития дисбактериоза. Поэтому необходимо знать, что послужило источниками информации об антибиотиках, и каким из них население доверяет больше.

По результатам опроса, основным источником информации о вреде самолечения антибактериальными средствами признан врач (45,7%), следующими по значимости оказались средства массовой информации (9,9% — интернет и 5% — радиопередачи), к сожалению, фармацевт занял одну из последних позиций в рейтинге — 1,2% (рисунок 2).

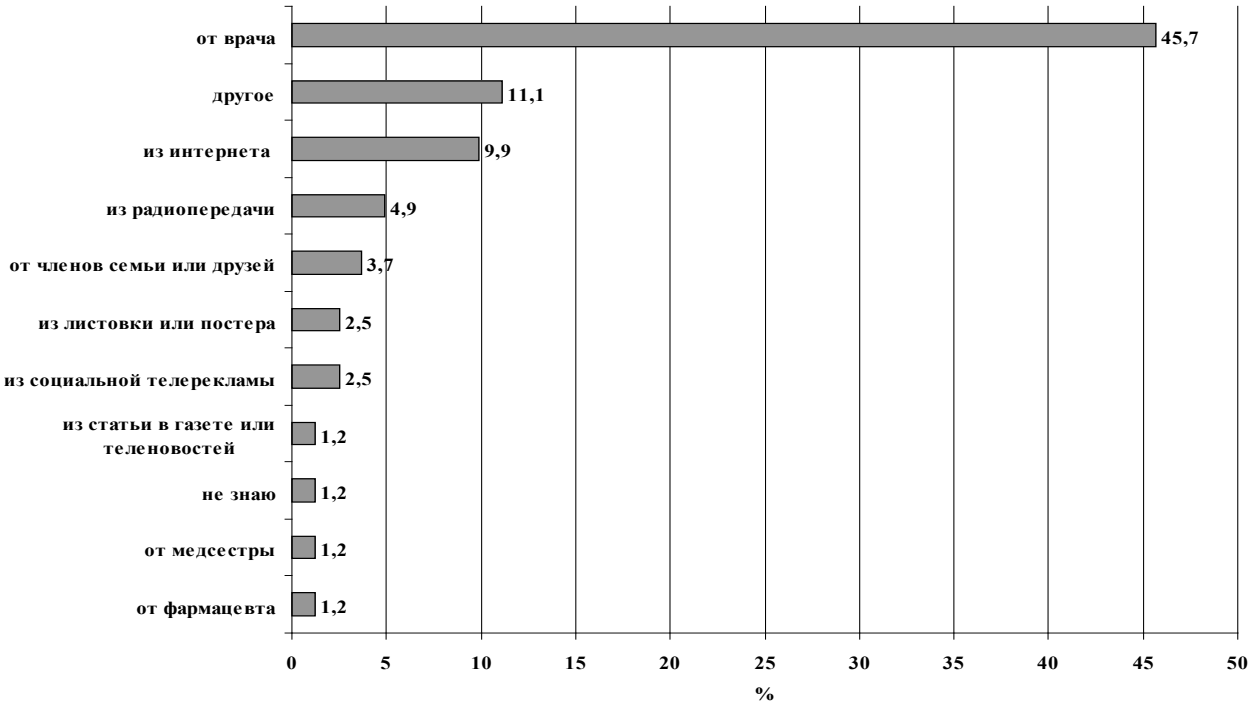


Рисунок 2 — Источники информации о вреде приема антибиотиков без медицинских показаний (респонденты указывали несколько источников информации)

Полученная информация повлияла более чем на половину (52%) респондентов: 41,2% отказались от приема антибиотиков без медицинских показаний и 35% решили всегда консультироваться с врачом.

По данным анкетирования, наибольшего доверия как источник информации об антибиотиках заслуживает врач (86,2% респондентов), второе место занимает фармацевт (48%), третье — официальные сайты Минздрава, Национального института общественного здоровья, сайт Евросоюза «Общественное здоровье» (рисунок 3).

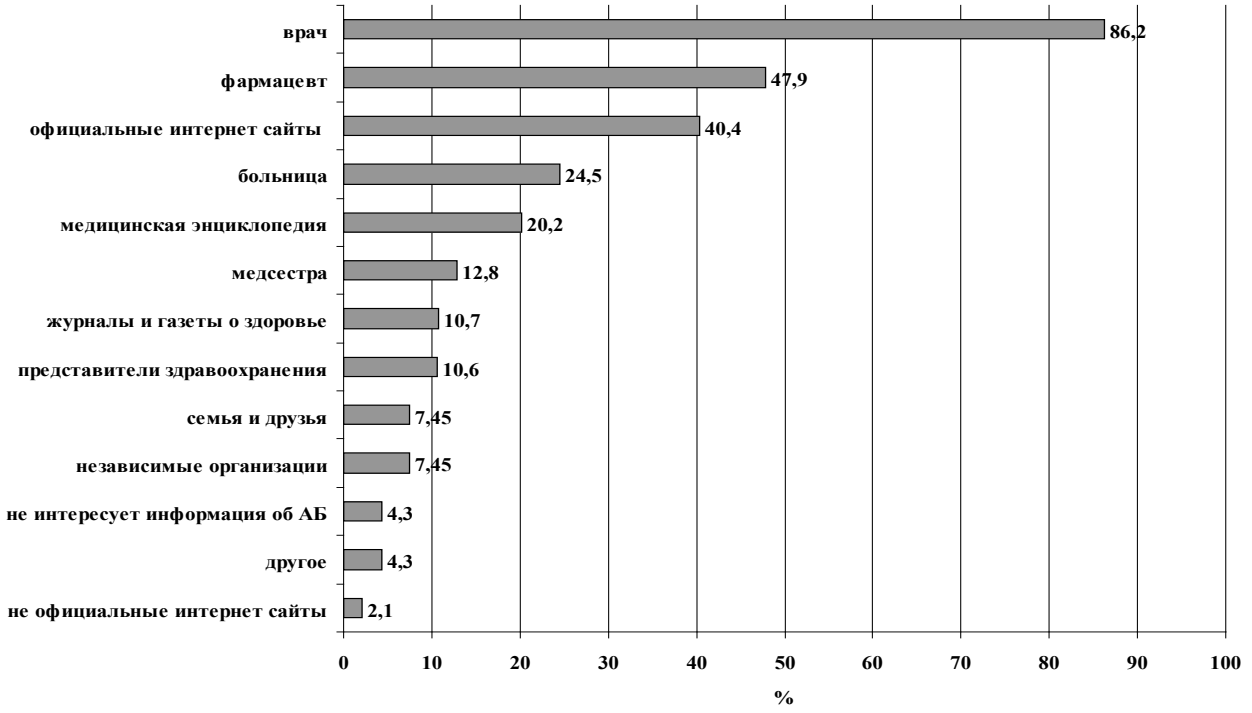


Рисунок 3 — Источники информации об антибиотиках, заслуживающие доверия (респонденты указывали до трех источников информации)

Таким образом, при правильно организованной просветительной работе с населением и специалистов, к мнению которых прислушиваются, можно значительно сократить частоту случаев нерационального использования антибиотиков.

Выводы.

По данным проведенного исследования, наиболее значимыми для развития устойчивости бактерий к антибиотикам признаны следующие антропогенные факторы: самолечение (25% опрошенных), нерациональное использование антибиотиков (при гриппе — 43,4%, ОРЗ и кашле — 38,5%) и низкий уровень осведомленности населения о правилах приема антимикробных препаратов (69% студентов считали, что антибиотики убивают вирусы, 64,1% думали, что антибиотики эффективны при гриппе и ОРЗ).

Также установлено, что для 45,7% респондентов основным источником информации об антибиотиках был врач. У 86,2% опрошенных, информация, полученная от врача, вызывает доверие. Следовательно, врач играет основную роль в просветительной работе касательно рационального использования антибиотиков.

Из-за широкого клинического применения антибиотиков формирование резистентных штаммов неизбежно. Для сдерживания процесса приобретения бактериями антибиотикоустойчивости необходимо повысить уровень осведомленности населения, усовершенствовать систему мониторинга за распространением резистентных микроорганизмов и обеспечить врачам доступ к информационным системам, способным помочь в диагностике и принятии правильного клинического решения.

Литература

1. Зубов, Л.А. Современные проблемы антибиотикорезистентности в педиатрической клинике / Л.А. Зубов, Ю.М. Богданов // Антибиотики и химиотерапия. — 1998. — № 4. — С. 43–49.

2. Zinn, C.S. Sarisa Study Group: an international multicenter study of antimicrobial resistance and typing of hospital *Staphylococcus aureus* isolates from 21 laboratories in 19 countries or states / C.S. Zinn, H. Westh, V.T. Rosdahl // Microb. Drug Resist. — 2004. — Vol. 10, № 2. — P. 160–68.

3. Trends in hospitalizations with antibiotic-resistant infections: U.S., 1997-2006 / A.G. Mainous [et al.] // Public Health Rep. — 2011. — Vol. 126, № 3. — P. 354–360.

4. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries / M.A. Borg [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. — 2007. — Vol. 60, № 6. — P. 1310–1315.

5. Шевченко, О.В. Металло-β-лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий // О.В. Шевченко [и др.] / Клинич. микробиол. антимикроб. химиотер. — 2007. — Т. 9, № 3. — С. 211–218.

6. Березняков, И.Г. Принципы разумного применения антибиотиков // Клинич. антибиотикотерапия. — 2004. — № 1. — С. 5–13.

7. Бюллетень ВОЗ: проблемы антибиотикорезистентности. — 2010. — № 12 [Электронный ресурс] // Аптека: еженедельник. — 2011. — № 1. — С. 12. — Режим доступа: http://www.apteka.ua/article/66227. — Дата доступа: 11.07.2011.

8. Anti-microbial resistance: report [Electronic resource] / Special Eurobarometer. — 2010. — № 338. — Mode of access: http://ec.europa.eu/public_opinion/archives/ebs/ebs_338_en.pdf. — Date of access: 11.07.2011.

Поступила 26.07.2011

DETERMINANTS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN BACTERIA

Siritsa A.V., Kon' E.V.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Development of antibiotic resistance in bacteria is closely associated with frequent and uncontrolled use of antibiotics. The results of questionnaire survey among students of medical university demonstrated that more than half of respondents (53.1%) took antibiotics during last 12 months, 25% of them used antibiotics without doctor's prescription. We revealed significant amount of non-rational antibiotic use (for the treatment of influenza — 43.4%, for either acute respiratory diseases or coughing — 38.5%). Rational use of antibiotics (for the treatment of pharyngitis, bronchitis, pneumonia etc.) was lower than 10%. The results of the study indicate the necessity of increasing the level of knowledge about rules of antibiotic use among population.

Keywords: antibiotic therapy, antibiotic resistance, anthropogenic factors.

ACINETOBACTER BAUMANNII-АССОЦИИРОВАННЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ТЕРАПИИ

Горбич Ю.Л.[1], Карпов И.А.[1], Кречикова О.И.[2], Левшина Н.Н.[3]

[1]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь;
[2]Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии Росздрава, Смоленск, Россия;
[3]Минский городской центр гигиены и эпидемиологии, Минск, Беларусь

Резюме. В настоящем исследовании были изучены 150 госпитальных изолятов *Acinetobacter baumannii*, выделенных от пациентов, проходивших лечение в десяти больничных организациях здравоохранения г. Минска за двухлетний период наблюдений. Наиболее активными антимикробными препаратами в отношении ацинетобактерий являлись цефоперазон/сульбактам, имипенем и меропенем, к которым были чувствительны 65,4, 48,7 и 41,3% штаммов соответственно.

По данным авторов, результаты, полученные в исследовании, впервые в Республике Беларусь основаны на двойной верификации возбудителя и клинической интерпретации каждого случая выделения возбудителя из патологического материала.

Ключевые слова: *Acinetobacter baumannii,* резистентность к антибактериальным препаратам, терапия, карбапенемы, цефоперазон/сульбактам.

Введение. Современный период эволюции характеризуется резким ускорением ее темпов для всех живых существ, включая патогенных для человека микробов и вызываемых ими заболеваний. Одним из важных направлений этой эволюции является увеличение числа нозокомиальных инфекций и доминирующее положение условно-патогенных бактерий в их этиологической структуре [1]. Одним из наиболее клинически значимых видов является *Acinetobacter baumannii (A. baumannii)*, который вызывает 2–10% грамотрицательных инфекций в Европе и США [2]. В Российской Федерации, по данным проекта РЕЗОРТ, объединившего данные 33 стационаров из 22 городов, *A. baumannii* является вторым по частоте (15,1%), после *Pseudomonas aeruginosa*, грамотрицательным возбудителем нозокомиальных инфекций [3]. Проблема инфекций, вызываемых *A. baumannii*, становится все более актуальной из-за возрастающей резистентности данных микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Встречаются штаммы, резистентные ко всем применяемым антибактериальным препаратам [4].

Получение локальных данных об антибактериальной резистентности возбудителя является основой для рациональной антибактериальной терапии, когда необходимо начать ее до получения результатов бактериологического исследования или не удается выделить этиологически значимый микроорганизм [5]. Использование локальных данных, как было доказано в ряде работ, способствует уменьшению длительности антибактериальной терапии, повышению ее адекватности, улучшению прогноза заболевания [3, 6]. В то же время данные об активности антимикробных препаратов в отношении *A. baumannii*, циркулирующих в организациях здравоохранения Республики Беларусь крайне малочисленны.

Целью настоящего исследования было оценить чувствительность нозокомиальных изолятов *A. baumannii* к антибактериальным препаратам, наиболее часто применяемым для лечения грамотрицательных госпитальных инфекций в Республике Беларусь.

Материалы и методы. В исследование включались изоляты *A. baumannii*, выделенные от пациентов, находившихся на лечении в десяти больничных организациях здравоохранения г. Минска в период с декабря 2008 г. по ноябрь 2010 г. Первичное бактериологическое исследование проводилось в бактериологической лаборатории ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии». Все штаммы дополнительно исследовались в микробиологической лаборатории НИИ антимикробной химиотерапии (Смоленск, Российская Федерация), где выполнялась их реидентификация и определение чувствительности к антимикробным препаратам. В исследование включались только изоляты, определенные по результатам идентификации и реидентификации как *A. baumannii*. Пациенты, находившиеся в стационаре менее 48 часов на момент взятия патологического материала, также исключались из исследования.

Идентификация возбудителя проводилась общепринятыми методами. Для оценки чувствительности к антимикробным препаратам (цефтазидиму, ципрофлоксацину, амикацину, гентамицину, имипенему, меропенему и цефоперазону/сульбактаму) использовали диск-диффузионный метод. Из суточных культур микроорганизмов готовили инокулюм с концентрацией $1,5\times10^8$ КОЕ/мл, что соответствовало стандарту мутности 0,5 по МакФарланду, и наносили на чашки с агаром Мюллера — Хинтон. Диски с антибиотиками (BIORAD®, Франция) наносили с помощью диспенсера. Учет и интерпретацию результатов проводили через 16–18 часов инкубации при температуре 35 ºС с помощью полуавтоматической системы BIOMIC (Giles Scientific Inc., США).

Для контроля качества проведения исследования одновременно с изучаемыми штаммами тестировались контрольные изоляты *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Escherichia coli* ATCC® 35218.

Интерпретацию результатов в обеих лабораториях проводили в соответствии с рекомендациями и критериями Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, США), 2011. Для оценки чувствительности к цефоперазону/сульбактаму использовали критерии цефоперазона.

При характеристике чувствительности микроорганизмов использовались общепринятые показатели «чувствительный», «резистентный» и «умеренно резистентный». «Умеренно резистентные» и «резистентные» штаммы в данном исследовании были объединены в категорию «нечувствительные».

Обработка данных и анализ результатов исследования были проведены с использованием программы Microsoft Excel (Microsoft, США).

Результаты исследования и их обсуждение. В соответствии с вышеприведенными критериями в исследование были включены 150 нозокомиальных изолятов *A. baumannii*, выделенных от 118 пациентов. Абсолютное большинство штаммов ацинетобактерий, включенных в исследование (74,7%), были получены от пациентов, находящихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Оставшиеся изоляты были выделены у пациентов, проходивших лечение в отделениях хирургического (15,3%), терапевтического (8%) и акушерско-гинекологического (2%) профиля. В большинстве случаев штаммы *A. baumannii*, включенные в исследование, были выделены из крови (в 42% случаев) и из мокроты (в 33,3% случаев). Распределение исследуемых изолятов по месту выделения представлено в таблице.

Таблица — Распределение нозокомиальных изолятов *A. baumannii*, включенных в исследование, по месту выделения (n = 150)

Биотоп	%	Биотоп	%
Кровь	42,0	Моча	3,3
Мокрота	31,3	Половые пути	2,0
Мазок из трахеи	2,0	Содержимое абсцесса	0,7
Плевральная жидкость	2,0	Промывная жидкость сустава	0,7
Ротоглотка	0,7	Отделяемое по дренажу	0,7
Полость носа	0,7	Раневое содержимое	14,0

Из исследованных антимикробных препаратов наибольшей активностью в отношении штаммов *A. baumannii*, включенных в исследование, характеризовались цефоперазон/сульбактам, имипенем и меропенем, к которым были чувствительны 65,4, 48,7 и 41,3% изолятов соответственно. Активность цефтазидима была сохранена только в отношении 6%, ципрофлоксацина — в отношении 7,3% исследованных штаммов ацинетобактерий.

Среди протестированных аминогликозидов гентамицин продемонстрировал более высокую активность в отношении нозокомиальных изолятов *Acinetobacter baumannii* по сравнению с амикацином. К гентамицину чувствительность сохраняли 32,7% штаммов, в то время как к амикацину — только 8,9%. Данный феномен, вероятнее всего, связан с уменьшением использования гентамицина в течение последних нескольких лет в больничных организациях здравоохранения Республики Беларусь.

Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, в целом соответствуют данным, представленным в международных литературных источниках. Однако необходимо отметить более низкую активность антибактериальных препаратов по сравнению с полученными в других исследованиях результатами.

В частности, в США, по данным проекта MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection), уровень резистентности ацинетобактерий (*A.baumannii* — 64,7%) к меропенему составил 36,8%, имипенему — 27,8%, цефтриаксону — 57,1%, цефтазидиму — 56,4%, цефепиму — 47,4%, пиперациллину/тазобактаму — 55,6%, гентамицину — 45,9%, тобрамицину — 37,6%, ципрофлоксацину — 60,9%, левофлоксацину — 59,4% [7].

В Европе, по результатам того же исследования, резистентность *Acinetobacter spp.* (*A.baumannii* — 93,8%) к меропенему составила 34,9%, имипенему — 40,4%, цефтазидиму — 63,3%, пиперациллину/тазобактаму — 56,6%, ципрофлоксацину — 67,9%, гентамицину — 31,2%, тобрамицину — 47,2%, амикацину — 25,0% [8].

В Российской Федерации, по данным проектов «РЕЗОРТ» (2002–2004 гг.) и «РЕВАНШ» (2006–2008 гг.), к меропенему были нечувствительны (резистентны и умеренно резистентны) 3,5% изолятов *A.baumannii*, к имипенему и цефоперазону/сульбактаму — 2,2%, к амикацину — 65,6%, к гентамицину — 89,1%, к нетилмицину — 22%, к ко-тримоксазолу — 75,6%, к левофлоксацину — 62,3%, к пиперациллину — 91,7%, к пиперациллину/тазобактаму — 74,7–89,2%, к цефепиму — 63,8%, к цефоперазону — 97,8%, к цефотаксиму — 93,7%, к цефтазидиму — 76,3%, к ципрофлоксацину — 73,9% [3].

В странах Южной Америки уровень резистентности к меропенему составляет 28,5%, к цефоперазону/сульбактаму — 16,7%, к цефтазидиму — 72,1%, к гентамицину — 52%, к ципрофлоксацину — 66%, к левофлоксацину — 64,6%. По данным различных исследований, резистентность *A. baumannii* к имипенему в странах Латинской Америки находится на уровне 28,1–39,4%, в Азиатско-Тихоокеанском регионе — 30,8% [3].

По данным исследования SENTRY (1998–2006 гг.) в Западно-Тихоокеанском регионе (Австралия, Таиланд, Индонезия, Индия, Филиппинские острова, Китай, Тайвань, Сингапур, Южно-Африканская Республика, Южная Корея) резистентность госпитальных изолятов *Acinetobacter spp*. к ампициллину, амоксициллину/клавуланату, тикарциллину/клавуланату, пиперациллину, пиперациллину/тазобактаму, азтреонаму, цефтазидиму была абсолютной, к цефепиму — 83,3%, к цефтриаксону — 96,7%, имипенему — 60%, меропенему — 63,3%, амикацину — 80%, гентамицину — 93,3%, тобрамицину — 73,3%, ципрофлоксацину — 96,7%, левофлоксацину — 80%, гатифлоксацину — 60%, тетрациклину — 90%, тайгециклину — 10%, ко-тримоксазолу — 93,3%, колистину — 3,3% [9]. В Японии, по данным масштабного национального исследования в 2008 г., к цефоперазону/сульбактаму были резистентны 0,6% клинических изолятов ацинетобактерий, к имипенему — 0,9%, к цефтазидиму — 2,8% [10].

За несколько последних десятилетий значительно увеличился уровень антибактериальной резистентности среди госпитальных штаммов *A. baumannii* [3, 7, 8]. В Европе за период 2002–2006 гг. число изолятов *A. baumannii,* резистентных к меропенему, возросло с 12,7 до 34,9%, к имипенему с 15,7 до 40,4% [8]. В США за период 2002–2007 гг. — с 13,0 до 36,8% и с 11,5 до 27,8% соответственно; к имипенему и ампициллину/сульбактаму — с 1,8 до 33,1% в когорте пожилых пациентов (2003–2008 гг.) [7]. В Российской Федерации с 1997–1999 гг. по 2002–2004 гг. резистентность к имипенему возросла с 0 до 2,2% [3].

Заключение. В ходе настоящего исследования было установлено, что в больничных организациях здравоохранения Республики Беларусь циркулируют мультирезистентные штаммы *A. baumannii*. Наиболее активными антимикробными препаратами при тестировании *in vitro* в отношении *A. baumannii* являются цефоперазон/сульбактам и «антисинегнойные» карбапенемы (имипенем, меропенем). Однако использование карбапенемов для лечения нозокомиальных инфекций, вызываемых *A. baumannii*, с учетом значительной доли нечувствительных изолятов, в настоящее время целесообразно только в составе комбинированной терапии в сочетании с другим антибактериальным препаратом, обладающим активностью в отношении ацинетобактерий.

Литература

1. Проблема внутрибольничных инфекций в Республике Беларусь: основные направления и перспективы борьбы и профилактики / Е.И. Гудкова [и др.] // Белорус. мед. журн. — 2005. — № 2. — С. 49–54.

2. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* / P.E. Fournier [et al.] // PLOS Genet. — 2006. — Vol. 2, № 1. — P. 62–72.

3. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России / Г.К. Решедько [и др.] // Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотер. — 2008. — Т. 10, № 2. — С. 163–179.

4. Molecular epidemiology of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates from Europe and the U.S. using a new MLST scheme / H. Wisplinghoff [et al.] // 45th ICAAC: abstr. C2-1428. — P. 126.

5. Современные аспекты эпидемиологии диагностики и лечения нозокомиальной пневмонии / Г.К. Решедько [и др.] // Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотер. — 2008. — Т. 10, № 2. — С. 143–153.

6. Kollef, M.H. Antibiotic management of ventilator-associated pneumonia due to antibiotic-resistant gram-positive bacterial infection / M.H. Kollef // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 2005. — Vol. 24, № 12. — P. 794–803.

7. Comparative activity of meropenem in US medical centers (2007): initiating the 2nd decade of MYSTIC program surveillance / R.N. Jones [et al.] // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. — 2008. — Vol. 61, № 2. — P. 203–213.

8. Turner, P.J. Meropenem activity against European isolates: report on the MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) 2006 results / P.J. Turner // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. — 2008. — Vol. 60, № 2. — P. 185-192.

9. Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme / W. Yau [et al.] // J. Infect. — 2009. — Vol. 58, № 2. — P. 138–144.

10. Evaluation of antimicrobial susceptibility for β-lactams against clinical isolates from 51 medical centers in Japan (2008) / Y. Ishii [et al.] // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 69, № 4. — P. 443–448.

Поступила 27.07.2011

ACINETOBACTER BAUMANNII-ASSOCIATED INFECTIONS: EVIDENCE FOR TREATMENT APPROACHES

Gorbich Y.[1], Karpov I.[1], Kretchikova O.[2], Levshina N.[3]

[1]Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;
[2]Institute of Antimicrobial Therapy of Smolensk State Medical Academy, Smolensk, Russia;
[3]Minsk Municipal Center of Hygiene and Epidemiology, Minsk, Belarus

One hundred and fifty nosocomial strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients treated in ten Minsk hospitals within 2-year period were looked at during the present study. The most active antimicrobials against studied acinetobacteria were cefoperasone/sulbactam (65.4% of susceptible strains), imipenem (48.7%) and meropenem (41.3%). To the authors' knowledge this multicenter study is the first one in the Republic of Belarus based on double verification of the pathogen as well as clinical judgment of the relevance of each *A.baumannii* isolated from clinical sample.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, antimicrobial resistance, therapy, carbapenems, cefoperasone/sulbactam.

ДИАГНОСТИКА ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ, В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Дракина С.А.[1], Анисько Л.А.[2], Рогачева Т.А.[2], Щерба В.В.[2], Мишаева Н.П.[1]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;
[2]Городская клиническая инфекционная больница, Минск, Беларусь

Резюме. Впервые на репрезентативном клиническом материале охарактеризованы особенности клинического течения клещевых инфекций в Республике Беларусь. Проанализировано 70 историй болезни больных, которые находились на лечении в Минской городской клинической инфекционной больнице в 2009–2010 гг. с диагнозом клещевой энцефалит (КЭ) и Лайм-боррелиоз (ЛБ) и исследовано 97 сывороток крови больных на гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ) — новую инфекцию, выявленную в республике в 2009 г. На основании клинических и серологических данных установлено, что 7 больных перенесли КЭ, 47 — ЛБ, 16 больных — микст-инфекцию (у 13 больных зарегистрирован КЭ + ЛБ, у 3 — ЛБ + ГАЧ).

Ключевые слова: клещевой энцефалит, Лайм-боррелиоз, гранулоцитарный анаплазмоз человека, сыворотка крови, антитела.

Введение. Известно, что иксодовые клещи являются переносчиками возбудителей ряда вирусных, бактериальных, риккетсиозных и протозойных инфекций, патогенных для человека [1]. В Республике Беларусь (РБ) в XX веке изучались только 2 инфекции: клещевой энцефалит (КЭ) и Лайм-боррелиоз (ЛБ) [2]. В 2009 г. была выявлена новая для РБ инфекция, переносимая иксодовыми клещами — гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ) [3].

Возбудитель ГАЧ — довольно распространенная трансмиссивная природно-очаговая инфекция, переносимая иксодовыми клещами. Возбудитель ГАЧ — *A. phagocytophilum* — относится к семейству *Anaplasmatacea*, отряду *Rickettsiales*. Паразитирует в клетках периферической крови млекопитающих и человека, разрушая гранулоцитарные лейкоциты [4].

Основными клиническими проявлениями ГАЧ являются общеинфекционный синдром (озноб, лихорадка до 39 °С, головная боль, тошнота, рвота, боли в мышцах, туловище, болезненность суставов). Изменение со стороны крови в виде тромбоцитопении (до 90%), лейкопении (около 70%) и анемии. Несколько реже отмечается тошнота и рвота, серозный менингит, пневмонии, а также гастроинтестинальные нарушения. В отдельных случаях имеют место атипичные случаи острого безжелтушного гепатита с повышенной активностью трансаминаз на 10–12-й день заболевания. Чаще заболевают мужчины старше 40 лет. Исходы заболевания, как правило, благоприятны. При моноинфекции инкубационный период обычно составляет 13 ± 2,4 дня. У большинства пациентов (75,9%) начало заболевания острое с развитием общеинфекционного синдрома (слабость, недомогание, головная боль, миалгия). У остальных постепенно нарастает умеренно выраженная интоксикация. Часто (89,7%) отмечается фебрильная температура продолжительностью от 2 до 10 дней (в среднем 4 ± 1,1 дня). На 10–12 день от начала болезни более чем у 1/3 больных наблюдается поражение печени, которое проявляется развитием острого безжелтушного гепатита с постепенным нарастанием (в 2–4 раза) активности трансаминаз, выявляемой при биохимическом анализе крови. В гемограмме больных регистрируется лейкопения (41,2%), тромбоцитопения (13,8%), гипохромная анемия (3,5), увеличение СОЭ (24,1%). У некоторых пациентов обнаруживаются изменения в общем анализе мочи: гипоизостенурия (удельный вес колеблется от 1005 до 1010), протеинурия (белок до 0,195 г/л), незначительная эритроцитурия и лейкоцитурия, иногда эти изменения сопровождаются кратковременным повышением уровня мочевины и креатинина.

В отдельных случаях наблюдается двухволновое течение с повторным подъемом температуры до фебрильных цифр на 18–20 дни болезни, сопровождавшееся незначительно выраженными симптомами интоксикации. При осложнениях наблюдаются дыхательная и почечная недостаточность, поражения нервной системы.

Цель работы — провести ретроспективный анализ заболеваний клещевыми инфекциями и амбулаторных лиц с подозрениями на эти болезни.

Материалы и методы. Для анализа было использовано 70 историй болезни пациентов с диагнозом КЭ и ЛБ, находившихся на стационарном лечении в Городской клинической инфекционной больнице г. Минска в 2009–2010 гг. Кроме того, амбулаторно обследовано 97 человек, отмечавших присасывание клещей. Сыворотки крови исследовали методами реакции иммунофлуоресценции (РИФ) и иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем, разработанных в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Сыворотки на ГАЧ исследованы методом ИФА с применением тест-систем фирмы «Омникс» (Санкт-Петербург, Россия).

Результаты и их обсуждение. Согласно заключительному диагнозу, 18 больных из 70 перенесли клещевой энцефалит, 50 — Лайм-боррелиоз и 2 — микст-инфекцию (КЭ + ЛБ).

Клещевой энцефалит. Среди больных КЭ было 12 мужчин и 7 женщин в возрасте 19–73 лет, 10 из них указали на присасывание клещей, 4 употребляли козье молоко. Инкубационный период составил от 7 до 30 дней. В таблице представлена частота клинических признаков при КЭ и ЛБ. Из нее видно, что при КЭ заболевание начиналось с лихорадки (38–39 °С), у 12 из 18 пациентов отмечалась головная боль различной интенсивности, сопровождавшаяся тошнотой и рвотой у 4 пациентов, еще у 4 отмечено головокружение. Один пациент при поступлении был недоступен продуктивному контакту, у двух наблюдалась выраженная сонливость. На боли различной локализации жаловалось 5 пациентов, 8 испытывали слабость, при этом один из них из-за слабости не мог передвигаться. У одного пациента наблюдалось шатание при ходьбе с нарушением координаторных проб.

Таблица — Частота клинических признаков у больных КЭ и ЛБ

Симптомы	КЭ (n = 18)	%	ЛБ (n = 52)	%
Эритема	—	—	36	69,2
Лихорадка	18	100	30	57,7
Головная боль	15	83,3	19	36,5
Тошнота, рвота	5	27,8	5	9,6
Головокружение	5	27,8	4	7,7
Слабость	9	50,0	23	44,2
Отечность и боли в суставах	—	—	8	15,4
Мышечные боли	5	27,8	5	9,6
Парестезии	—	—	3	5,8
Нарушения сна	—	—	3	5,8
Нарушение со стороны ВНД	1	5,6	4	7,7
Менингеальный синдром	17	94,4	1	1,9
Очаговая неврологическая симптоматика	1	5,6	—	—
Тремор	2	11,1	—	—
Шаткость при ходьбе	1	5,6	2	3,8
Увеличение л/узлов	—	—	3	5,8
Признаки ОРВИ	—	—	3	5,8
Диарея	—	—	1	1,9

Менингеальные симптомы различной степени выраженности (от отсутствия до выраженной ригидности мышц затылка и симптомов Кернига с болями в глазных яблоках) отмечены у 17 пациентов. При отсутствии менингеальных симптомов диагноз ставился на основании цитоза в цереброспинальной жидкости. У трех из них отмечалась еще и очаговая симптоматика в виде пареза взора, тремора языка и конечностей.

Отклонения в формуле крови отмечены у 8 больных (у 2 — лейкоцитоз, у 5 — увеличение количества молодых форм нейтрофилов (палочкоядерных) и у 1 — эозинофилия с лимфоцитозом). В ликворе — лимфоцитарный цитоз (15–620 клеток на 10^6/л).

У 14 пациентов диагностирована менингеальная у 3 — менингоэнцефалитическая и у 1 — лихорадочная форма заболевания.

У всех пациентов обнаружены специфические антител класса IgM (13 пациентов) и IgG (5 пациентов). Кроме того, в сыворотках крови 2 пациентов выявлены антитела к Лайм-боррелиозу (IgM в титре 1:16 и IgG в титре 1:64). Заболевание у этих пациентов протекало наиболее тяжело: у всех отмечалась продолжительная лихорадка, а у одного пациента головная боль сопровождалась рвотой.

Лайм боррелиоз. Среди 50 больных ЛБ было 30 мужчин и 20 женщин в возрасте 19–80 лет. Инкубационный период длился от нескольких дней до 3–4 месяцев. 36 человек (54,5%) поступили в стационар в стадии мигрирующей эритемы. У 13 из них наблюдалась лихорадка, на фоне которой 8 человек отмечали головную боль с тошнотой и рвотой, 4 — головокружение. На слабость и утомляемость жаловались 12 пациентов, на боль в коленных и лучезапястных суставах (без видимых изменений в них) — 8. У трех пациентов были увеличены лимфоузлы.

Установлено, что 15 пациентов (24,3%), у которых наблюдалась безэритемная форма заболевания, поступили в стационар во 2 стадии заболевания. Лихорадка была первым признаком заболевания у 12 пациентов, которая сопровождалась головной болью (9 человек) и слабостью (8 человек). У двух пациентов отмечены выраженная сонливость и заторможенность, у одного из них диагностирован синдром Баннварта.

Изменения со стороны крови наблюдались у 14 больных: увеличение количества молодых форм нейтрофилов (палочкоядерных) — у 8, лимфоцитоз — у 3, лейкоцитоз — у 2, эозинофилия — у 1. У 2 пациентов отмечено увеличение количества молодых форм нейтрофилов (палочкоядерных) в сочетании с лейкоцитозом либо лейкопенией.

У всех пациентов диагноз ЛБ подтвержден серологически. Кроме того, у 3 пациентов ЛБ обнаружены антитела класса IgM и IgG к гранулоцитарному анаплазмозу: у 2 — с мигрирующей эритемой и у 1 — с безэритемной формой заболевания.

Гранулоцитарный анаплпзмоз человека. В связи с выявлением у 3 пациентов ЛБ одновременно антител к ЛБ и ГАЧ, было проведено серологическое обследование на ГАЧ сывороток крови 86 пациентов, обратившихся в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии по случаю присасывания клещей, а также 11 пациентов, проходивших лечение в РНПЦ неврологии и нейрохирургии. Антитела к ГАЧ были выявлены в целом у 11 пациентов (11,3%), при этом чаще всего выявлялись антитела в сыворотках неврологических больных. Среди лиц, покусанных клещами, обнаружены антитела к *Anaplasma phagocytophilum* в 9,3% случаев, среди пациентов с диагнозом Лайм-боррелиоз такие антитела выявлены в 12,5%. При исследовании сывороток пациентов с хроническим поражением нервной системы, которые в анамнезе отмечали присасывание клещей, процент выявления антител к анаплазмам был выше (18,2%). У одного больного были выявлены ранние антитела (IgM), у двух больных — одновременно IgM и IgG, у остальных регистрировались только антитела класса IgG.

Заключение. Распределение больных по нозологическим формам болезней согласно заключительным диагнозам 70 историй болезней было следующим: 68 пациентов перенесли моноинфекцию (КЭ — 18 и ЛБ — 50), 2 — микст-инфекцию (КЭ и ЛБ). По данным же клинико-серологического исследования моноинфекцию перенесли 54 человека (КЭ — 7 и ЛБ — 47), 16 пациентов — микст-инфекцию (13 — КЭ и ЛБ, а 3 — ЛБ и ГАЧ).

Анализ клинико-гематологических исследований показал, что изменения в крови носили реактивный характер на инфекцию. Если при КЭ и КЭ в сочетании с ГАЧ изменения в гемограмме отмечались у 8 больных (44,4%) преимущественно в виде увеличения количества молодых форм нейтрофилов (палочкоядерных), то среди больных ЛБ и ЛБ в сочетании с ГАЧ — у 40.

Клинико-серологическими исследованиями установлено, что у пациентов, отмечавших присасывание клещей, могут развиваться КЭ, ЛБ и ГАЧ как в виде моно-, так и смешанных клещевых вирусно-бактериальных заболеваний [2, 3]. КЭ в сочетании с ЛБ протекал более тяжело: отмечалась продолжительная лихорадка, интенсивная головная боль, сопровождавшаяся рвотой. Что касается сочетанной инфекции ЛБ и ГАЧ, то клинических особенностей выявлено не было. Возможно, это обусловлено тем, что оба заболевания вызываются бактериями и эффективно лечатся антибиотиками.

Литература

1. Коренберг, Э.И. Комплексный подход к изучению и профилактике инфекций передающихся иксодовыми клещами / Э.И. Коренберг // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2003. — № 2. — С. 32–36.

2. Клинические варианты микст-инфекций (КЭ+ЛБ) / С.О. Вельгин, С.А. Дракина, В.В. Щерба, И.И. Протас // Журн. эпидемиологии и инфекционных болезней. — 2007. — № 3. — С. 38–41.

3. Мишаева, Н.П. Гранулоцитарный анаплазмоз человека в Республике Беларусь / Н.П. Мишаева, И.И. Протас, В.В. Щерба // Здравоохранение. — 2010. — № 11. — С. 19–21.

4. Малеев, В.В. Европейские рекомендации по диагностике клещевых бактериальных инфекций в Европе / В.В. Малеев // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотерапия. — 2005. — Т. 7, № 2. —С. 130–153.

Поступила 01.11.2011

DIAGNOSIS OF TICK-BORNE INFECTIONS IN BELARUS

Drakina S.A.[1], Anis'ko L.A.[2], Rogacheva T.A.[2], Scherba V.V.[2], Mishaeva N.P.[1]

[1]Republican Research & Practical center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Municipal Clinical Hospital of Infectious Diseases, Minsk, Belarus

For the first time on a representative clinical material the clinical features of tick-borne infections in the Republic of Belarus have been described. There were analyzed 70 case histories of patients who were treated in the Minsk Municipal Clinical Hospital of Infectious Diseases in 2009-2010 with diagnosis of tick-borne encephalitis (TBE) and Lyme borreliosis (LB) and examined 97 sera from these patients on granulocyte human anaplasmosis (HGA) – new infection identified in Belarus in 2009. Based on clinical and serological data it was revealed that 7 patients suffered TBE, 47 – LB, 16 patients – mixed-infection (13 patients registered with TBE+LB, and 3 patients with LB+GA).

Keywords: tick-borne encephalitis, Lyme borreliosis, granulocytic human anaplasmosis, serum, antibodies.

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ 1-АНИЛИНО-8-НАФТАЛИН СУЛЬФОНАТА ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С *BORRELIA BURGDORFERI*

Ткачев С.В.[1], Бурьяк А.И.[2], Князева О.Р.[1], Верещако Н.С.[1], Ушков А.А.[2], Владыко А.С.[1]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;
[2]РНПЦ гигиены, Минск, Беларусь

Резюме. Исследовано влияние pH на гидрофобность мест связывания 1-анилино-8-нафталинсульфоновой кислоты (АНС) с наружной мембраной спирохеты *Borrelia burgdorferi* (геновид *Borrelia afzelii*, штамм *lp21*). Показано, что при связывании с мембраной боррелий АНС находится в окружении с относительно высокой полярностью. Флуоресценция АНС при pH 12,6 обладает низкой интенсивностью и положением максимума, характерным для свечения АНС в воде. Увеличение pH приводит к снижению сродства АНС к мембране боррелий и уменьшению количества связавшегося зонда. Связывание поликлональных антител с мембраной боррелий не вызывает значительного тушения флуоресценции АНС.

Ключевые слова: 1-анилино-8-нафталинсульфонат, *Borrelia burgdorferi*, гидрофобность, флуоресценция.

Введение. Взаимодействие бактериальной клетки с различными поверхностями определяется физико-химическими свойствами взаимодействующих фаз: твердой фазы (субстрата), мембраны бактериальной клетки и жидкой среды. Физико-химические свойства бактериальной мембраны являются одним из определяющих факторов в таких процессах, как неспецифическая бактериальная адгезия на тканях организма хозяина, формирование биопленок на медицинских материалах и инструментах, адсорбция бактериальной клетки на твердой фазе при проведении серологических тестов. Параметром, характеризующим способность бактериальной клетки связываться с субстратом, может служить степень гидрофобности ее мембраны [1, 2].

1-Анилино-8-нафталинсульфоновая кислота (АНС) — наиболее часто используемый флуоресцентный зонд для исследования структурного состояния белков и мембран. Флуоресценция АНС практически отсутствует в воде, но увеличивается в десятки раз при связывании зонда с гидрофобными областями белков или мембран [3]. В работе [4] было предложено использовать параметры связывания АНС с белком (константа ассоциации, количество мест связывания) для оценки гидрофобности белка, также было показано [5], что смещение максимума свечения зонда, находящегося в неизвестном окружении, относительно максимума свечения зонда в растворителях с известной полярностью может служить критерием гидрофобности окружения зонда.

В данной работе нами проведена оценка гидрофобности наружной мембраны спирохеты *Borrelia burgdorferi* — грамотрицательной бактерии, возбудителя Лайм-боррелиоза.

Материалы и методы исследования. *Получение боррелий.* Штамм боррелий *lp-21* (геновид *Borrelia afzelii*), хранившийся при –70 °С, размораживали и проводили восстановительный пассаж на модифицированной питательной среде BSK-II medium («Sigma», США). Боррелии осаждали центрифугированием при 8000 об/мин в течение 30 мин при 4 ± 2 °С. Супернатант сливали, а осадок растворяли в фосфатном буфере (pH 7,4). Процедуру отмывки повторяли 4 раза. Количество боррелий в стоковой суспензии при определении методом темнопольного микроскопирования составляло ~5×10^5 спирохет/мл. Для проведения флуоресцентных измерений стоковую суспензию боррелий разводили в 200 раз соответствующим буфером.

Измерение флуоресценции АНС. Для флуоресцентного зондирования боррелий использовали аммониевую соль АНС («Fluka», Германия) в диапазоне конечных концентраций 10–70 мкМ. Флуоресценцию АНС регистрировали при $\lambda_{возб} = 380$ нм [5].

Параметры связывания АНС с боррелиями оценивали с помощью программы GrafPad Prism 5.0 по уравнению нелинейной регрессии:

$$F = \frac{F_{макс} \times [АНС]}{K_{дисс} + [АНС]} + tg\alpha[АНС],$$

где F — интенсивность флуоресценции АНС;

$F_{макс}$ — интенсивность флуоресценции АНС, соответствующая максимальному количеству связанного зонда;

$K_{дисс}$ — равновесная константа диссоциации комплекса АНС-мембрана;

[*АНС*] — концентрация зонда;

tgα — тангенс угла наклона кривой регрессии.

При выборе модели принимали допущение о независимости мест связывания АНС на мембране боррелий.

Тушения флуоресценции АНС осуществляли поликлональными кроличьими антителами к *Borrelia burgdorferi* («Thermo scientific», США) в диапазоне конечных концентраций 0,375–3,375 мМ. Эффективность тушения оценивали по уравнению Штерна — Фольмера [6]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + Ksv[Q],$$

где F_0 и F — флуоресценция в отсутствии и присутствии тушителя соответственно;

Ksv — константа Штерна — Фольмера;

[Q] — концентрация тушителя.

Определение полярности окружения АНС. Зависимость спектральных характеристик АНС от полярности окружения оценивали с помощью графика Липперта. При построении графика принимали, что изменения спектральных свойств флуорофора, обусловленные изменением полярности растворителя, описываются уравнением [5, 6]:

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f = \frac{2\Delta f\left(\mu^* - \mu\right)}{hca^3} + const,$$

где h — постоянная Планка;

c — скорость света;

a — радиус полости, в которой находится хромофор,

$\bar{\nu}_a$ и $\bar{\nu}_f$ — волновые числа, отвечающие положению максимумов спектров поглощения и флуоресценции соответственно;

μ* и μ — дипольные моменты молекулы флуорофора в возбужденном и основном состояниях соответственно.

Параметр Δf называется ориентационная поляризуемость. Он связан с диэлектрической проницаемостью среды (ε) и коэффициентом преломления (*n*) соотношением:

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$$

и является параметром, характеризующим полярность среды. Построение зависимости $\Delta\nu = f(\Delta f)$ может быть использовано для определения полярности окружения зонда [5]. В качестве растворителей с различной полярностью использовали бутанол и метанол, а также 5, 10, 50 и 80% растворы метанола в бутаноле. Для бутанола и метанола ε соответственно 17,7 и 32,6; n соответственно 1,397 и 1,329. Для растворов с различным содержанием компонентов ε и n рассчитывали по формулам:

$$\varepsilon = \sum_i \varepsilon_i \omega_i^{(v)} \qquad n = \sum_i n_i \omega_i^{(v)},$$

где ε_i и n_i — соответственно диалектическая постоянная и показатель преломления компонентов (*i*) раствора;

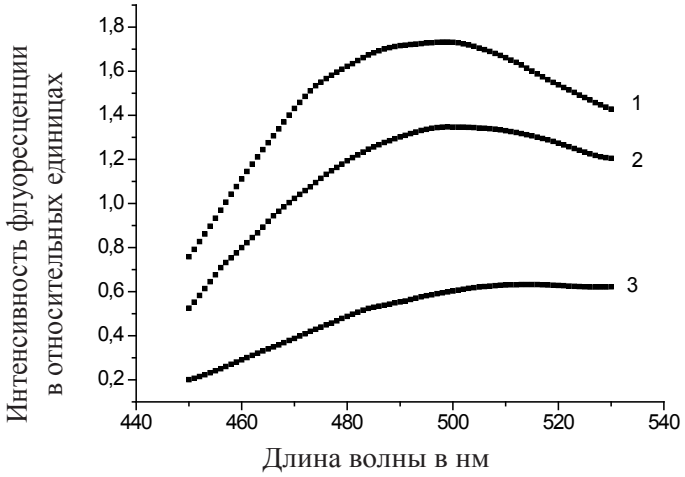
$\omega_i^{(v)}$ — их объемная доля в растворе.

Все измерения флуоресценции проводили при температуре 21 °С в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм при постоянном перемешивании пробы. Ширина щелей монохроматоров возбуждения и испускания для измерения флуоресценции АНС составляла 7,5 нм.

Измерения проводили в 10 мМ фосфатном буфере (ФБ, рН 7,4), 10 мМ карбонатном буфере (КБ, рН 9,6) и 0,1 М водном растворе NaOH (рН 12,6). Растворы АНС и поликлональных антител готовили на 10 мМ ФБ (рН 7,4). Оптическая плотность суспензии боррелий до и после добавления зонда в области используемых длин волн возбуждения и испускания флуоресценции не превышала 0,1. Полученные значения сигнала флуоресценции выражали в относительных единицах (отн. ед.). Измерения выполняли на люминесцентном спектрофотометре СМ 2203 (ЗАО «Солар», Беларусь).

Результаты исследования и обсуждение. На рисунке 1 приведены спектры флуоресценции АНС в суспензии *Borrelia burgdorferi* при различных значениях рН. Спектры представляют

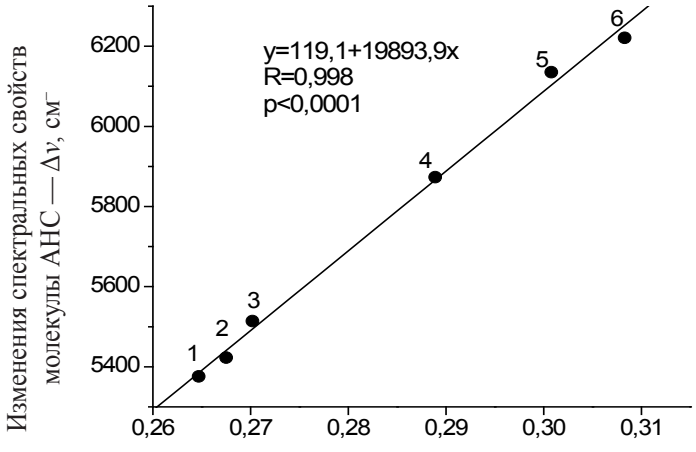
собой широкие бесструктурные полосы с размытыми максимумами свечения 497–500 нм (pH 7,4), 498–502 нм (pH 9,6), 513–516 нм (pH 12,6). Смещение максимума свечения зонда в длинноволновую область при увеличении pH сопровождалось снижением интенсивности флуоресценции. При изменении pH с 7,4 до 9,6 и 12,6 интенсивность свечения снижалась на 23 и 65% соответственно.



1 — фосфатный буфер (pH 7,4); 2 — карбонатный буфер (pH 9,6); 3 — 0,1 M NaOH (pH 12,6)

Рисунок 1 — Спектры испускания АНС (50 мкМ), связанного с *Borrelia burgdorferi*, при различных pH

Данные об изменении физических свойств окружения зонда, связанного с мембраной боррелий, при различных pH были получены нами в ходе эксперимента по изучению зависимости спектральных характеристик АНС от полярности среды. На рисунке 2 приведена зависимость $\Delta v = f(\Delta f)$ (зависимость Липперта), полученная для АНС в ограниченном интервале поляризуемости среды Δf (от 0,2647 для бутанола до 0,3083 для метанола). Видно, что зависимость Липперта носит линейный характер, следовательно, изменение спектральных характеристик АНС пропорционально изменению полярности окружения зонда. На основании полученного уравнения линейной регрессии (рисунок 2) и спектральных характеристик АНС можно рассчитать значения Δf для окружения зонда, связанного с мембранами боррелий. При pH 7,4 и 9,6 значение Δf составляет ~0,308, при pH 12,6 — 0,34, т.е. увеличение pH сопровождается увеличением полярности окружения зонда. Интересно отметить, что полярность окружения АНС в мембране боррелий (pH 7,4 и 9,6) равна таковой для АНС в метаноле (Δf – 0,308). Возможно, этот растворитель следует рассматривать как приближенную модель электронного окружения зонда, связанного с мембранами боррелий.



Измерения проводили в 100% бутаноле (1), 5% (2), 10% (3), 50% (4), 80% (5) растворах метанола в бутаноле, 100% метаноле (6)

Рисунок 2 — Зависимость Липперта, полученная для растворов АНС в ограниченном интервале изменений поляризуемости среды (от 0,2647 для бутанола до 0,3083 для метанола)

Максимум флуоресценции АНС в воде находится в области 515 нм, при снижении полярности растворителя максимум смещается в коротковолновую область. В бутаноле максимум свечения АНС локализован в области 477 нм, при связывании зонда с гидрофобными участками белка максимум флуоресценции может располагаться в диапазоне от 454 нм (апомиоглобин) до 519 нм (РНКаза) [3, 4]. При этом коротковолновой сдвиг максимума сопровождается увеличением квантового выхода флуоресценции. Так, в воде квантовый выход свечения АНС составляет 0,004, тогда как в бутаноле — 0,66 [3].

Поверхность мембраны граммотрицательных бактерий, в том числе и боррелий, при нормальных значениях pH несет суммарный отрицательный заряд, который зависит, главным образом, от остатков фосфорной кислоты фосфолипидов и боковых карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой аминокислот. При высоких значениях pH (>12) практически все ионогенные группы аминокислот и фосфолипидов депротонированы. В свою очередь, АНС помимо ароматической, гидрофобной части молекулы, несет также отрицательно заряженную сульфо-группу. Таким образом, можно ожидать, что связывание АНС с мембраной боррелий будет затруднено электростатическим отталкиванием одноименно заряженных молекул, возрастающим при увеличении pH. В работе [7] было показано, что флуоресценция и количество связавшегося АНС с белком, в частности с бычьим сывороточным альбумином, максимально при pH < 3 и резко снижается при pH > 11. Также было высказано предположение [5], что тушение флуоресценции АНС в полярном окружении вызвано облегченным переходом молекулы зонда из возбужденного синглетного в возбужденное триплетное состояние ($S^* \rightarrow T^*$). Свечение из T^* (фосфоресценция) практически полностью тушится при комнатной температуре.

Нами установлено, что при изменении pH с 7,4 до 9,6 сила связывания АНС с боррелиями практически не изменялась, тогда как при увеличении pH до 12,6 сила связывания снижалась (рост значения $K_{дисс}$ на ~32%). Показатель $F_{макс}$ отражает количество зонда, связавшегося с мембранами боррелий. Максимальное значение $F_{макс}$ наблюдали при pH 7,4, увеличение pH до 9,6 и 12,6 сопровождалось снижением $F_{макс}$ на 44 и 62% соответственно (таблица).

Расчет констант Штерна — Фольмера показал низкую эффективность тушения флуоресценции АНС поликлональными антителами к *Borrelia burgdorferi*. Однако при pH 7,4 *Ksv* выше в 4 раза, чем при pH 9,6 (таблица). Предположительно тушение носит статический характер и обусловлено образованием комплекса антиген — антитело, приводящего к изменению параметров окружения зонда. Низкая эффективность тушения, вероятно, обусловлена тем, что антигены, локализованные на мембране боррелий, экспонированы в растворитель, тогда как связывание АНС происходит в гидрофобных участках поверхности клетки.

Таблица — Параметры связывания АНС с *Borrelia burgdorferi* и константа тушения флуоресценции АНС поликлональными антителами при различных pH

	$K_{дисс}$, мкМ	$F_{макс}$, отн.ед.	*Ksv*, мкМ$^{-}$
ФБ, pH 7,4	21,6	1,59	0,02
КБ, pH 9,6	21,4	1,05	0,005
NaOH, pH 12,6	28,6	0,77	—

Примечания:

1. $K_{дисс}$ — равновесная константа диссоциации комплекса АНС — мембрана.
2. $F_{макс}$ — интенсивность флуоресценции АНС, соответствующая максимальному количеству связанного зонда.
3. *Ksv* — константа тушения Штерна —Фольмера.

Заключение. Показано, что при связывании с мембраной боррелий АНС находится в окружении с относительно высокой полярностью. Флуоресценция АНС при pH 12,6 обладает низкой интенсивностью и положением максимума, характерным для свечения АНС в воде. Увеличение pH приводит к снижению сродства АНС к мембране боррелий и уменьшению количества связавшегося зонда. Этот эффект, вероятно, вызван электростатическим отталкиванием отрицательно заряженной мембраны и SO_3^--группы зонда. Флуоресценцию АНС в метаноле можно рассматривать как модель физического окружения АНС, встроенного в мембрану боррелий при значениях pH, близких к 7,4. Связывание поликлональных антител с мембраной боррелий не вызывает значительного тушения флуоресценции зонда, вероятно, за счет пространственного разделения мест связывания зонда и антител на мембране.

Литература

1. Kennedy, C.A. Contribution of culture media and chemical properties of polystyrene tissue culture plates to biofilm development by Staphylococcus aureus / C.A. Kennedy, J.P. O'Gara // J. Med. Microbiol. — 2004. — Vol. 53. — P. 1171–1173.

2. Van Loosdrecht, M.C. Physical chemical description of bacterial adhesion / M.C. Van Loosdrecht, W. Norde, A.J. Zehnder // J. Biomater. — 1990. — Vol. 5. — P. 91–106.

3. Владимиров, Ю.А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю.А. Владимиров, Г.Е. Добрецов. — М.: Наука, 1980. — 320 с.

4. Cardamone, M. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins / M. Cardamone, N.K. Puri // Biochem. J. — 1992. — Vol. 282. — P. 589–593.

5. Уверский, В.Н. Флуоресценция АНС и влияние самоассоциации на спектральные свойства зонда / В.Н. Уверский // Цитология. — 1999. — № 2. — С. 173–182.

6. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. — М.: Мир, 1986. — 496 с.

7. Matulis, D. 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation / D. Matulis, R. Lovrien // Biophys. J. — 1998. — Vol. 74. — P. 422–429.

Поступила 20.07.2011

FLUORESCENCE OF 1-ANILINO-8-NAPHTHALENE SULFONATE BY BINDING OF *BORRELIA BURGDORFERI*

Tkachou S.V.[1], Buriak A.I.[2], Kniazeva O.R.[1], Vereshchacko N.S.[1], Ushkov A.A.[2], Vladyko A.S.[1]

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Republican Research & Practical Center for Hygiene, Minsk, Belarus

An effect of pH on a hydrophobicity of the binding sites of ANS to outer membrane of spirochete *Borrelia burgdorferi* (genospecies *Borrelia afzelii*, strain lp21) has been investigated. It was shown that in binding of ANS to the borrelia membrane it was surrounded by a relatively high polarity. The ANS fluorescence at pH 12,6 has a low intensity and position of the maximum characteristic of the ANS emission in water. The pH increasing reduces the ANS affinity to the borrelia membrane and reduces the number of bounded probe. Binding of polyclonal antibodies to the membrane of borrelia do not cause significant quenching of the ANS fluorescence.

Keywords: 1-anilino-8-naphthalene sulfonate, *Borrelia burgdorferi*, hydrophobicity, fluorescence.

БИОПОЛИМЕРЫ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*, ИЗБИРАТЕЛЬНО ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С АНТИ-ГЛИАДИНОВЫМИ АНТИТЕЛАМИ ЧЕЛОВЕКА: ОБНАРУЖЕНИЕ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЦЕЛИАКИИ

Киселева Е.П.[1], Михайлопуло К.И.[1], Рахуба Д.В.[2], Новик Г.И.[2]

[1]Институт биоорганической химии НАН Беларуси;
[2]Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Резюме. Известно, что антитела человека к белкам пшеницы — глиадинам — выполняют важную роль в патогенезе целиакии и являются серологическими маркерами данного заболевания. Методом иммуноферментного анализа впервые установлено, что бесклеточная фракция *P. fluorescens* БИМ В-582 содержит биополимеры, избирательно взаимодействующие с антителами человека к глиадинам и конкурирующие за связывание указанных антител с естественным антигеном. Данные свидетельствуют об иммунологическом сходстве биополимеров *P. fluorescens* БИМ В-582 и глиадинов и позволяют предположить возможную роль псевдомонад в патогенезе целиакии.

Ключевые слова: псевдомонады, глиадины, антитела человека, целиакия.

Введение. Псевдомонады (лат. *Pseudomonas*) — род грамотрицательных анаэробных неспорообразующих бактерий, широко распространенных в природе. В качестве условного патогена человека наиболее известна синегнойная палочка *P. aeruginosa* [1], в то время как родственный вид *P. fluorescens* обычно рассматривается в качестве возбудителя заболеваний рыб и фитопатогена [2]. Вместе с тем установлено, что в этиологической структуре внутрибольничных инфекций новорож-

денных увеличивается доля *P. fluorescens* [3]. Кроме того, *P. fluorescens* является возбудителем инфекций, развивающихся в результате переливания длительно хранившихся компонентов крови [4]. В пользу патогенности *P. fluorescens* свидетельствует также обнаружение эндотоксина, вызывающего апоптоз нейронов крыс [5].

В наших предыдущих исследованиях было показано, что грамположительные бактерии *Bifidobacterium bifidum* 791 и *Lactobacillus plantarum* B-01 содержат биополимеры, избирательно взаимодействующие с антителами человека к белкам злаков — глиадинам [6, 7]. Антитела указанной специфичности характерны для патогенеза целиакии и используются в качестве серологических маркеров данного аутоиммунного заболевания [8]. Обнаружение в составе бифидобактерий и лактобацилл биополимеров с указанными выше свойствами явилось основанием для предположения о возможной роли этих микроорганизмов в патогенезе целиакии [6, 7].

Цель работы — проверка наличия биополимеров, избирательно взаимодействующих с антителами к глиадинам, в составе клеток псевдомонад на примере *P. fluorescens* БИМ B-582 для выяснения возможной роли этих бактерий в патогенезе целиакии.

Материалы и методы. ***Клетки бактерий.*** *P. fluorescens* БИМ B-582 из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (Институт микробиологии НАН Беларуси, РБ) культивировали в жидкой среде на основе гидролизата кильки (состав на 1 л: панкреотический гидролизат кильки — 10,05 г (НПО «Микроген», Россия), NaCl — 4,95 г) в аэробных условиях при температуре 27 °С в течение 12–16 часов. В качестве положительного контроля использовали культуру третьей генерации *Bifidobacterium bifidum* 791, полученную в жидкой (0,1% агара) питательной среде MRS (ООО «Агат-Мед», Россия) при 37 °С в течение 24 часов.

Клетки бактерий каждого штамма отделяли от среды центрифугированием при 800 g в течение 20 мин. Промывали клетки трижды 0,01 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,5, содержащим 0,15 М NaCl (буфер 1). Клетки каждого штамма суспендировали в буфере 1 и использовали в тот же день для получения бесклеточной фракции.

Бесклеточная фракция. Клетки гомогенизировали вручную гомогенизатором («Wheaton», США) и обрабатывали ультразвуком с использованием диспергатора УЗДН-2Т («Укрросприбор», Украина) 6 раз по 30 сек при частоте 22 кГц. Фракцию клеточных стенок осаждали центрифугированием при 31 000 g в течение 30 мин. Бесклеточную фракцию (супернатант) использовали для иммуноферментного анализа (ИФА).

Глиадины получали из пшеничной муки экстракцией 70% этанолом и последующим осаждением ацетоном при 4 °С. Осадок отделяли центрифугированием при 3000 g, высушивали под вакуумом, промывали 10 % раствором NaCl, повторно отделяли центрифугированием и растворяли в 70 % этаноле. Концентрацию глиадинов определяли спектрофотометрически, используя $A_{280\text{ нм, }1\text{ см, }1\text{ мг/мл}} = 1$ [9].

ИФА. Использовали полистирольные планшеты «Greiner bio-one» (Германия). Глиадины и бесклеточные фракции *P. fluorescens* БИМ B-582 и *B. bifidum* 791 (контроль) иммобилизовали методом прямой адсорбции на пластике при 4 °С в течение ночи из расчета 0,1 мл на лунку. Перед иммобилизацией разводили бесклеточные фракции буфером 1 до получения растворов с поглощением при длине волны 260 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см (D_{260}), равным 0,2. Для иммобилизации глиадинов использовали раствор 0,01 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,5, содержащий 3% полиэтиленгликоль 600, с концентрацией белка 2 мг/л. После иммобилизации и каждой стадии анализа трижды промывали лунки буфером 1 из расчета 300 мкл на лунку.

В основном эксперименте использовали 16 образцов сыворотки крови больных целиакией, предоставленных сотрудниками кафедры гастроэнтерологии и нутрициологии БелМАПО МЗ РБ. Концентрации антител к глиадинам класса IgG в сыворотках предварительно определяли с использованием набора реагентов «Anti-gliadin (GAF-3X) IgG» («Euroimmun», Германия) и лабораторной тест-системы ИФА–анти–глиадин (IgG), разработанной в Институте биоорганической химии НАН Беларуси [9]. Каждый образец сыворотки разводили в 500 раз буферным раствором «ИФА-инкубационный буфер» («Хема», Россия). Равное количество каждого раствора вносили в 2 пробирки (серия 1 и серия 2). В каждую пробирку вносили то же количество 0,05 М аммоний-ацетатного буфера, pH 8,5, содержащего 5% полиэтиленгликоль 600 и 0,2% фенол. Далее в каждую пробирку серии 2 вносили раствор глиадинов в 70% этаноле (полученный как указано выше) до концентрации в конечном объеме 32 мг/л. В каждую пробирку серии 1 вносили тот же объем 70% этанола (контроль).

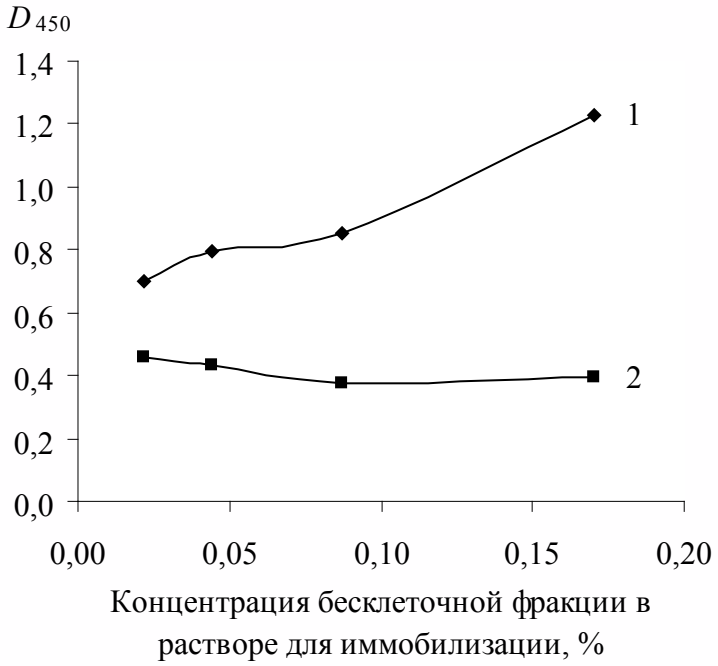
Концентрация этанола во всех пробирках составляла 1,8%. Пробирки выдерживали при 37 °С в течение 1 ч. По 100 мкл содержимого каждой пробирки вносили в соответствующие пары лунок планшетов с иммобилизованными глиадинами (планшеты Г1 и Г2 для пробирок серии 1 и 2 соответственно), бесклеточными фракциями *P. fluorescens* БИМ В-582 (планшеты П1 и П2) и *B. bifidum* 791 (планшеты Б1 и Б2). Инкубировали при 37 °С в течение 1 ч, удаляли содержимое планшетов и промывали лунки как указано выше. На второй стадии ИФА выявляли Ig, связавшиеся с иммобилизованными бесклеточными фракциями и глиадинами, с использованием конъюгата моноклональных антител мыши против IgG человека с пероксидазой из корней хрена («Хема», РФ) в предварительно подобранном разведении. Инициировали и останавливали ферментативную реакцию как указано в наших предыдущих работах [6, 7]. Измеряли оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм (D_{450}) с использованием многоканального иммуноферментного анализатора «АИФ М/340» (Беларусь). Рассчитывали коэффициенты корреляции средних значений D_{450} в парах лунок (дубликатах) для планшетов П1 и Г1, Б1 и Г1, П2 и Г2, Б2 и Г2.

В остальных экспериментах использовали пуловые сыворотки крови семи здоровых доноров (образец № 1) или семи больных целиакией (образец № 2) с предварительно установленными концентрациями IgG к глиадинам. Сыворотки разводили в необходимое число раз раствором «ИФА-инкубационный буфер» («Хема», РФ), вносили в лунки планшетов с иммобилизованной бесклеточной фракцией *P. fluorescens* БИМ В-582, инкубировали и завершали анализ как указано выше.

Результаты и обсуждение. В исследовании использовали штамм *P. fluorescens* БИМ В-582 из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Выбор указанного штамма в качества объекта исследований обусловлен его использованием в технологиях производства средств защиты растений. Штамм *P. fluorescens* БИМ В-582 является хозяином 24 штаммов бактериофагов, способных поражать фитопатогенные бактерии *P. syringes*, *P. fluorescens* и *P. putida*. Некоторые из фагов являются основой препарата «Пентафаг», используемого в сельском хозяйстве для профилактики заболеваний плодовых и овощных культур, а штамм *P. fluorescens* БИМ В-582 является неотъемлемой частью технологического процесса производства препарата.

В исследовании использовали бесклеточную фракцию *P. fluorescens* БИМ В-582, полученную в результате разрушения клеток бактерий ультразвуком и отделения фрагментов клеточных стенок и других органелл центрифугированием. Данная фракция представляет собой совокупность цитоплазмы и слабо ассоциированных с поверхностью клеток молекул, переходящих в раствор при разрушении клеток. Выбор фракции обусловлен использованием в наших предыдущих публикациях [6, 7] аналогичной фракции других микроорганизмов в качестве источника биополимеров, избирательно взаимодействующих с антителами IgG человека к глиадинам.

Исследование проводили методом твердофазного ИФА. Для оценки количества бесклеточной фракции, используемой в ИФА, применяли показатель D_{260}, отражающий содержание нуклеиновых кислот [7]. В настоящем исследовании для выбора оптимального количества бесклеточной фракции *P. fluorescens* БИМ В-582 на твердой фазе иммобилизовали данную фракцию из растворов со значениями D_{260}, равными 0,006–0,05. Исследовали взаимодействие бесклеточной фракции с IgG человека, находящимися в составе образцов 1 и 2. Каждый из указанных образцов получали в результате смешивания равных объемов образцов сыворотки крови семи здоровых доноров (образец 1) или семи больных целиакией (образец 2). Содержание антител к глиадинам класса IgG в образцах 1 и 2 устанавливали предварительно с использованием набора реагентов «Anti-gliadin (GAF-3X) IgG» («Euroimmun», Германия). Полученные значения составляли 3 МЕ/мл и 65 МЕ/мл для образцов 1 и 2 соответственно и совпадали с показателями, полученными при ИФА с использованием тест-системы для количественного определения указанных антител, разработанной в Институте биоорганической химии НАН Беларуси [9]. Компоненты этой тест-системы (планшет с иммобилизованными глиадинами и конъюгат моноклональных антител мыши против IgG человека с пероксидазой из корней хрена, позволяющий селективно выявлять IgG человека) использовали в этом и всех последующих экспериментах. Результаты исследования взаимодействия бесклеточной фракции с IgG человека, находящимися в составе образцов 1 и 2, представлены на рисунке 1.



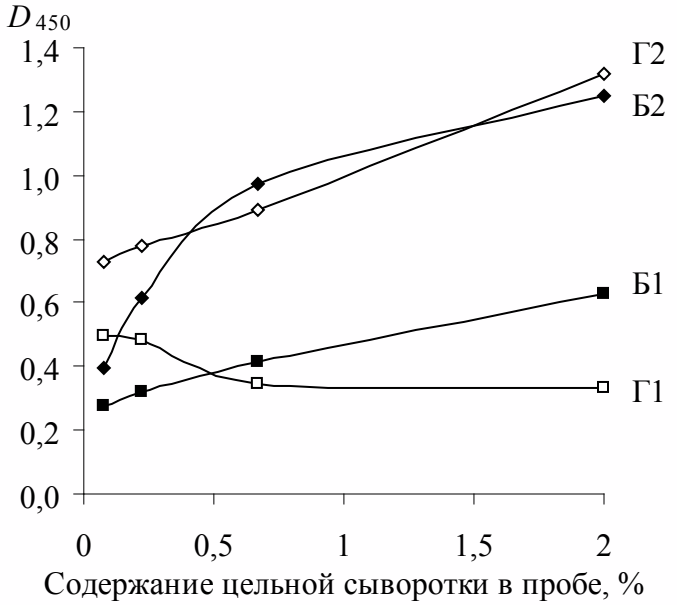
Образцы 1 и 2 были получены в результате смешивания равных объемов проб сыворотки крови семи здоровых доноров и семи больных целиакией и содержали 3 и 65 МЕ/мл анти-глиадиновых IgG соответственно

Рисунок 1 — Зависимость связывания IgG человека, находящихся в составе образцов 1 и 2, с иммобилизованной бесклеточной фракцией *P. fluorescens* БИМ В-582 от концентрации последней в растворе для иммобилизации на твердой фазе

Данные рисунка 1 свидетельствуют о том, что связывание IgG образца 2 существенно выше, чем связывание IgG образца 1. Кроме того, только IgG образца 2 связываются с бесклеточной фракцией в зависимости от концентрации последней в растворе для иммобилизации. Следует отметить, что способ получения двух образцов позволяет нивелировать их различия по химическому составу, присущие пробам сыворотки крови отдельных лиц и обусловленные их спектром питания, приемом лекарственных препаратов и т.д. Кроме того, способ получения двух образцов позволяет уравнять их по концентрации общих Ig, находящихся в сыворотке крови человека в норме в диапазоне 7–16 г/л [10]. Образцы 1 и 2 имеют двадцатикратно различающиеся концентрации антител IgG к глиадинам, и можно предполагать, что именно это различие является причиной представленной на рисунке 1 разницы во взаимодействии бесклеточной фракции *P. fluorescens* БИМ В-582 с указанными образцами. Таким образом, данные рисунка 1 свидетельствуют о том, что бесклеточная фракция исследуемого штамма способна отличать антитела к глиадинам от антител другой специфичности, а увеличение концентрации бесклеточной фракции в растворе для иммобилизации делает различия образцов сыворотки крови здоровых доноров и больных целиакией более выраженными.

Далее бесклеточную фракцию *P. fluorescens* БИМ В-582 иммобилизовали из раствора с D_{260}, равным 0,2, и исследовали связывание данной фракции с IgG, находящимися в составе тех же образцов, в зависимости от разведения последних. В качестве положительного контроля использовали планшет с иммобилизованными глиадинами. Данные рисунка 2 свидетельствуют о том, что как глиадины, так и бесклеточная фракция исследуемого штамма демонстрируют выраженную зависимость связывания IgG, находящихся в составе образца 2, от степени его разведения. Следует отметить, что в данном эксперименте концентрация бесклеточной фракции псевдомонад в растворе для иммобилизации в 4 раза превосходила максимальную из концентраций, используемых в предыдущем эксперименте. Вероятно, это является причиной того, что бесклеточная фракция, содержащая помимо биополимера, способного к избирательному взаимодействию с антителами к глиадинам, множество других химических соединений, все-таки демонстрирует, в отличие от глиадинов, концентрационную зависимость связывания IgG образца 1, хотя и выраженную в существенно

меньшей степени, чем концентрационная зависимость связывания IgG образца 2. Таким образом, данные, представленные на рисунке 2, являются дополнительным аргументом в пользу заключения о способности бесклеточной фракции *P. fluorescens* БИМ В-582 отличать антитела к глиадинам от антител другой специфичности.



Образцы 1 и 2 были получены в результате смешивания равных объемов проб сыворотки крови семи здоровых доноров и семи больных целиакией и содержали 3 и 65 МЕ/мл анти-глиадиновых IgG соответственно

Рисунок 2 — Концентрационная зависимость связывания Ig человека, находящихся в составе образцов 1 и 2, с иммобилизованными бесклеточной фракцией *P. fluorescens* БИМ В-582 (Б) и глиадинами (Г)

В заключительном эксперименте исследовали связывание 16 образцов сыворотки крови человека, содержащих антитела IgG к глиадинам в концентрациях 7–85 МЕ/мл, с бесклеточной фракцией псевдомонад (планшет П) и глиадинами (планшет Г). В качестве положительного контроля использовали бесклеточную фракцию *B. bifidum* 791 (планшет Б), для которой наличее биополимеров, избирательно взаимодействующих с антителами к глиадинам, было доказано ранее [6]. По результатам ИФА для пар планшетов П и Г, а также планшетов Б и Г рассчитывали коэффициенты корреляции значений D_{450}, являющихся показателем количества IgG, связавшихся с иммобилизованными препаратами в ходе ИФА. Рассчитанные значения коэффицентов корреляции соответствуют 0,93 и 0,95 для пар планшетов П-Г и пар планшетов Б-Г соответственно. Таким образом, бесклеточная фракция псевдомонад связывает анти-глиадиновые IgG в зависимости от их концентрации подобно тому, как это делает естественный антиген и бесклеточная фракция бифидобактерий, содержащая биополимеры, избирательно взаимодействующие с антителами к глиадинам [6].

В этом же эксперименте использовали вторые серии лунок планшетов П, Б и Г, содержащих в ходе анализа помимо упоминавшихся выше 16 образцов сыворотки крови человека 32 мг/л растворенных глиадинов. Данные представлены на рисунке 3.

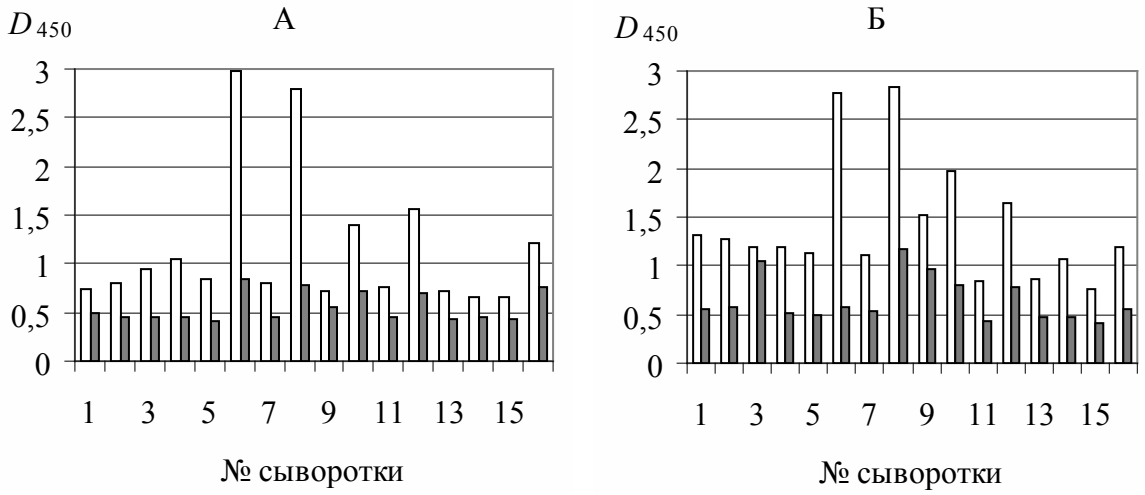


Рисунок 3 — Связывание IgG образцов сыворотки крови человека (n = 16) с иммобилизованной бесклеточной фракцией *P. fluorescens* БИМ В-582 (А) и глиадинами (Б) в отсутствие и в присутствии 32 мг/л глиадинов в растворе (светлые и темные столбцы соответственно)

Результаты ИФА, представленные на рисунке 3, свидетельствуют о том, что находящиеся в растворе глиадины существенно снижают связывание специфических антител как с иммобилизованными глиадинами, так и с иммобилизованной бесклеточной фракцией псевдомонад. Наблюдаемый эффект объясняется конкуренцией иммобилизованных соединений с растворенными глиадинами за связывание анти-глиадиновых антител.

Далее по результатам ИФА для каждого планшета (П, Б и Г) и каждой сыворотки рассчитывали показатели B/Bo, %, где Bo и B — средние значения D_{450} для пар лунок, содержащих данную сыворотку в отсутствие и в присутствии глиадинов в растворе соответственно, и определяли корреляцию значений B/Bo, %, для пар планшетов П и Г, а также планшетов Б и Г. Рассчитанные значения коэффицентов корреляции являются значимыми и равны 0,70 и 0,71 для пар планшетов П-Г и Б-Г соответственно.

Заключение. Известно, что антитела к глиадинам являются серологическими маркерами целиакии и принимают непосредственное участие в механизмах патогенеза указанного заболевания [8]. Впервые обнаружен эффект избирательного взаимодействия биополимера (биополимеров) бесклеточной фракции *P. fluorescens* БИМ В-582 с анти-глиадиновыми антителами и конкуренция этого биополимера с естественным антигеном за связывание указанных антител. Данные свидетельствуют об иммунологическом сходстве биополимера псевдомонад и глиадинов и позволяют предположить возможную роль этих микроорганизмов в патогенезе целиакии. Для уточнения этой роли необходимо выяснение химической природы и структуры биополимера, ответственного за наблюдаемый эффект. Не исключено, что биополимер псевдомонад способен провоцировать обострение целиакии у лиц, соблюдающих безглютеновую диету, которая является единственным известным способом лечения целиакии [8].

Литература

1. Van Eldere, J. Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections / J. Van Eldere // J. Antimicrob. Chemother. — 2003. — Vol. 51, № 2. — P. 347–352.

2. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin / C.L. Brodey [et al.] // Mol. Plant Microbe Interact. — 1991. — Vol. 1. — P. 407–411.

3. Абаев, Ю.К. Внутрибольничная инфекция в неонатологии / Ю.К. Абаев // Мед. новости. — 2006. — № 11. — С. 37–43.

4. Multistate outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy / M.D. Gershman [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2008. — Vol. 47. — P. 1372–1379.

5. Cytotoxic effects of the lipopolysaccharide from *Pseudomonas fluorescens* on neurons and glial cells / L. Picot [et al.] // Microb. Pathogenesis. — 2003. — Vol. 35, № 3. — P. 95–106.

6. A novel biopolymer from *Bifidobacterium bifidum* 791, cross-reacting with pathological human antibodies to gliadins / K.I. Mikhailopulo [et al.] // Sepsis. — 2011. — Vol. 4, № 1. — P. 63–71.

7. Биополимеры клеток *L. plantarum*, избирательно взаимодействующие с антителами человека к глиадинам: обнаружение, выделение, возможная роль в патогенезе целиакии / Е.П. Киселева, К.И. Михайлопуло, А.В. Ижик, Г.И. Новик // Экология человека в постчернобыльский период: материалы VII междунар. науч.-практ. конф., Минск, 25–27 ноября 2009 г. — Экологическая антропология. — 2010. — С. 109–113.

8. Alaedini, A. Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder / A. Alaedini, P.H.R. Green // Ann. Intern. Med. — 2005. — Vol. 142, № 4. — P. 289–298.

9. Иммуноферментная система для определения антител к глиадинам: биохимические характеристики и аналитические параметры / К.И. Михайлопуло [и др.] // Изв. НАН Беларуси. Сер. хим. наук. — 2003. — № 1. — С. 61–67.

10. Shakib, F. Human IgG subclasses in health and disease (a review) / F. Shakib, D.R. Stanworth // Ric. Clin. Lab. — 1980. — Vol. 10. — P. 561–580.

Поступила 25.07.2011

PSEUDOMONAS FLUORESCENS BIOPOLYMERS, SELECTIVELY INTERACTING WITH ANTI-GLIADINS HUMAN ANTIBODIES: DETECTION AND POSSIBLE ROLE IN THE CELIAC DISEASE PATHOGENESIS

Kiseleva E.P.[1], Mikhailopulo K.I.[1], Rakhuba D.V.[2], Novik G.I.[2]

[1]Institute of Bioorganic Chemistry;
[2]Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

It is known that human antibodies to wheat gliadins play an important role in the celiac disease pathogenesis and are serological markers of the disease. The *P. fluorescens* BIM B-582 cellular-free fraction contains biopolymers, selectively interacting with human anti-gliadins antibodies and competing with the natural antigen for the binding of these antibodies in ELISA. The data suggests the immunologic similarity of the bacterial biopolymers and gliadins and point to a possible role of pseudomonads in the celiac disease pathogenesis.

Keywords: Pseudomonas, gliadins, human antibodies, celiac disease.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СУББИОЦИДНЫХ ДОЗ ПОЛИГУАНИДИНА НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КОЛОНИЙ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Гаврилова И.А.[1,2], Титов Л.П.[1]

[1]РНПЦ микробиологии и эпидемиологии;
[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Резюме. В представленной работе оценивали изменения бактериальных клеток и колоний бактерий, а также чувствительность к дезинфицирующим средствам в серии пассажей с воздействием суббиоцидных концентраций дезинфектанта из группы гуанидинов. Выявлена вариабельность бактерий как на уровне отдельных клеток, так и на уровне бактериальной популяции. В результате воздействия стрессовых факторов (дезинфектанта) клетки округляются, становятся меньше по размеру, преобладают подвижные формы бактерий; наблюдается атипичное деление. Колонии становятся меньше по размеру, наблюдается слизеобразование. Представленные данные позволят расширить знания о закономерностях адаптации микроорганизмов в условиях стационара.

Ключевые слова: синегнойная палочка, резистентность к дезинфектантам, адаптация микроорганизмов, атомно-силовая микроскопия.

Введение. Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) — неферментирующая грамотрицательная палочковидная бактерия. Широко распространена в природе: встречается в почве, в воде, на растениях, в желудочно-кишечном тракте человека и животных. Может встречаться как в биопленке, прикрепленной к какой-либо поверхности или субстанции (фиксированная форма существования), так и в планктонной форме (подвижная форма), т.е. в виде отдельной бактерии, передвигающейся с помощью своего полярного жгутика. Способна не только длительное время сохраняться в окружающей среде (влажной атмосфере или воде), но и успешно размножаться.

Синегнойная палочка является условно патогенным для человека микроорганизмом, основное медицинское значение которого заключается в его способности вызывать различные гнойно-септические инфекции у пациентов стационаров, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Начиная с 70-х гг. XX века *P. aeruginosa* — один из доминирующих возбудителей внутри-

больничных инфекций в мире. Это связано с наличием у *P. aeruginosa* многочисленных факторов вирулентности и самыми различными механизмами устойчивости, что и обуславливает потенциальную опасность и тяжесть инфекций, вызываемых данной бактерией [1]. Особенную опасность представляют так называемые госпитальные штаммы условно-патогенных микроорганизмов.

Доказано, что госпитальные штаммы многих видов микроорганизмов, в том числе и синегнойной палочки, могут формироваться вследствие селективного пресса антибактериальных препаратов, применяемых в клинических условиях, или переноса некоторых внехромосомных факторов наследственности [2–4].

Подобный механизм формирования госпитальных штаммов соответствует имеющимся сведениям о *P. aeruginosa* как о микроорганизме, способном легко воспринимать, эффективно экспрессировать гетерологичные гены и осуществлять их разнообразную реаранжировку [5].

Без понимания закономерностей формирования резистентных штаммов микроорганизмов невозможны поиск и разработка новых эффективных противомикробных средств. В связи с этим представляет интерес характер изменений бактерий под воздействием субингибиторных концентраций дезинфицирующих средств как на уровне отдельных клеток, так и на популяционном уровне.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является перспективным методом, позволяющим исследовать особенности реальной структуры поверхности живых бактерий. Поскольку АСМ позволяет не только получать трехмерные изображения исследуемых объектов с высоким пространственным разрешением, но и оказывать на них локальное механическое воздействие, спектр приложений этого метода непрерывно расширяется.

В представленной работе оценивали изменения бактериальных клеток и колоний бактерий, а также чувствительность к дезинфицирующим средствам в серии пассажей с воздействием суббиоцидных концентраций дезинфектанта из группы гуанидинов.

Цель работы: изучить морфометрические показатели бактериальных клеток и колоний *P. aeruginosa* при воздействии субингибиторных концентраций дезинфектанта на основе полигексаметиленгуанидина.

Материалы и методы. Объектом исследования явились штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные из внешней среды стационара хирургического профиля, чувствительные к большинству широко используемых дезинфектантов. Чувствительность бактерий к дезинфектантам определялась суспензионным методом с нейтрализацией дезинфектанта и последующим высевом на плотные питательные среды. При каждом пассировании проводилось воздействие дезинфектантом из группы гуанидинов (активно действующее вещество полигексаметиленгуанидина гидрохлорид) в суббиоцидных концентрациях. Диапазон концентраций биоцида от $^1/_{32}$ до ½ рабочей концентрации препарата, экспозиция 30 мин. После экспозиции дезинфектант нейтрализовали и проводили высев из нейтрализатора на чашки с питательной средой. Учет результатов проводился на вторые сутки. Оценивались характер роста и внешний вид колоний. Фотографии колоний получены с помощью микроскопа Leica Microsystems (увеличение x4).

Для повторных пассажей отбирались колонии, выросшие после воздействия дезинфицирующего средства в максимальной концентрации. После каждого пятого пассажа культуру и исходную культуру замораживали в консерванте при –70 °С. Проведен 21 пассаж.

Из исходного и полученного в результате селекции штаммов готовили образцы для атомно-силовой микроскопии. Бактерии переносили с поверхности агаризованной питательной среды в дистиллированную воду. Концентрацию бактерий в суспензии определяли по оптическому стандарту мутности, она составляла 10^9/мл. На поверхность подложки из монокристаллического кремния, модифицированного полиэлектролитом наносили каплю бактериальной взвеси, инкубировали в закрытых чашках Петри при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем многократно отмывали подложку с бактериями дистиллированной водой. Атомно-силовую микроскопию проводили после естественного высыхания образцов на воздухе на микроскопе Veeco («Nanoscope 3D», США) в контактном режиме. Использовались контактные кантилеверы CSC38 (константы жесткости 0,36 Н/м). Анализ изображений проведен при помощи программного обеспечения «NanoScope (R) III (version 5.31R1)».

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием пакета программ STATISTICA 6.1 и GraphPad Prism 5. Вычисляли средние арифметические значения, ошибки средних величин и доверительные интервалы. Достоверность различий между статистическими параметрами определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. После первых двух пассажей рост микроорганизмов был обнаружен только при воздействии дезинфектанта в разведении $^{1}/_{16}$–$^{1}/_{32}$ рабочей концентрации. В результате пассирования нарастали показатели устойчивости бактерий к концентрации дезинфицирующего средства.

После 21-го пассажа исходный микроорганизм стал резистентным к минимальной рабочей концентрации дезинфицирующего средства при рекомендуемой экспозиции.

После четвертого пассажа отмечалось уменьшение размеров колоний. Внешне колонии стали более слизистыми. После десятого пассажа отмечался полиморфизм колоний по размеру. При сравнении колоний исходного и полученного в результате селекции штаммов наблюдалось заметное уменьшение размеров колоний, колонии стали более влажными, слизистыми и блестящими, форма колоний и их цвет не изменились (рисунок 1).

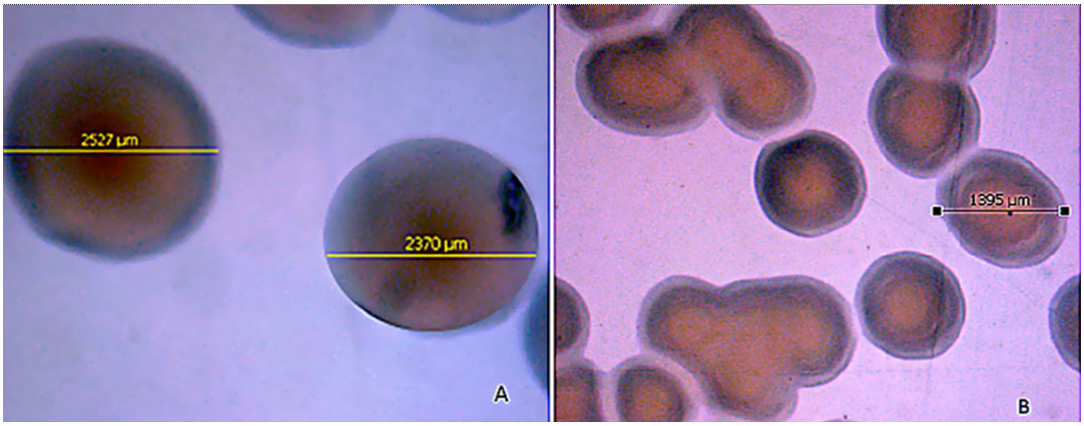
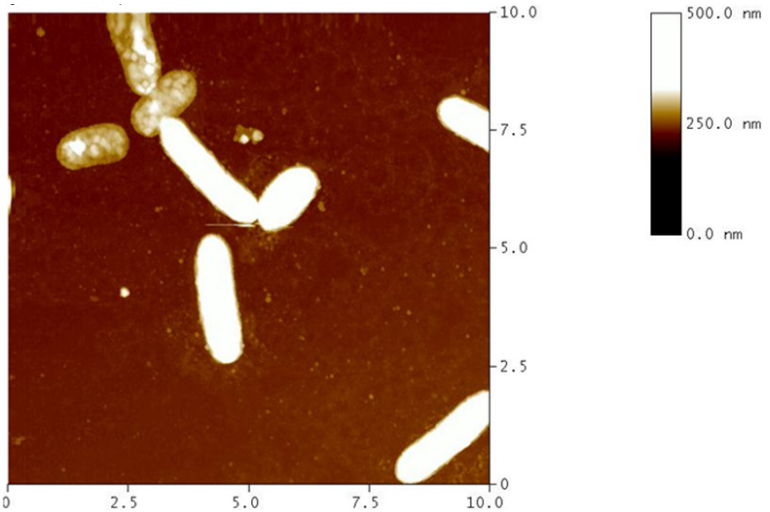


Рисунок 1 — Внешний вид колоний исходного (А) и полученного в результате селекции (В) штамма *P. aeruginosa* (увеличение х4)

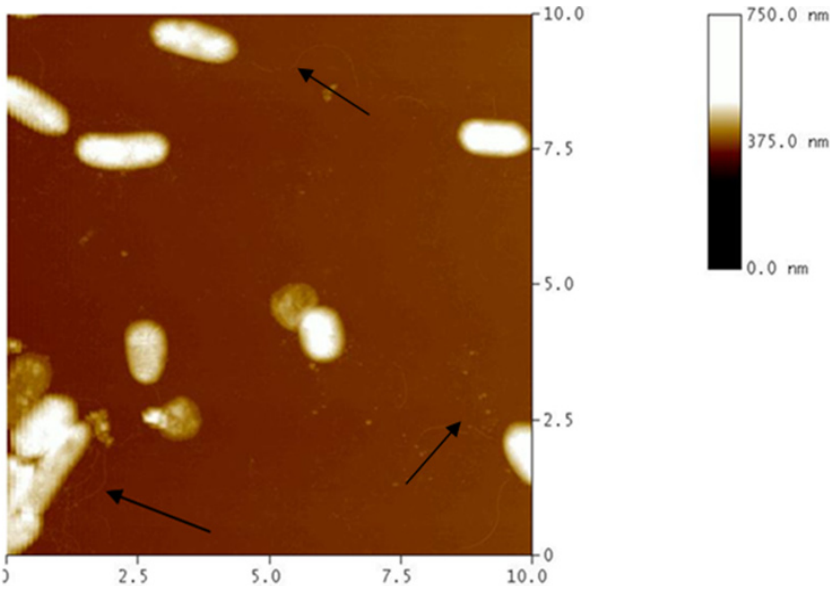
Изменение морфологии колоний подтверждает известный факт, что для синегнойной палочки свойственна выраженная диссоциативная изменчивость, которая помогает адаптироваться микроорганизму к меняющимся условиям среды обитания. Полагают, что возникновение мукоидных штаммов является следствием преимущественной селекции из гетерогенной популяции вариантов бактерий, способных к экспрессии синтеза внеклеточного альгината, который является важным фактором патогенности, участвуя в колонизации микроорганизмами различных биотопов человека [5].

Изучение бактериальной популяции методом атомно-силовой микроскопии показало наличие различий в морфологии клеток чувствительного исходного микроорганизма и микроба, полученного в результате селекции с использованием суббиоцидных концентраций дезинфектанта (рисунки 2, 3).



Клетки бактериальной популяции вытянутые, палочковидные. Жгутики не определяются. Размер скана 10×10 мкм

Рисунок 2 — АСМ-фотографии исходного штамма *P. aeruginosa*



Клетки бактериальной популяции полиморфны: палочковидные и округлые, определяются жгутики (указаны стрелками). Размер скана 10×10 мкм

Рисунок 3 — АСМ-фотографии исходного штамма *P. aeruginosa*, полученного в результате пассирования с воздействием суббактерицидных концентраций

При анализе АСМ-фотографий исходной и полученной бактериальных популяций, обращает на себя внимание преобладание в измененной при пассировании популяции бактериальных клеток, имеющих жгутики. Напротив, в исходной популяции у большинства клеток жгутики не определяются (рисунки 2, 3).

Подвижность играет важную роль в процессах колонизации, образования биопленок, в процессах адаптации бактериальной клетки к условиям внешней среды, и, как следствие, оказывает влияние на вирулентность патогенных штаммов. Для выживания бактерии обладают способностью к быстрой адаптации в изменяющихся условиях. Механизмы этого процесса основаны на существовании многочисленных регуляторных сетей, которые дают возможность координированной регуляции экспрессии генов в ответ на сигналы окружающей среды.

Одним из примеров такой сложной регуляторной сети является система, ответственная за биосинтез и сборку жгутика. Эта система представляет собой сложную и жесткую иерархическую структуру, которая требует согласованной работы приблизительно 50 генов, кодирующих структурные субъединицы, генов-операторов и генов-регуляторов. Кроме этого, в работе регуляторного каскада системы подвижности принимают участие моторные и хемотактические белки передачи сигнала. Таким образом, опероны жгутиковой системы организованы в иерархическом порядке в так называемый регулон, в котором экспрессия оперонов на данном уровне зависит от экспрессии оперонов вышестоящего уровня. Такая схема контроля позволяет координировать экспрессию генов со сборкой органеллы. В регуляции экспрессии участвуют также альтернативные сигма-факторы (σ-факторы) [6]. Они являются обязательным компонентом РНК-полимеразы — ключевого фермента транскрипции. Бактерии используют альтернативные σ-факторы, чтобы отрегулировать широкий диапазон физиологических процессов. Функциональные роли для альтернативных σ-факторов могут быть строго определенными (экспрессия генов споруляции) или разнообразными (регуляция ответа на стресс). У патогенных бактерий альтернативные σ-факторы часто оказывают влияние на вирулентность, в том числе на экспрессию генов системы подвижности бактериальной клетки (σ^{28}, σ^{54} (*rpoN*) и σ^{70} — факторы синегнойной палочки). Альтернативный σ^{54}-фактор *P. aeruginosa* участвует в транскрипции генов с различными физиологическими функциями: гены системы жгутиков, гены пилинов, а также гены секреции мукоида (альгината). Транскрипционная активность σ^{54}-активаторов часто модулируется в ответ на изменения условий окружающей среды. *RpoN*-мутантные штаммы синегнойной палочки не образуют флагеллин и пилин (характеризуются снижением адгезии и неподвижностью) и демонстрируют сниженную вирулентность в многочисленных моделях инфекции [7]. Кроме того, мутации в гене *rpoN,* по-видимому, способствуют чрезмерной продукции альгината (*rpoN*-зависимый путь гиперсекреции альгината) [6].

Размер клеток (рисунок 4) исходного штамма колебался от 1,12 до 3,1 мкм и составил в среднем 1,84–2,01 ($p \leq 0,05$). Размер бактерий полученного штамма колебался от 0,78 до 2,34 мкм ($p \leq 0,05$). Средний размер бактерий составил 1,46–1,59 мкм.

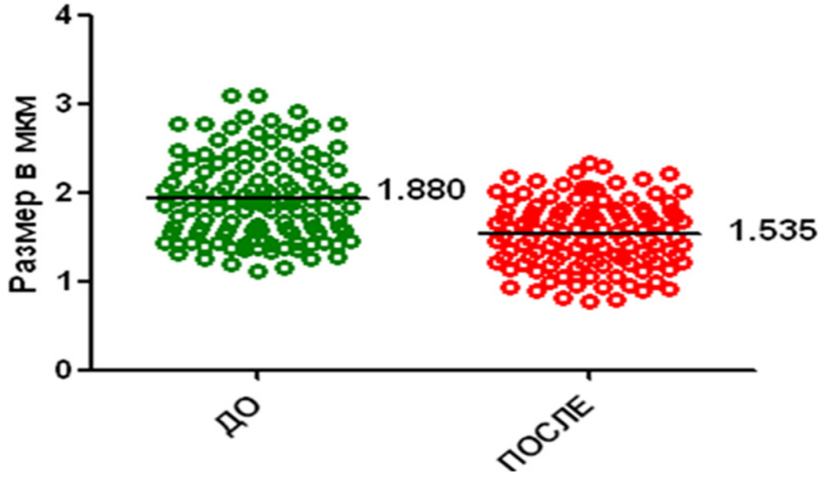
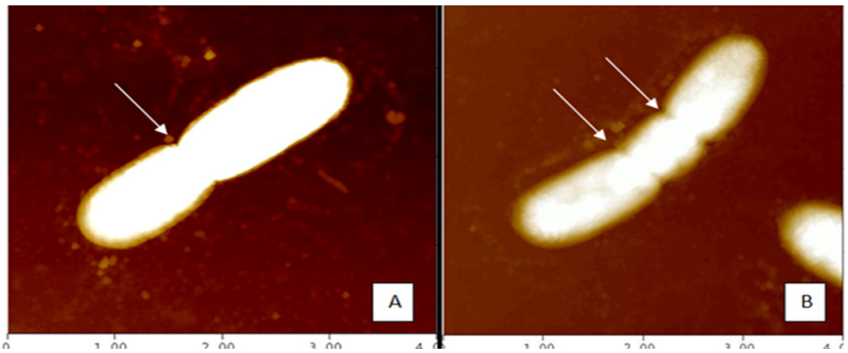


Рисунок 4 — Размеры бактерий исходного штамма и штамма, полученного после серии пассажей

Следует также упомянуть, что на АСМ-фотографиях, сделанных после десятого пассажа, было отмечено атипичное деление бактериальной клетки синегнойной палочки с образованием впячиваний цитоплазматической мембраны в двух местах (рисунок 5).



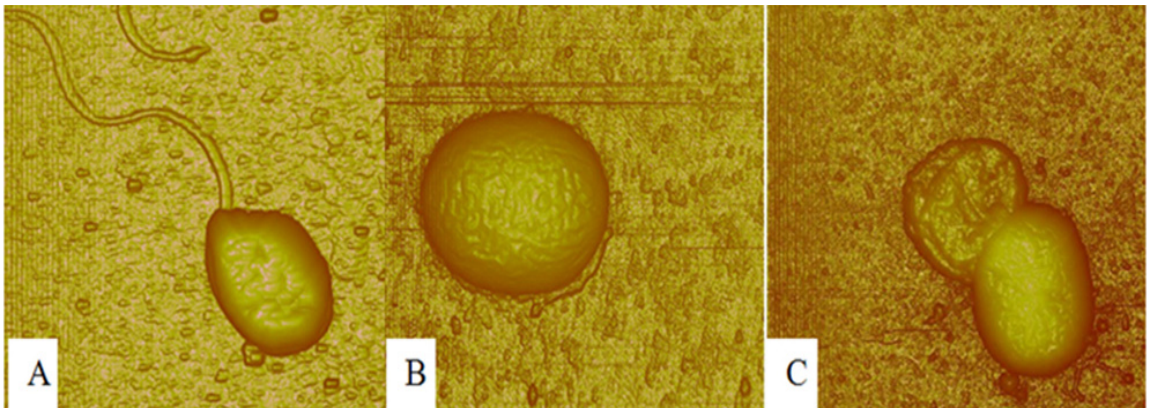
A — бинарное деление; B — деление с образованием двух клеточных перегородок (культура после десятикратного воздействия суббактерицидных концентраций биоцида). Размер скана 4×4 мкм

Рисунок 5 — АСМ-фотографии делящихся бактерий *P. aeruginosa*

Как известно, бесполое размножение бактерий осуществляется путем бинарного деления, которому предшествует репликация ДНК. Удвоение начинается с определенного участка этой молекулы, так называемой точки инициации. Фермент ДНК-полимераза на каждой из них достраивает комплементарную полинуклеотидную цепь. Таким образом, возникают две молекулы ДНК, каждая из которых содержит одну «старую» и одну вновь синтезированную цепь. Завершение репликации служит сигналом для начала формирования перегородки между дочерними клетками. При этом клеточная мембрана как бы «врастает» между образовавшимися молекулами ДНК, разделяя их. Одновременно с ростом клеточной перегородки идет процесс ее расслаивания в центре, что обеспечивает каждую дочернюю клетку новой оболочкой. Возможно, что при воздействии стрессирующих факторов имеет место нарушение деления с образованием округлых покоящихся или некультивируемых форм.

Известно, что логарифмические культуры некоторых штаммов *E. coli* состоят исключительно из палочек, тогда как в стационаре они превращаются в сферические округлые клетки. В этом процессе активное участие принимает морфоген *bolA*, который задействован в реакциях адаптации к условиям стационарной фазы [8]. Хорошо известно, что клетки из стационарной фазы обычно более устойчивы, чем клетки из логарифмической фазы. Например, клетки некоторых микроорганизмов

приобретали в стационаре устойчивость к различным летальным стрессам, в частности к осмотическому и окислительному стрессам [9]. По-видимому, в случае с синегнойной палочкой имеет место схожий механизм адаптации, что доказывается наличием зрелых округлых бактериальных клеток, в том числе и в стадии деления (рисунок 6).



A (скан 4×4 мкм) — планктонная форма; B (скан 3×3 мкм) — фиксированная форма;
C (скан 3×3 мкм) — деление бактерии
Рисунок 6 — округлые клетки *P. aeruginosa*

Заключение. Проведено изучение морфометрических показателей бактериальных клеток и морфологии колоний *Pseudomonas aeruginosa* при воздействии субингибиторных концентраций дезинфектанта на основе полигексаметиленгуанидина.

Установлено, что суббиоцидные концентрации дезинфицирующих средств способствуют выживанию отдельных устойчивых клеток бактерий. При длительных воздействиях на микроорганизм субоптимальных концентраций дезинфектанта происходит формирование резистентности бактерий к данному дезинфектанту.

При формировании устойчивости к дезинфектанту отмечаются изменения культуральных свойств микроба (уменьшение размеров колоний, слизеобразование).

Атомно-силовая микроскопия бактериальных клеток показывает наличие фенотипических различий между чувствительными и резистентными к дезинфектантам микрорганизмами. Имеется вариабельность в морфологии и структурной организации бактериальных клеток. В результате воздействия стрессовых факторов (дезинфектанта) клетки округляются, становятся меньше по размеру, преобладают подвижные формы бактерий; наблюдается атипичное деление.

Литература

1. Руднов, В.А. Антибиотикотерапия госпитальных инфекций, вызванных *P. aeruginosa* / В.А. Руднов // Рус. мед. журн. — 2005. — Т. 13, № 7. — С. 3–6.

2. Subinhibitory concentrations of the cationic antimicrobial peptide colistin induce the pseudomonas quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* / J. Cummins [et al.] // Microbiology. — 2009. — Vol. 155, Pt. 9. — P. 2826–2837.

3. Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter species* in the presence of organic material / K. Kawamura-Sato [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. — 2008. — Vol. 61, N 3. — P. 568–576.

4. Russell, A.D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon / A.D. Russell // J. Hosp. Infect. — 2004. — Vol. 57, N 2. — P. 97–104.

5. Беляков, В.Д. Псевдомонады и псевдомонозы / В.Д. Беляков, Л.А. Ряпис, В.И. Илюхин. — М.: Медицина, 1990. — 224 с.

6. Tart, A.H. The alternative sigma factor algT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of fleQ / A.H. Tart, M.C. Wolfgang, D.J. Wozniak // J. Bacteriol. — 2005. — Vol. 187. — P. 7955–7962.

7. Kazmierczak, M.J. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence / M.J. Kazmierczak, M. Wiedmann, K.J. Boor // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2005. — Vol. 69. — P. 527–543.

8. Lange, R. Growth phase-regulated expression of bolA and morphology of stationary phase *Escherichia coli* cells is controlled by the novel sigma factor σS (rpoS) / R. Lange, R. Hengge-Aronis // J. Bacteriol. — 1991. — Vol. 173. — P. 4474–4481.

9. Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase / M.J. Smeulders [et al.] // J. Bacteriol. — 1999. — Vol. 181. — P. 270–283.

Поступила 05.08.2011

EVALUATION OF INFLUENCE OF POLIGUANIDINE SUB-BIOCIDE DOSES TO MORPHOMETRIC PARAMETERS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* COLONIES AND CELLS BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

Gavrilova I.A.[1, 2], Titov L.P.[1]

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

In the present study changes of bacterial cells and colonies, as well as sensitivity to disinfectants in a series of passages with the influence of the disinfectant concentration of the guanidines subbiocide group had been evaluated. Bacteria variability at the level of individual cell and at the level of bacterial populations had been found. As a result of stress factors (disinfectant) cells rounded, becoming smaller in size, bacteria mobile forms dominated, and their atypical division had been observed. The colonies became smaller and produced mucus. The data presented could enhance knowledge about the microorganisms adaptation patterns in a hospital conditions.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, resistance to disinfectants, microorganism adaptation, atomic force microscope.

РАЗРАБОТКА СУХОГО ПИТАТЕЛЬНОГО БУЛЬОНА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИСТЕРИЙ

Газиумарова Л.Д.[1], Паньшина Е.Ф.[1], Титов Л.П.[1], Левшина Н.Н.[2]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;
[2]Минский городской центр гигиены и эпидемиологии, Минск, Беларусь

Резюме. На основе конструктивного подбора питательных веществ, необходимых для роста и размножения бактерий из рода *Listeria* была разработана сухая питательная среда для изоляции культур из различных клинических источников и объектов окружающей среды. Среда отличается высокой эффективностью, включает в себя небольшое количество ингредиентов, которые могут снизить расходы и упростить процедуру ее приготовления.

Ключевые слова: *Listeria,* питательная среда, выделение, диагностика.

Введение. С конца 1980-х гг. в ряде стран Европы и Америки были зарегистрированы многочисленные вспышки листериоза у людей, употреблявших в пищу инфицированные листериями пищевые продукты. Заболевания характеризовались тяжелым течением и высокой летальностью [1, 2]. Известно, что возбудитель листериоза — *Listeria monocytogenes* — представляет особую опасность в перинатальной и неонатальной патологии человека [3, 4], может вызвать серьезные осложнения у лиц с дефектами иммунной системы [5, 6]. У нас в стране среди 30% новорожденных, погибших от инфекций перинатального периода, в 70% случаев при наличии морфологических признаков инфекции последняя остается неуточненной.

Листерии способны адаптироваться к существованию в широком диапазоне условий внешней среды при температуре (4–45 °С), pH (4,8–9,0), в присутствии 20% NaCl и 15% CO_2. Им свойственна высокая метаболическая пластичность, способность перехода от сапрофитического образа жизни к паразитическому и наоборот. Из 7 известных в настоящее время видов листерий (*L. monocytogenes, L. ivanovii, L. innocua, L. seeligeri, L. welchimeri, L. grayi, L. murray*) только первая патогенна для человека и животных, а вторая — для животных. Научный интерес к листериям связан с тем, что эти бактерии стали одной из наиболее популярных моделей изучения внутриклеточного паразитизма [7, 8].

Основу диагностики листериоза в микробиологической практике составляет выделение и идентификация возбудителя. За рубежом для этих целей используется комплекс препаратов, выпускаемых различными фирмами: Merk (Германия), Государственный научный центр прикладной микробиологии (ГНЦПМ) (г. Оболенск, Россия), HiMedia (Индия), НПО «Питательные среды» (г. Махачкала) и др. [9–11]. Одни отличаются невысоким качеством, другие дороговизной. В Республике Беларусь отсутствуют препараты для диагностики листериоза как культуральным методом, так и с помощью тест-систем. Однако имеются предпосылки, указывающие на необходимость проведения

мониторинга возбудителя данной инфекции: стабильно высокий уровень заболеваемости острыми кишечными инфекциями неустановленной этиологии, высокий процент новорожденных, погибших от неуточненной инфекции перинатального периода и т.д.

Широкий полиморфизм листериозного микроба, непостоянство биохимических и биологических признаков диктуют необходимость разработки новых средств и подходов к их идентификации.

Цель настоящей работы: на основе конструктивного подбора питательных веществ, необходимых для роста и размножения бактерий, разработать новую накопительную основу среды для выделения листерий из различных клинических источников и объектов внешней среды.

Материалы и методы исследований. В работе использованы тест-штаммы культур рода *Listeria* и клинические изоляты этих же культур, выделенные из пищевых продуктов — мяса крупного рогатого скота и свиных мозгов: *L. monocytogenes* АТСС 7373, *L. monocytogenes* № 1144, *L. ivanovii*.

При подборе компонентного состава среды в качестве белковой основы были испытаны: 1. ГМФ-бульон для культивирования микроорганизмов (получен путем смешивания сухого гидролизата мяса ферментативного — говядины, конины, курятины); 2. пептон для бактериологических питательных сред (получен из рубцов, летошки крупного рогатого скота и мяса кур). Оба гидролизата (ЗАО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии», г. Санкт-Петербург) обладают высокой питательной ценностью, обеспечивают рост колоний листерий типичной морфологии на плотных питательных средах. В качестве источников минеральных веществ использовали соли натрия (NaCl, Na_2CO_3). Последняя, кроме того, служила для подтитровки pH. В качестве источника витаминов группы В для роста культур был использован дрожжевой экстракт; LiCl — для подавления роста энтерококков, имеющих сходные морфологические свойства с выделяемой культурой. Приготовление образцов питательной среды, изучение их физико-химических и бактериологических показателей осуществляли согласно методическим рекомендациям и инструкциям [12]. Контрольной средой служил питательный бульон для выделения листерий производства ГНЦ прикладной микробиологии (г. Оболенск, Россия).

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% [2, 13]. Результаты сравнительного анализа образцов питательных сред, приготовленных на различных гидролизатах, показали, что они отличаются друг от друга как по содержанию аминного азота, являющегося косвенным показателем питательной ценности белковых основ, так и по содержанию хлоридов (таблица 1).

Таблица 1 — Физико-химические показатели образцов сред для накопления листерий

Показатели	Гидролизаты		Контроль
	ГМФ-бульон	Пептон ферментативный	
Прозрачность и цветность раствора	Прозрачный желтого цвета	Прозрачный желтого цвета	Прозрачный желтого цвета
Растворимость	Полная при кипячении в течение 2–3 мин	Полная при кипячении в течение 2–3 мин	Полная при кипячении в течение 2–3 мин
pH	7,0–7,2	7,0–7,2	7,1–7,2
Потеря в массе при высушивании, %	4,0	3,8	2,8
Аминный азот, %	2,7–3,0	3,5–5,0	3,1–3,2
Хлориды, % (в пересчете на NaCl)	24,0–30,0	0,7–0,9	23,4–24,0

Как видно из данных таблицы 1, показатель аминного азота в пептоне ферментативном достигал 5,0%, в то время как в образцах, приготовленных на ГМФ-бульоне, он приближался к контролю, т.е. до 3%.

Поэтому мы снизили концентрацию пептона в исследуемых образцах в пределах требуемых величин. Вместе с тем содержание хлоридов, необходимых для роста этой культуры, достигало

всего 0,7–0,9%, что обусловило необходимость подтитровки соли (NaCl) до 24–30%. Напротив, в технологическом процессе изготовления ГМФ-бульона было предусмотрено заранее добавление этой соли к гидролизату. Таким образом, сравниваемые образцы были сопоставимы по содержанию в них этих показателей, что позволяло дать объективную оценку их питательной ценности и результатов контроля при бактериологических испытаниях.

Для проведения бактериологического контроля испытуемых образцов разведение и посев культур осуществляли по схеме, представленной на рисунке.

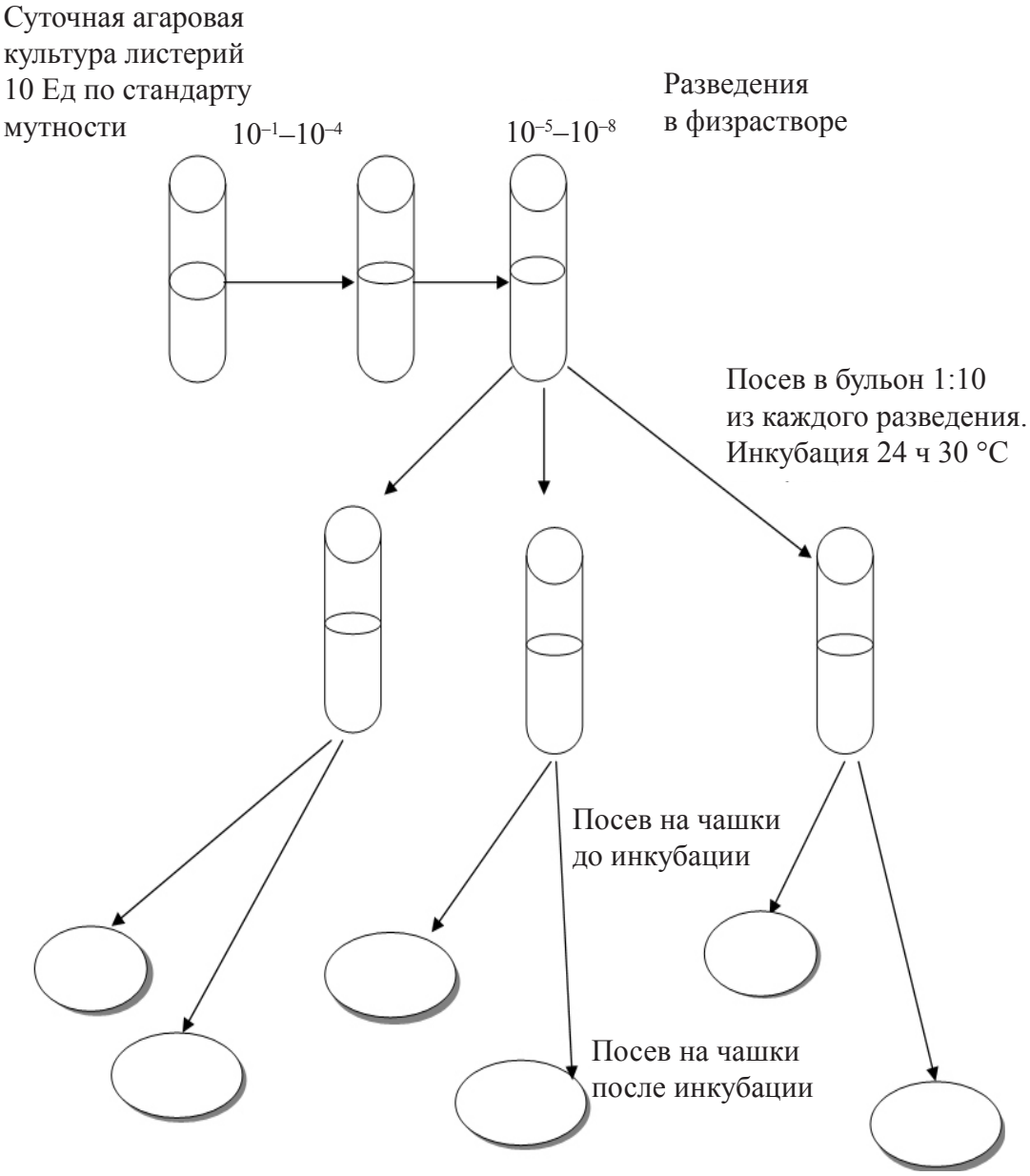


Рисунок — Схема контроля сред на эффективность накопления

Из разведений культур в 10^{-5}–10^{-8} по 1,0 мл из каждого вносили в 3–5 пробирок с 10 мл испытуемой среды. Параллельно из каждого разведения производили высев по 0,1 мл взвеси культуры на 3–5 чашек с питательным агаром для определения числа жизнеспособных клеток в посевной дозе, необходимого для последующего вычисления прироста возбудителя в среде обогащения.

После инкубации посевов в среде обогащения в течение 24–48 ч при 30 °С из каждой пробирки вновь производили высев на чашки с питательным агаром. Чашки с культурой инкубировали в течение 18–24 ч и подсчитывали количество выросших колоний.

Бактериологические данные процесса накопления культур представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Сравнительные данные роста культур рода *Listeria* на испытуемой и контрольной средах

Тест-штамм	Посевная доза		Специфическая активность (количество колоний)					
	До инкубации в бульоне, мт/мл	При посеве на чашку, м.т.	Контроль		ГМФ-бульон		Пептон	
			до инкубации	через 24 часа	до инкубации	через 24 часа	до инкубации	через 24 часа
L. monocytogenes	1000	100	36,0 ± 3,0	сплошной рост	33,0 ± 3,0	сплошной рост	33,0 ± 3,0	сплошной рост
	100	10	1,0	сплошной рост	3 ± 1,0	сплошной рост	3 ± 1,0	сплошной рост
	10	1	—	сплошной рост	—	сплошной рост	—	сплошной рост
	1	—	—	—	—	множество изолированных колоний	—	множество изолированных колоний
L. ivanovii	1000	100	102 ± 5,0	сплошной рост	104 ± 5,0	сплошной рост	108 ± 6,0	сплошной рост
	100	10	9 ± 2,0	сплошной рост	14 ± 2,0	сплошной рост	10 ± 2,0	сплошной рост
	10	1	—	сплошной рост	—	сплошной рост	—	сплошной рост
	1	—	—	до 1000	—	3000–5000 и выше	—	3000–5000 и выше

Как видно из представленных данных, по эффекту накопления оба испытуемых образца превосходят контрольную среду — питательный бульон на гидролизате казеина с добавлением экстракта мяса. Посев даже единичных клеток микроорганизмов обеспечивает густой рост изолированных колоний на чашках с питательным агаром.

Заключение. Таким образом, исходя из пищевых потребностей, конструктивного и энергетического метаболизмов микроорганизмов, нами была разработана базисная питательная основа среды накопления для выделения листерий, включающая ингредиенты, взятые в следующих весовых соотношениях (г/л):

- питательный бульон для культивирования микроорганизмов (ГМФ-бульон) — 25,0
- дрожжевой экстракт — 2,0
- лития хлорид — 3,0
- натрия карбонат — 0,1–0,3

pH 7,2 ± 0,2.

Среда автоклавируется при 1 атм. (121 °С) в течение 20 мин.

Разработанная основа обеспечивает накопление бактерий рода *Listeria* выше, чем на среде контрольной порядка от 3,0 до 5,0 раз. Препарат отличается высокой эффективностью, небольшим количеством входящих в его состав ингредиентов, что позволит значительно снизить себестоимость среды и процедуру ее приготовления.

Литература

1. Farber, J.M. Listeria monocytogenes, a food-born pathogen / J.M. Farber, P.J. Peteslrin // Microbiol. Rev. — 1991. — Vol. 55. — P. 476–511.

2. Тартаковский, И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика / И.С. Тартаковский, В.В. Малеев, С.А. Ермолаева. — М., 2002.

3. Lorber, B. Listeriosis / B. Lorber // Clin. Infect. Dis. — 1997. — Vol. 24. — P. 1–11.

4. Gellin, B.G. Listeriosis / B.G. Gellin, C.V. Broome // JAMA. — 1989. — Vol. 261. — P. 1313–1320.

5. Kaufmann, S.H. Immun intracell / S.H. Kaufmann // Bacteria. — 1993. — Vol. 11. — P. 129–163.

6. Иммунологические и протективные свойства основных белков внешней мембраны *Listeria monocytogenes* / А.В. Пронин [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол. — 1996. — № 3. — С. 53–56.

7. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenenesis / D.A. Portnoy [et al.] // Infect. Immun. — 1992. — Vol. 60. — P. 1263–1267.

8. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infections process / B. Sheehan [et al.] // Curr. Top. Microbiol. Immunol. — 1994. — Vol. 192. — P. 187–216.
9. Microbiology Manual / Merk KGaA. — Darmstadt, Germany, 1996.
10. Бактериологические среды для санитарной и клинической микробиологии, биотехнологии и контроля лекарственных средств: каталог. — Оболенск, 1999.
11. Справочник по микробиологическим питательным средам и микротестсистемам. — Махачкала, 1999. — 80 с.
12. Микробиологические методы исследования биологического материала: инструкция по применению / Н.Д. Коломиец [и др.]. — Минск, 2010. — 124 с.
13. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. — М., 1982.

Поступила 14.07.2011

THE DEVELOPMENT OF DRY NUTRIENT BROTH FOR LISTERIA ISOLATION

Gaziumarova L.D.[1], Panshina E.F.[1], Titov L.P.[1], Levshina N.N.[2]

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]Minsk Municipal Center for Hygiene & Epidemiology, Minsk, Belarus

On the base of constructive selection of nutritive substances needed for growth and reproduction of bacteria from genus *Listeria* dry nutrient medium for cultural isolation from different clinical sources and environmental objects was developed. The medium is very effective, includes small quantity of ingredients that may reduce the costs and simplify the preparation procedure.

Keywords: *Listeria,* nutrient media, isolation, diagnosis.

АЛГОРИТМ ОБСЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ УРЕТРОПРОСТАТИТОМ НА УРОГЕНИТАЛЬНЫЙ ТРИХОМОНИАЗ

Гаврусев А.А.

19-я центральная поликлиника, Минск, Беларусь

Резюме. При исследовании мазка из уретры и секрета простаты 283 больных рецидивирующим уретропростатитом с применением комплексного лабораторного обследования в 73,8% случаев выявлена *Trichomonas vaginalis*. Выявляемость ее увеличивалась после физиопроцедур, инстилляций уретры раствором H_2O_2. Элиминация возбудителя повышала эффективность лечения простатита.

Ключевые слова: уретропростатит, трихомониаз, алгоритм обследования.

Введение. Хронический простатит — самое частое заболевание половых органов у мужчин. Лечение его недостаточно эффективное, в 50–70% случаев заболевание рецидивирует. До настоящего времени этиология небактериального простатита (85–90% всех простатитов) считается неизвестной. Многие исследователи указывают на важную роль в возникновении и поддержании воспалительного процесса в предстательной железе трихомонадной инфекции. Несмотря на широкое распространение этой инфекции диагностика ее затруднена. Известно, что возбудитель *T. vaginalis* часто имеет атипичную амебовидную или округлую форму, может прикреплятся к эпителиоцитам и трудно дифференцироваться при микроскопии от клеток лейкоцитарного ряда. Применяемый в большинстве случаев метод световой микроскопии является низкоэффективным для диагностики трихомониаза, особенно у мужчин. Нативная микроскопия позволяет выявить лишь подвижные особи трихомонады и только в первые минуты после забора материала, что технически выполнить сложно [1]. При торпидном, длительном течении трихомониаза количество трихомонад в исследуемом материале может быть низким. При неадекватной терапии препаратами 5-нитроимидазола также происходит снижение количества трихомонад и дегенеративные изменения в них. По данным ряда исследований, активирующее влияние на воспалительный процесс при трихомониазе оказывают тепловые и дренирующие предстательную железу физиопроцедуры, массаж простаты, бужирования и инстилляции уретры 1,5–3,0% перекисью водорода, курс антибиотиков для элиминации

сопутствующей микрофлоры, инъекции биогенных препаратов (алоэ и др.). После такого подготовительного лечения выявляемость трихомонад может повыситься в 1,5–2 раза [2, 3].

Целью нашего исследования являлось усовершенствование методики выявления *T. vaginalis* у больных хроническим рецидивирующим уретропростатитом.

Материалы и методы. Проведено обследование 283 пациентов с хроническим уретропростатитом, проходивших неоднократно курсы лечения с временным улучшением. У части больных выявлялось бесплодие (13,4%), реактивные артриты (21,1%), патология толстого кишечника (16,2%) и другие сопутствующие и осложняющие заболевания. У всех пациентов исследовался мазок из уретры, секрет простаты, а в некоторых случаях — сыворотка крови. При цитологическом исследовании выявлялись различные морфотипы *T. vaginalis:* амебовидные, округлые, одно- и многоядерные. Жгутики и ундулирующая мембрана часто не определялись. Когда возбудитель не выявлялся и отсутствовало выраженное воспаление в уретре и предстательной железе (количество лейкоцитов менее 5 в мазке и менее 20 в секрете) применялось подготовительное лечение: инстилляции уретры 1,5% перекисью водорода, пробный массаж простаты, инъекции алоэ, противогрибковые препараты и антибиотики по показаниям. После данного лечения вновь проводилось обследование на трихомониаз. В случаях выраженного воспаления (большом количестве лейкоцитов), клинических признаках трихомониаза и отсутствия выявления возбудителя проводилось культуральное исследование (посев на культуру клеток, среду СВТ-ж и др.), а также РИФ и ИФА. При сомнительных результатах лабораторного исследования применялся метод накопления *T. vaginalis* в культуре клеток с последующим проведением ПЦР. Алгоритм обследования на трихомониаз приведен на рисунке.

Результаты исследования. Использование такой усовершенствованной методики выявления *T. vaginalis* позволило диагностировать трихомониаз у 209 из 283 (73,8%) больных хроническим рецидивирующим уретропростатитом. Наиболее эффективным оказался метод предварительного накопления возбудителя в культуре клеток с последующей ПЦР. У 38 из 283 пациентов (18,1%) возбудитель выявлялся только в секрете простаты и отсутствовал в отделяемом из уретры. В 27 (12,9%) случаях трихомонада впервые была выявлена при контрольном обследовании после антибиотикотерапии хламидийной инфекции, массажа простаты и (или) физиопроцедур. У 8 пациентов с клиникой торпидного уретропростатита были применены инстилляции уретры перекисью водорода, после которых у больных появились скудные слизистые выделения из уретры, и была выявлена *T. vaginalis* методом световой микроскопии. Во всех случаях трихомонадная инфекция сочеталась с хламидийной и в 33,2% — с герпесвирусной.

Применение этиопатогенетического лечения согласно выявленным возбудителям позволило повысить эффективность лечения хронического уретропростатита по сравнению с результатами стандартной терапии этого заболевания. Получено более выраженное уменьшение болевого и дизурического синдромов (по баллу шкалы суммарной оценки симптомов хронического простатита), количества лейкоцитов в мазке из уретры и секрете простаты. Количество рецидивов уретропростатита в течение 12 месяцев у пациентов с элиминированными возбудителями снизилось с 82,2 до 28,9% [4].

Заключение. Таким образом, полученные данные убедительно свидетельствуют о важной роли *T. vaginalis* в этиологии хронического уретропростатита и необходимости комплексного обследования пациентов с этим заболеванием на урогенитальный трихомониаз. Применение разработанного алгоритма обследования больных хроническим рецидивирующим уретропростатитом на трихомониаз позволило повысить выявляемость *T. vaginalis*. Проведение лечения согласно выявленным возбудителям повышает эффективность лечения хронического уретропростатита.

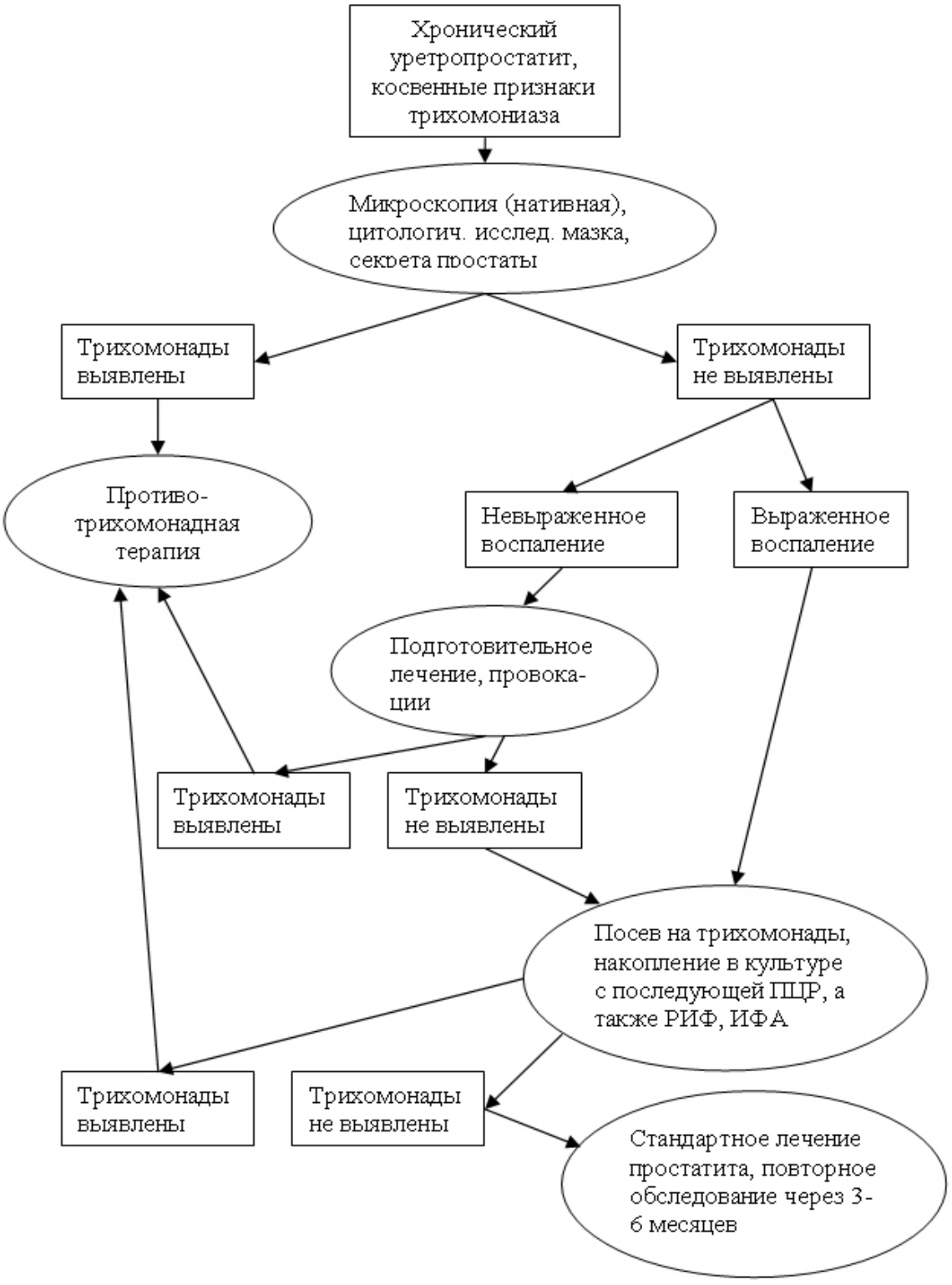


Рисунок — Алгоритм обследования на трихомониаз

Литература

1. Теличко, И.Н. Диагностика и лечение трихомоноза: микробиологические и иммунологические аспекты: автореф. дис. …канд. мед. наук: 14.00.11, 03.00.07 / И.Н. Теличко; Военно-мед. акад. — СПб., 2007. — 44 с.

2. Юнда, И.Ф. Простатиты / И.Ф. Юнда. — Киев: Здоров'я, 1987. — 185 с.

3. Чураков, А.А. Хронический простатит, ассоциированный с трихомониазом и хламидиозом: оптимизация обследования и лечения больных и их половых партнеров: автореф. дис. … д-ра мед. наук: 14.00.40; 14.00.11 / А.А. Чураков; Саратовский гос. мед. ун-т. — Саратов, 2007. — 54 с.

4. Гаврусев, А.А. Обследование и результаты лечения больных хроническим уретропростатитом с генитальным трихомониазом и хламидиозом / А.А. Гаврусев, А.В. Строцкий, Н.Н. Полещук // Актуальные проблемы клинической урологии. V Гродненские урогинекологические чтения. XII Белорусско-польский симпозиум урологов: материалы Белорусской науч.-практ. конф. с междунар. участием. — ARSmedica. — 2010. — № 10. — С. 211–214.

Поступила 12.08.2011

EXAMINATION ALGORITHM OF PATIENTS WITH CHRONIC URETROPROSTATITIS FOR UROGENITAL TRICHOMONIASIS

Gavrusev A.A.

19th Central Polyclinic, Minsk, Belarus

The study included 283 men with chronic urethroprostatitis. Urethral and prostatic specimens were obtained using the complex of laboratory methods. *Trichomonas vaginalis* was isolated from 73,8% patients. Detection of *Trichomonas vaginalis* increased after physical treatments and instillation urethra by H_2O_2.solution. The pathogen elimination increased the effectiveness of the prostatitis treatment.

Keywords: chronic urethroprostatitis, trichomoniasis.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ РЕАКТОГЕННОСТИ И ИММУНОГЕННОСТИ ГРИППОЗНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ «ВАКСИГРИПП»

Дашкевич А.М.[1], Игнатьев Г.М.[1], Грибкова Н.В.[1], Шмелёва Н.П.[1], Титов Л.П.[1], Самарина О.В.[2], Неборская Е.И.[3]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;
[2]МСЧ ОАО «Интеграл»;
[3]Здравпункт ОАО «Керамин», Минск, Беларусь

Резюме. Представлены данные о реактогенности и иммуногенности вакцины «Ваксигрипп» при иммунизации взрослого населения г. Минска. Результаты проведенных исследований в группах добровольцев из числа взрослого работоспособного населения г. Минска показывают, что вакцина «Ваксигрипп» характеризуется высоким уровнем безопасности, обладает слабой реактогенностью, хорошо переносится привитыми, иммуногенна: индуцирует развитие специфического противогриппозного иммунитета.

Ключевые слова: грипп, вакцина, реактогенность, иммуногенность.

Введение. Грипп по-прежнему остается наиболее распространенным инфекционным заболеванием вирусной этиологии, поражающим все группы населения. В г. Минске ежегодно гриппом заболевает около 10% детей и 5% взрослых. Экономический ущерб от него ориентировочно оценивается в сумму более 1 млн. долларов США в год на каждые 100 тыс. населения [1].

На сегодняшний день единственным методом борьбы, сочетающим высокую специфичность, профилактическую эффективность и экономичность, является вакцинация.

Мировой опыт борьбы с инфекционными заболеваниями свидетельствует о том, что для достижения эпидемиологического эффекта при профилактике вирусных заболеваний необходимо вакцинировать не менее 70–80% населения. Только при этом условии удается защитить каждого вакцинированного и создать коллективный иммунитет, при котором возможность инфицирования непривитых лиц резко снижается [2]. В г. Минске, как и в целом по стране, охват населения вакцинацией против гриппа существенно возрос (от 3,1% в 2001 г. до 22,1% в 2010 г.) [3].

В настоящее время для профилактики гриппа применяются живые и инактивированные вакцины, которые могут быть цельновирионными, расщепленными (сплит) и субъединичными. Каждая из современных противогриппозных вакцин обладает своими достоинствами и с учетом сопутствующих хронических заболеваний и физиологического состояния организма может использоваться для профилактики гриппа среди определенных возрастных категорий населения [2, 4].

Основные иммунобиологические характеристики вакцинных препаратов — безопасность (реактогенность) и иммуногенность [5].

Поствакцинальные реакции являются закономерным ответом организма на введение антигена и, как правило, отражают процесс формирования специфического иммунитета. Общие поствакцинальные реакции — изменения, возникающие в поствакцинальном периоде, затрагивающие организм в целом (повышение температуры, кратковременная интоксикация (недомогание, головная боль, нарушение аппетита и др.) [1, 6]. Местные поствакцинальные реакции — это проявления, развивающиеся в месте введения вакцинного препарата в виде уплотнения тканей, гиперемии и/или болезненности в месте введения. [6].

Иммуногенность вакцины — это способность препарата индуцировать развитие системного противогриппозного иммунного ответа. Формирование противогриппозного гуморального иммунитета в ответ на введение вакцины связано с адекватной продукцией антител к антигенам поверхностных гликопротеидов вируса гриппа — гемагглютинину и нейраминидазе [5].

Целью настоящего исследования являлась оценка реактогенности и иммуногенности противогриппозной вакцины «Ваксигрипп» при иммунизации взрослого работоспособного населения г. Минска.

Материалы и методы. На добровольной основе из числа работающих на предприятиях г. Минска методом случайного выборочного распределения было сформировано 2 группы наблюдения — основная и контрольная. В исследование было включено 114 человек, из которых 76 были привиты вакциной «Ваксигрипп» (средний возраст 46,9 ± 1,2); 38 человек составили контрольную группу (средний возраст 50,1 ± 1,2).

Для специфической иммунопрофилактики гриппа использовали инактивированную сплит-вакцину «Ваксигрипп» (Sanofi Pasteur S.A., Франция), штаммовый состав которой соответствовал рекомендациям ВОЗ для эпидемического сезона 2010–2011 гг. и был представлен вирусами гриппа: подобными пандемическому вирусу A/California/7/2009(H1N1), A/Perth/16/2009 (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (по 15 мкг гемагглютинина каждого вируса в одной дозе) [4].

Оценку реактогенности проводили на основании данных учетно-аналитической документации (карты участника проекта), в которой фиксировались сведения о переносимости вакцины (развитии местных и системных реакций в течение 5 дней после вакцинации). Учитывали следующие проявления местной реакции: болезненность, покраснение и припухлость в месте прививки. Общую реакцию организма оценивали на основании данных о температурной реакции (при этом повышение температуры тела до 37,5 ºС включительно служило показателем слабой общей реакции, от 37,6 до 38,5 ºС — средней реакции, от 38,6 ºС и выше — сильной), характере нарушений общего состояния привитых (общее недомогание, головная боль) и симптомов, патогенетических для гриппозной инфекции (катаральные явления).

С целью оценки динамики изменений противогриппозного гуморального иммунитета у всех лиц, включенных в данное исследование, были забраны пробы венозной крови: первая — до вакцинации, вторая — через 28 ± 7 дней после прививки. До проведения исследования сыворотки крови хранились в замороженном состоянии при температуре –20 °С.

Парные сыворотки добровольцев исследовали в лаборатории гриппа и гриппоподобных заболеваний РНПЦ эпидемиологии и микробиологии в зашифрованном виде. Уровень противогриппозных антител в сыворотках крови определяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием 0,75% суспензии эритроцитов 0 (I) группы крови человека, как описано в инструкции «Комплексная лабораторная диагностика гриппа» [7]. Для удаления неспецифических ингибиторов сыворотки обрабатывали ферментом — нейраминидазой нехолерных вибрионов — и прогревали при 56 ºС в течение 30 мин. В реакции использовали эпидемические штаммы вирусов гриппа, выделенные в Республике Беларусь в 2009 г.: A/Минск/42/09(H1N1-p), A/Минск/229/09(H3N2), B/Минск/119/09. Титр специфических противогриппозных антител считали равным наибольшему разведению сыворотки, в котором наблюдалось полное ингибирование гемагглютинации. В качестве защитного принимали титр в РТГА 1:40 и выше. Для вычисления среднегеометрических титров антител (СГТ) титр менее 1:10 принимали равным 1:5.

Оценку иммуногенности вакцины проводили в соответствии с требованиями Европейского комитета готовых лекарственных средств к противогриппозным вакцинам (CPMP/BWP/214/96) [8], согласно которым при иммунизации препаратом должен выполняться по крайней мере один из трех критериев:

- сероконверсия (процент лиц с четырехкратным приростом титра антител после вакцинации) — не менее 40%;

- кратность нарастания среднегеометрических титров антител по сравнению с фоновой сывороткой — не менее 2,5;

- серопротекция (процент лиц с защитным титром антител после вакцинации) — не менее 70%.

Статистический анализ. Результаты исследований обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента и при отсутствии нормального распределения — с помощью непараметрических критериев. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Вариационный анализ полученных результатов проводили с применением пакета прикладных программ «SPSS».

Результаты и обсуждение. На первом этапе была оценена реактогенность и безвредность вакцины. По итогам наблюдения не было выявлено поствакцинальных осложнений и необычных реакций. Местные реакции отмечались у 8 добровольцев и субъективно выражались болезненностью в месте инъекции. Общие реакции зарегистрированы у 7 вакцинированных. В основном это были симптомы катаральных явлений (3,95%), характерные для осенне-зимнего сезона, общее недомогание (2,6%); в единичных случаях имели место головная боль и повышение температуры тела до 38,5 ºС. (таблица 1).

Таблица 1 — Частота и характер постпрививочных реакций (в группе вакцинированных, n = 76)

Характер постпрививочных реакций	Абс. значение	% ± m
Местные поствакцинальные реакции		
Болезненность в месте инъекции	8	10,5 ± 3,5
Общие поствакцинальные реакции		
Повышение температуры тела до 38,5ºС	1	1,3 ± 1,3
Катаральные явления	3	3,95 ± 2,2
Общее недомогание	2	2,6 ± 1,8
Головная боль	1	1,3 ± 1,3
Всего местных и общих поствакцинальных реакций	15	19,74 ± 4,57

Практически во всех случаях местные и общие реакции классифицировались как слабые, не требовали применения лекарственных средств и проходили самостоятельно в течение 2–4 дней после прививки. Только в одном случае была зарегистрирована температурная реакция средней степени выраженности, которая по длительности не превышала одного дня.

Таким образом, результаты оценки реактогенности показали, что вакцина «Ваксигрипп» является слабореактогенным препаратом и хорошо переносится привитыми, что, в целом, согласуется с данными литературы. Так, по мнению специалистов, вакцины против сезонного гриппа являются наиболее безопасными: постпрививочные осложнения регистрируются крайне редко, число привитых, у которых отмечаются реакции, составляет в среднем 15–50% [2, 9].

Оценка иммуногенности. Проведенные серологические исследования показали, что группы добровольцев неоднородны по наличию антител к различным вирусам гриппа. Среди участников исследования были выявлены как серонегативные лица, так и лица исходно имевшие защитный титр антител.

До вакцинации в основной группе антитела к гемагглютинину в защитном титре к гриппу A/H1N1 обнаруживались у 5,3% добровольцев, к гриппу A/H3N2 — у 3,9%, гриппу B — у 15,8%. В контрольной группе эти показатели составили 2,6, 0 и 18,4% соответственно.

После иммунизации процент лиц с защитным титром антител в основной группе достоверно увеличился и составил 51,3% к штамму A/H1N1, 23,7% — к штамму A/H3N2 и 71,1% — к гриппу B ($p < 0,001$).

В контрольной группе ни к одному из вирусов гриппа не выявлено достоверных различий в уровне серопротекции между первой и второй сыворотками (рисунок).

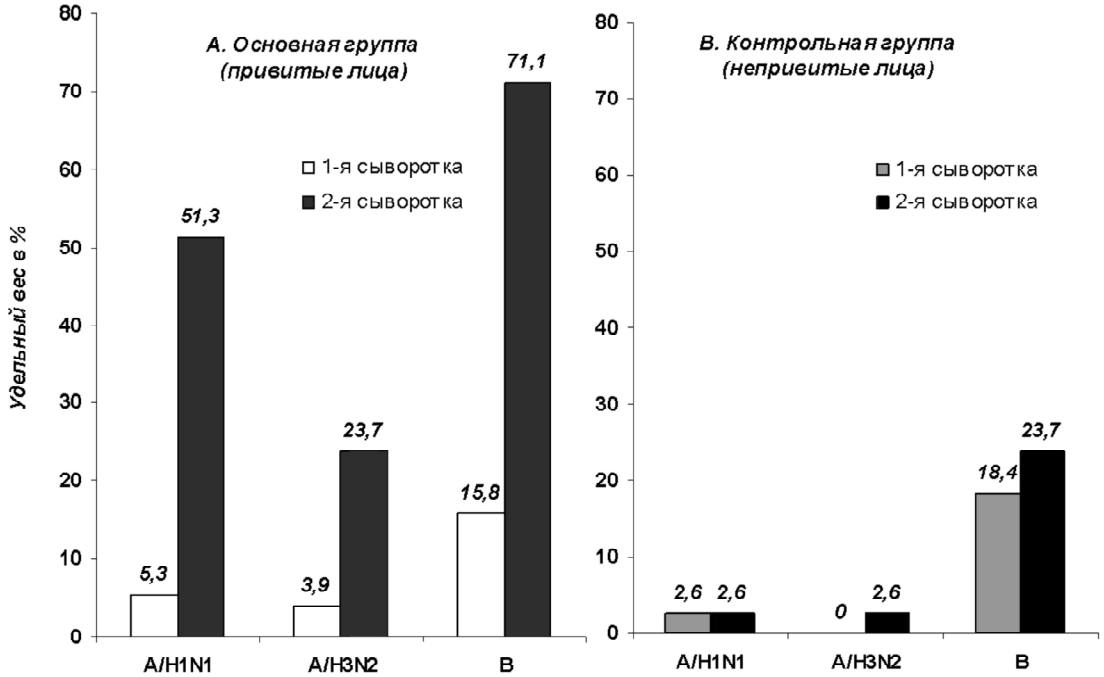


Рисунок — Динамика изменения напряженности иммунитета к гемагглютинину вирусов гриппа в основной (А) и контрольной группах (В) (удельный вес лиц с защитным титром антител)

Таким образом, по уровню серопротекции наибольшая иммуногенность вакцины «Ваксигрипп» отмечается в отношении вируса гриппа В (71,1%). Данный показатель соответствует критерию СРМР [8]. Менее иммуногенной вакцина оказалась к вирусу гриппа A/H1N1 (уровень серопротекции — 51,3%), минимальная антигенная активность наблюдалась к вирусу гриппа A/H3N2 (уровень серопротекции — 23,7%).

Кратность нарастания антител и доля лиц с 4-кратным и более приростом СГТ являются важными характеристиками иммунного ответа на вакцинацию. Проведенные исследования свидетельствуют, что иммунизация стимулировала увеличение СГТ ко всем трем вакцинным штаммам вируса гриппа. При этом иммунный ответ был более выражен к вирусу гриппа A/H1N1: спустя 28 дней после вакцинации СГТ антител увеличился в 1,5 раза. Кратность прироста титров антител к гриппу A/H3N2 и В была ниже (1,4 и 1,3 раза соответственно). Вместе с тем кратность нарастания СГТ антител ко всем трем вакцинным штаммам вируса гриппа была ниже требований СРМР [8] (таблица 2).

В контрольной группе статистически значимых изменений СГТ антител к гемагглютининам вируса гриппа не выявлено.

Таблица 2 — Уровень сероконверсии и кратность нарастания титров противогриппозных антител в группах исследования

Сравниваемые показатели	Основная группа (привитые вакциной Ваксигрипп) n = 76			Контрольная группа (непривитые лица) n = 38		
	A/H_1N_1	A/H_3N_2	B	A/H_1N_1	A/H_3N_2	B
Сероконверсия, % ± m	40,79 ± 5,64	19,74 ± 4,57	51,32 ± 5,73	—	—	—
СГТ антител в 1-й сыворотке, в $\log_2$	3,1	2,97	3,89	2,7	3	3,4
СГТ антител во 2-й сыворотке, в $\log_2$	4,8*	3,89*	5,5*	2,7	3,1	3,5
Кратность нарастания титров антител	1,5	1,3	1,4	1	1	1

Примечание — * — отличия статистически значимы по сравнению с исходными титрами, $p < 0,05$

Число лиц с 4-кратным и более приростом антител (уровень сероконверсии) после вакцинации составил 51,32 ± 5,73% к вирусу гриппа В, 40,79 ± 5,64% — к вирусу гриппа A/H1N1 и 19,74 ± 4,57% — к A/H3N2.

Таким образом, по результатам исследования наибольшая иммуногенность вакцины «Ваксигрипп» отмечалась в отношении вирусов гриппа В и A/H1N1; в меньшей степени антигенная активность проявлялась к гриппу A/H3N2. В целом, оценка иммунологической эффективности вакцины «Ваксигрипп» при иммунизации взрослого работоспособного населения г. Минска свидетельствует о том, что препарат обладает достаточной иммуногенной активностью.

Заключение. Оценка частоты и выраженности общих и местных реакций показала, что вакцина «Ваксигрипп» обладает слабой реактогенностью, имеет высокий уровень безопасности и хорошо переносится привитыми: выраженных местных и общих реакций и поствакцинальных осложнений не зарегистрировано.

Наибольшая иммуногенность вакцины «Ваксигрипп» отмечалась в отношении вирусов гриппа A/H1N1 и В, в меньшей степени — к гриппу A/H3N2. В целом, по результатам проведенных исследований установлено, что вакцина обладает достаточной иммуногенной активностью, индуцируя развитие специфического противогриппозного иммунитета.

Приведенные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего, более углубленного изучения механизма формирования поствакцинального противогриппозного иммунитета в условиях нашей республики с целью оптимизации системы вакцинопрофилактики гриппа.

Литература

1. Вакцинопрофилактика гриппа в г. Минске: практический опыт и рекомендации: информ. бюл. для мед. работников. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь, Минск. гор. исполнит. комитет, Минск. гор. ЦГЭ и ОЗ, Комитет по здравоохр. Мингорисполкома. — Минск, 2009. — 41 с.

2. Вакцинация против гриппа детей с отклонениями в состоянии здоровья и хроническими болезнями / Л.С. Намазова [и др.] // Педиатр. фармакол. — 2006. — Т. 3, № 5. — С. 48–60.

3. Результаты оценки действенности вакцинации против гриппа на заболеваемость населения г. Минска в период ноябрь 2010 г. – март 2011 г.: информ. письмо Минского городского центра гигиены и эпидемиологии от 12.05.2011 № 22-8.1/20.
4. Информационное письмо об использовании противогриппозных вакцин / М-во здравоохр. Респ. Беларусь 01.09.2010 № 10-27/20-1040.
5. Титов, Л.П. Иммунология: терминологический словарь / Л.П. Титов. — М.: МИА, 2008. — 521 с.
6. Таточенко, В.Н. Профилактика и мониторинг поствакцинальных осложнений (пособие для врачей) / В.Н. Таточенко, А.М. Федоров, Н.А. Озерцовский. — М., 2004. — 128 с.
7. Комплексная лабораторная диагностика гриппа: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 18.01.2011 № 121-1210.
8. Note for guidance on harmonisation of requirements for influenza vaccines / Committee for Proprietary Medicinal Products: CPMP/BWP/214/96. — London, 1997. — 19 p.
9. Некрасов, А.В. Современная вакцина от гриппа в национальном календаре профилактических прививок для детей / А.В. Некрасов, Н.Г. Пучкова // Педиатр. фармакол. — 2009. — Т. 6, № 4. — С. 25–29.

Поступила 04.08.2011

THE RESULTS OF STUDY OF REACTOGENICITY AND IMMUNOGENICITY OF INACTIVATED INFLUENZA VACCINE VAXIGRIP

Dashkevich A.M.[1], Ignatyev G.M.[1], Gribkova N.V.[1], Shmialiova N.P.[1], Titov L.P.[1], Samarina O.V.[2], Neborskaya E.I.[3]

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;
[2]JSC Integral;
[3]JSC Keramin, Minsk, Belarus

The study presents data about reactogenicity and immunogenicity of influenza vaccine Vaxigrip in the immunization of adult people from Minsk city. We demonstrated that of vaccine Vaxigrip was characterized by low reactogenicity, good tolerability and immunogenicity; induced the development of effective specific immune response.

Keywords: influenza, vaccine, reactogenicity, immunogenicity.

МУТАЦИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ/СПИД, НАХОДЯЩИХСЯ НА ВААРТ

Ерёмин В.Ф.[1], Гасич Е.Л.[1], Сосинович С.В.[1], Суетнов О.Н.[2], Горбунова Н.А.[3], Ильенкова В.С.[4], Грушко П.Н.[2], Грушко Т.П.[2], Василенко А.И.[5], Карпов И.А.[5]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;
[2]Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Гомель;
[3]Минская областная клиническая больница;
[4]Страновое Бюро Всемирной организации здравоохранения в Республике Беларусь;
[5]Кафедра инфекционных болезней Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

Резюме. В статье представлены результаты исследований, проведенных в 2007–2011 гг. по определению мутаций резистентности ВИЧ у пациентов, находящихся на ВААРТ. Из 35 пациентов 24 были взрослые и 11 — дети. В результате проведенных исследований было показано, что у взрослых пациентов с ВИЧ-инфекцией чаще встречаются мутации в положении K103N (41,2%), определяющие высокий уровень резистентности ВИЧ к ННИОТ невирапину (NVP), делавердину (DLV) и эфавиренцу (EFV) и M184V (38,2%), которая является причиной появления высокого уровня резистентности ВИЧ к НИОТ ламивудину (3TC) и эмтрицитабину (FTC), а также резистентности низкого уровня к диданозину (ddI) и абакавиру (ABC).У детей чаще выявлялись мутации резистентности в положении M184V(36%).

Ключевые слова: ВИЧ/СПИД, ВААРТ, мутации резистентности.

Введение. Одной из основных причин, влияющих на эффективность высокоактивной антивирусной терапии (ВААРТ), является высокая степень изменчивости определенных участков генома вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), ведущая к появлению мутаций, ассоциированных с ре-

зистентностью к препаратам антиретровирусной терапии (АРТ). В настоящее время в схемах АРТ применяется более 20 препаратов 5 классов и, к сожалению, известны мутации в геноме вируса, ведущие к его устойчивости к этим препаратам [1, 2]. Вместе с тем в настоящее время нет альтернативы ВААРТ и применяющиеся схемы лечения позволяют значительно повысить жизненный статус этой категории пациентов. Своевременное определение мутаций резистентности и, соответственно, смена схемы лечения лежат в основе эффективности ВААРТ.

На 1 августа 2011 г. в Республике Беларусь официально зарегистрировано 12 434 пациентов с ВИЧ/СПИД (131,2 случая на 100 тыс. населения), из которых 204 — дети, рожденные ВИЧ-инфицированными матерями.

С ноября 2007 г. в соответствии с приказом Министра здравоохранения № 842 от 30.10.2007 на базе лаборатории диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций РНПЦ эпидемиологии и микробиологии проводятся исследования по определению резистентных штаммов ВИЧ у пациентов, находящихся на ВААРТ. За 3 года в лаборатории было выполнено около 300 исследований по определению резистентных вирусов и выявлено 35 пациентов (11 из них — дети), у которых выявляются вирусы с высоким уровнем резистентности (high/level) к препаратам ВААРТ.

В настоящей работе представлены наши данные по определению мутаций резистентности высокого уровня у пациентов, находящихся на ВААРТ.

Материалы и методы исследования. В работе представлены данные по выявлению мутаций резистентности высокого уровня у 35 пациентов. Сведения по пациентам представлены в таблицах 1 (взрослые) и 2 (дети).

Кровь в объеме 3–5 мл от пациентов с ВИЧ/СПИД была взята из локтевой вены в пробирки с этилендиамитетраацетатом (ЭДТА). Плазма крови была собрана после центрифугирования при 1000 об/мин в течение 20 мин.

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили на тест-системах производства «КомбиБест-ВИЧ-1, 2 АГ/АТ» (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия).

Вирусную РНК выделяли из 500 мкл плазмы высокоскоростным центрифугированием при 21000–25000g и 4–8 °С на высокоскоростной центрифуге Beckman Coulter J-30i Avanti (США).

Секвенирующую полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе АВ 2700.

Секвенирование участка гена pol ДНК ВИЧ-1, кодирующего синтез протеазы и обратной транскриптазы (1800 п.н.), проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США) с использованием коммерческого набора «ViroSeq™ HIV-1, HIV-1 genotyping system v.2.0» (Abbott, США) с аналитической чувствительностью 2×10^3 копий РНК/мл согласно инструкции, прилагаемой к тест-системе.

Таблица 1 — Мутации резистентности высокого уровня, выявленные у пациентов на ВААРТ (взрослые)

№ в GenBank, шифр, регион	Пол	Год рожд.	Субтип ВИЧ	PIs	NRTIs	NNRTIs
1	2	3	4	5	6	7
FR873218, БЛП, Витебск	ж	1978	A	—	D67N; K70R; M184V; K219Q	V179DV; Y188L
ХАА, Гомельская обл.	м	1970	A	D30N; N88D;+ минорные: L10V; T74S	M41L; D67N; K70R; T215F; K219Q	G190S
FR686468, КТС, Минская обл.	ж	1982	CRF06_cpx	—	—	K103N; K238T
FR873829, К., Минская обл.	ж	1968	A	—	M184V	K103N; V108IV; P225HP
HE575252, МАБ, Брестская обл.	м	1974	A	—	M184V	K101E; E138A; G190A
FR873806, ОЕ, Минск	ж	1984	A	—	A62V	Y188CFSY
FR873828, БЕВ, Минская обл.	ж	1969	A	—	—	G190S
FR873826, ИНН, Минская обл.	ж	1982	A	—	V181I; M184V	K103N

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
FR686469, КонДС, Минская обл.	м	1980	CRF06_cpx	—	M184V	K103N
FR873820, КАА, Минская обл.	м	1979	A	—	—	K103N; E138A
HE576766, МАА, Минская обл.	м	1981	A	—	—	K103N; E138A
FR873830, ШВЛ, Минская обл.	ж	1985	A	—	V118I; M184V	K103N; P225H
HE576765, БАА, Минская обл.	м	1976	A	—	Y115F; V118I; M184V; T215F	E138A
HE577613, ЛВФ, Минская обл.	м	1959	A	—	M184V	E138A
FR873833, Ш., Минск	ж	1987	A	L10I	V118I, M184V, T215F	K101H; G190S
HE577618, ГАА, Минская обл.	м	1975	A	—	K65R, M184V	K103N; P225H
HE577616, БВМ, Минская обл.	м	1971	A	L10IL	V118I	K103N
FR873220, ФМИ, Витебская обл.	м	1981	A	—	T69NT, M184V	Y181CFGV
ПДН, Гомельская обл.	м	1977	A		T215ST	G190GS
ВСА, Гомельская обл.	м	1974	A		T69i, V118I	K103KN
БИА, Минская обл.	ж	1980	A		—	K103N
РИЕ, Минская обл.	ж	1974	A	—	M184V	K103KN
ПЕН, Минская обл.	м	1979	A	—	M184V	K103N; P225H
РЛН, Минская обл.	ж	1985	A	—	—	K103N

Таблица 2 — Мутации резистентности высокого уровня, выявленные у пациентов на ВААРТ (дети)

№ в GenBank, шифр, регион	Пол	Год рожд.	Субтип ВИЧ	PIs	NRTIs	NNRTIs
2	3	4	5	6	7	8
FN995208, ФДО, Могилевская обл.	м	2003	CRF02_AG	—	M42L; D67N; T69Xi; K70R; V75M; T215F; K219Q	K101KQ; K103S; G190A
FR873144 ПИА, Гомельская обл.	м	1996	A	M46I; I54V; V82F; I84V	A62V; T69Xi; L74I; Y115F; M184V; L210W; T215Y	—
ШМ, Минская обл.	м	2002	A	—	D67N; K70R; V118I; M184V; T215Y; K219E	V106I; Y188L
FR686903, МРС, Могилевская обл.	м	2003	A	—	M41L; E44DE; D67N; T69Xi; M184V; L210W; T215Y	—
СЕА, Минск	ж	2004	A	—	D69N; T69Xi; K70R; V118I; M184V; K219Q	—
FR875363, АЮИ, Гомельская обл.	ж	1996	A	M46I; I54V; V82F+ L10V; T74S; L89V	L74IV, Y115F, V118I, M184V, T215F	K101E, Y181CY, G190S, H221Y
FR873142, САЮ, Гомельская обл.	ж	2001	A	—	M184V	Y188L
HE576767, ЯЛЯ, Минская обл.	ж	2008	A	—	T69NT, M184V	Y181CFGV
HE577615, РАА, Минская обл.	ж	2004	A	—	D67G, M184V, K219N	G190S
FR873145, ПОВ, Гомельская обл.	ж	1996	A	—	M41L, E44D, V75M, M184V, L210W, T215Y	A98G, K101E, Y181C, G190S
РД, Гомельская обл.	м	2004	A	M46I; L90M; A71T; T74S	D67N; T69i; K70R; T215FY	

Анализ полученных фрагментов и определение мутаций резистентности ВИЧ к препаратам антиретровирусной терапии проводили с использованием коммерческой базы данных «ViroSeq HIV-1 genotyping system software v2.6 analysis» (Abbott, США), а также с применением программных продуктов «Sequencing Analysis Software v. 5.1.1», «BioEdit», «SeqScape».

Филогенетический анализ полученных фрагментов осуществляли с помощью программы «Mega 4.1» (деревья с корнем построены методом присоединения соседей — neighbor-joining method).

Результаты исследования и обсуждение. Из 24 пациентов (взрослые), у которых был выявлен вирус с высоким уровнем резистентности к препаратам ВААРТ, 13 мужчин (средний возраст 35,9 года) и 11 женщин (средний возраст 31,5 года) (таблица 1). 16 пациентов было из разных районов Минской области, по 2 человека из Гомельской, Витебской областей и г. Минска, и 1 — из Брестской области. 22 (91,7%) человека являлись носителями субтипа А ВИЧ-1 и 2 (8,3%) были инфицированы рекомбинантной формой CRF06_cpx, впервые описанной нами на территории Беларуси. Проведенный анализ результатов секвенирования показал, что чаще всего в анализируемой группе пациентов встречались мутации резистентности к нуклеозидным (НИОТ) и ненуклеозидным (ННИОТ) ингибиторам обратной транскриптазы (рисунок 1). В 14 (41,2%) случаях определялась мутация K103N, определяющая высокий уровень резистентности ВИЧ к ННИОТ невирапину (NVP), делавердину (DLV), и эфавиренцу (EFV). Данная мутация не влияет на чувствительность вируса к этравирину (ETR), но проявляет синергическое действие вместе с мутацией L100I и, возможно, K101P на чувствительность к этравирину. Ни у одного из обследованных нами пациентов такой комбинации мутаций выявлено не было. У 13 (38,2%) пациентов была выявлена мутация в положении M184V, которая является причиной появления высокого уровня резистентности ВИЧ к НИОТ ламивудину (3TC) и эмтрицитабину (FTC), а также резистентности низкого уровня к диданозину (ddI) и абакавиру (ABC). Эта же мутация усиливает чувствительность вируса к зидовудину (AZT), тенофовиру (TDF) и ставудину (d4T). В 4 (11,8%) случаях мы обнаружили мутацию G190S, с которой связано появление мутаций высокого уровня к ННИОТ невирапину (NVP) и эфавиренцу (EFV), а также повышение чувствительности к делавирдину (DLV). В двух случаях определили мутацию в положении Y188L, которая ведет к появлению резистентности ВИЧ высокого уровня к ННИОТ невирапину (NVP) и эфавиренцу (EFV), а также мутациям среднего уровня (intermediate) к делавердину (DLV) и потенциально низкого уровня (potentially low-level) — к этравирину (ETR). У одного (2,9%) ВИЧ-инфицированного была выявлена мутация в положении D30N, определяющая высокий уровень резистентности ВИЧ к ингибитору протеазы нельфинавиру (NFV), потенциально низкий — к атазанавиру (ATV/r).

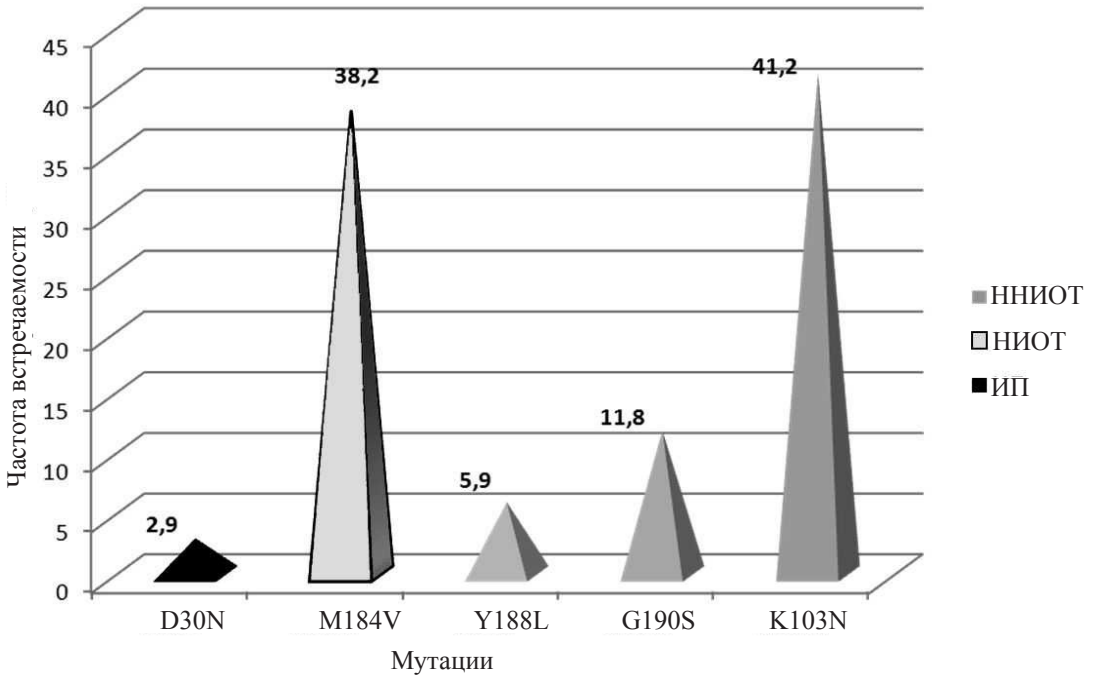


Рисунок 1 — Мутации резистентности, выявленные у пациентов на ВААРТ (взрослые)

У 7 пациентов были выявлены комбинации мутаций K103N+M184V, определяющие высокий уровень резистентности к ННИОТ и НИОТ. У одного пациента, наряду с мутациями D30N и G190S, были обнаружены мутации M41L и T215Y, которые вместе ведут к появлению резистентности высокого уровня к AZT и d4T, а также резистентности низкого уровня к ddI, ABC и TDF (таблица 1).

Из 11 пациентов-детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, в 9 (36%) случаях нами была определена мутация в положении M184V, определяющая высокий уровень резистентности к НИОТ. В 3 (12%) случаях определялась мутация в положении G190S, определяющая, как было сказано, резистентность высокого уровня к ННИОТ невирапину (NVP) и эфавиренцу (EFV), а также повышение чувствительности к делавирдину (DLV), в одном — G190A, ведущая к появлению резистентности высокого уровня к невирапину (NVP), среднего уровня резистентности к эфавиренцу (EFV), а также к повышению чувствительности к делавирдину (DLV). В одном случае была выявлена мутация в положении K103S, ведущая к появлению мутаций резистентности высокого уровня невирапину (NVP) и среднего/высокого уровня к делавирдину (DLV) и эфавиренцу (EFV) (рисунок 2, таблица 2). У двоих детей вывлена мутация в положении Y188L, которая ведет к появлению резистентности ВИЧ высокого уровня к ННИОТ невирапину (NVP) и эфавиренцу(EFV), а также мутациям среднего уровня (intermediate) к делавердину (DLV) и потенциально низкого уровня (potentially low-level) к этравирину (ETR). В 3 случаях была выявлена мутация резистентности в положении M46I/L, которая ведет к снижению чувствительности к ингибиторам протеазы ВИЧ: индинавиру (IDV/r), нельфинавиру (NFV), фосампренавиру (FPV/r), лопинавиру (LPV/r), и атазанавиру (ATV/r) в присутствии других мутаций. Выявлялись также другие мутации: T74S, V84F, I84V, L90M, ведущие к снижению чувствительности ВИЧ к ингибиторам протеазы (рисунок 2). У 5 детей выявлялись комбинации мутаций, ведущие к появлению высокого уровня резистентности к НИОТ и ННИОТ, у 2 к НИОТ и ИП и у одной пациентки выявлялись мутации резистентности высокого уровня к ИП, НИОТ и ННИОТ.

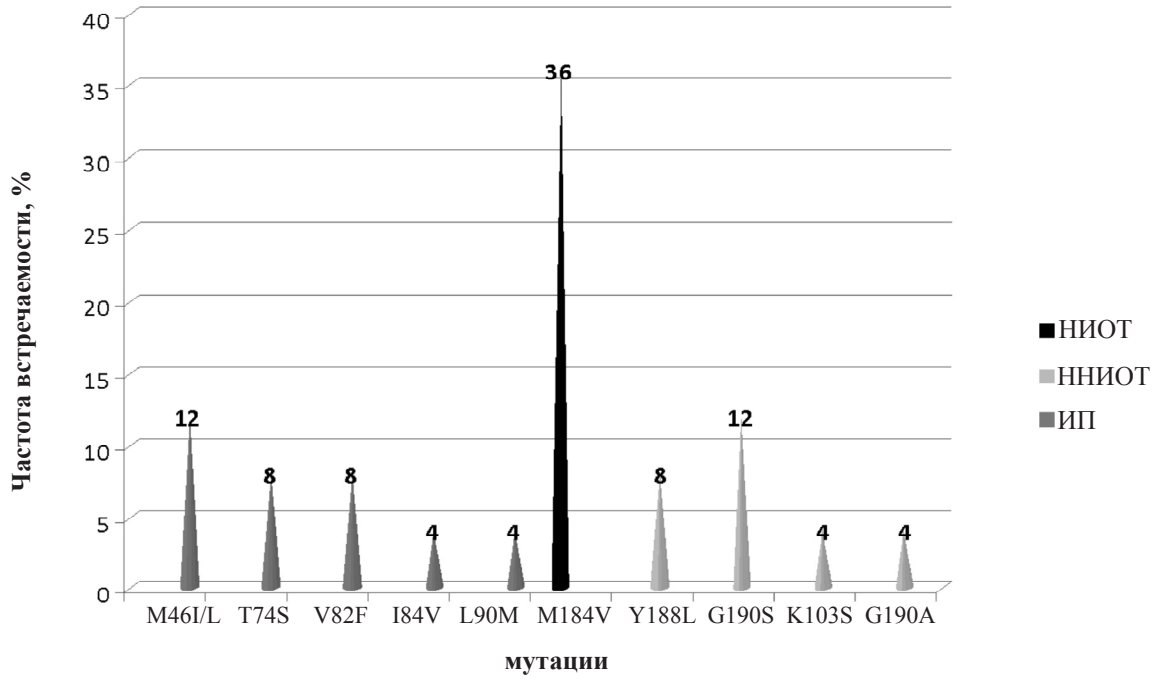


Рисунок 2 — Мутации резистентности, выявленные у пациентов на ВААРТ (дети)

Заключение. Таким образом, в настоящее время в Республике Беларусь на базе лаборатории диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций РНПЦ эпидемиологии и микробиологии налажена работа по определению мутаций резистентности ВИЧ у пациентов, находящихся на ВААРТ. Проведенные исследования показывают, что для успешной АРТ необходимо включение в схемы лечения новых препаратов для лечения пациентов, у которых выявляются мультирезистентные изоляты ВИЧ. 25 последовательностей генов gag-pol зарегистрированы в Международной базе данных GenBank (таблицы 1 и 2).

Исследования выполнены при финансовой поддержке Глобального Фонда, проекта международной технической помощи «Профилактика и лечение ВИЧ/СПИД в Республике Беларусь».

Литература

1. Nucleoside analog resistance caused by insertions in the fingers of human immunodeficiency virus type1 reverse transcriptase involves ATP-mediated excision / P.L. Boyer [et al.] // J. Virol. — 2002. — Vol. 76. — P. 9143–9151.

2. Extend and importance of cross-resistance to efavirenz after nevirapine failure / J.L. Casado [et al.] // AIDS Res. Hum. Retrovir. — 2002. — Vol. 18. — P. 771–775.

3. Kellam, P. Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance / P. Kellam, B.A. Larder // J. Virol. — 1995. — Vol. 69. — P. 669–674.

Поступила 07.09.2011

RESISTANCE MUTATIONS IDENTIFIED AT HIV/AIDS PATIENTS ON HAART

Eremin V.F.[1], Gasich E.L.[1], Sasinovich S.V.[1], Suetnov O.N.[2], Gorbunova N.A.[3], Il'enkova V.S.[4], Grushko P.N.[2], Grushko T.P.[2], Vasilenko A.I.[5], Karpov I.A.[5]

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk;
[2]Gomel Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Gomel;
[3]Chief Infectiologist in Minsk Region;
[4]Country Office of World Health Organization in Belaru;
[5]Department of Infectious Diseases of Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The results of researches spent in 2007–2011 on HIV resistance mutations definition at patients on HAART are presented. Of 35 patients 24 were adults and 11 children. As a results have shown, HIV-infected adult patients more often have mutations in position K103N (41.2%), defining HIV high/level resistance to NNRTIs: NVP, DLV, and EFV and M184V (38.2%) which is at the bottom of occurrence of HIV high/level resistance NRTIs: 3TC and FTC, and also low/level resistance to ddI and ABC. HIV resistance mutations in position M184V (36%) have been reveled more often at children.

Keywords: HIV/AIDS, HAART, resistance mutations.

МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ И ТОРМОЖЕНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С КОИНФЕКЦИЕЙ ВИЧ/ВГС

Матиевская Н.В.[1], Цыркунов В.М.[1], Гончаров А.Е.[2]

[1]Гродненский государственный медицинский университет, Гродно;
[2]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Изучены маркеры активации и торможения иммунного ответа: HLA-DR, CD25, экспрессия хемокиновых рецепторов CXCR4 и CCR5, содержание Т-лимфоцитов со свойствами ЕК (ТЛЕК), а также показатели $CD19^+$, $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов у пациентов 3 клинических групп: 1-я группа — 51 пациент с коинфекцией ВИЧ/ВГС, 2-я группа — 23 пациента с ВИЧ-инфекцией, 3-я группа — 10 пациентов с ВГС-инфекцией. Группу контроля составили 16 здоровых лиц. У пациентов с хронической коинфекцией ВИЧ/ВГС отмечена активация клеточного иммунитета. Установлено снижение частоты экспрессии CXCR4 на лимфоцитах крови (ЛК) и повышение экспрессии CCR5 на ЛК (по сравнению с контролем) и ВГС-инфекцией при коинфекции ВИЧ/ВГС, что ассоциируется с более сильным ИО Th1-типом по сравнению с моноинфекцией ВГС.

Ключевые слова: ВИЧ, ВГС, коинфекция, иммунный ответ, хемокиновые рецепторы, CCR5, CXCR4.

Введение. Важнейшим аспектом в патогенезе ВИЧ-инфекции считается хроническая активация иммунной системы. Гипериммунный ответ приводит к синтезу провоспалительных цитокинов, усиленной продукции новых вирионов ВИЧ, потере центральных клеточных элементов иммунной системы (ИС): CD4+ и CD8+ лимфоцитов [1]. Клеточными маркерам активации иммунного ответа (ИО) считаются такие молекулы как HLA-DR, $CD25^+$, $CD38^+$, $CD71^+$ [2].

Мембранные молекулы HLA-DR относятся к МСН II класса, представлены в основном на АПК (ДК, макрофагах/моноцитах, В-лимфоцитах, эндотелии сосудов и др.). При этом со стороны Т-лимфоцитов, участвующих в распознавании HLA-DR, необходима связь с CD4-молекулой, которая выступает в качестве корецептора для молекул МНС класса II [3]. Установлено, что периферическая кровь человека содержит популяцию регуляторных FoxP3-экспрессирующих $CD4^+CD25^+$-Т-клеток, которые ингибируют активность эффекторных Т-лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^-$. Количество таких клеток в крови здоровых доноров составляет 0,7–5,5% от периферических мононуклеарных клеток. У ВИЧ-инфицированных пациентов Treg-клетки вызывают супрессию как ВИЧ-специфического, так и общего клеточного ИО [4]. Т-лимфоциты со свойствами ЕК (ТЛЕК) экспрессируют на своей поверхности FAS-лиганд, который связывает FAS-рецептор на активированных Т-лимфоцитах, что индуцирует их апоптоз, тем самым вызывая иммуносупрессию. Таким образом, данные клетки можно рассматривать как факторы торможения иммунного ответа [3].

Хемокиновые рецепторы (ХР) CXCR4 (CD184) и CCR5 (CD195) являются основными корецепторами ВИЧ, участвующими в механизмах связывания и проникновения ВИЧ в клетки человека. В зависимости от характера используемых корецепторов и тропности ВИЧ к клеткам выделяют 3 варианта вируса: CCR5/M (R5)-тропный вирус, CXCR4/T(X4)-тропный вирус, вирус с двойным тропизмом R5/X4. R5-тропный вирус использует для проникновения в клетку молекулы CD4 и ХР CCR5, в то время как X4-тропный ВИЧ — CD4 и ХР CXCR4 [1, 5].

Известно, что экспрессия ХР $CXCR4^+$- и $CCR5^+$-рецепторов обнаруживается на взаимно противоположных субпопуляциях лимфоцитов периферической крови (ЛК). CXCR4 экспрессированы преимущественно на покоящихся, неактивированных наивных Т-лимфоцитах ($CD26^{low}$ $CD45RA^+$ $CD45RO^-$). В то время как $CCR5^+$-Т-лимфоциты имели фенотип ($CD26^{high}$ $CD45RA^-$ $CD45RO^+$), что соответствует активированным клеткам памяти [6–8].

Цель исследования: оценить частоту маркеров активации и торможения иммунного ответа у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС.

Материалы и методы. Показатели клеточного иммунитета были определены в 4-х группах пациентов. В 1 группу вошли 51 пациент с коинфекцией ВИЧ/ВГС, во 2 группу — 23 пациента с ВИЧ-инфекцией, в 3 группу — 10 пациентов с ВГС-инфекцией. Группу контроля составили 16 здоровых лиц (3 мужчин и 13 женщин, без маркеров парентеральных гепатитов и ВИЧ-инфекции, средний возраст 32,5 ± 15,1 года). Для определения клинической стадии ВИЧ-инфекции использовали классификацию ВОЗ (2006). Все пациенты в группах были обследованы на серологические маркеры HBV и ВГС методом ИФА. РНК и генотип ВГС определяли методом ПЦР с использованием тест-систем Амплисенс (Россия). Диагноз ВИЧ-инфекции верифицировали посредством определения антител к ВИЧ методом ИФА и иммуноблотом.

В работе были использованы следующие моноклональные антитела производства «Becton Dickenson» (США):

1) CD3 (SK7, FITC) / CD16 (B73.1, PE) + CD56 (NCAM 16.2, PE) / CD45 (2D1, PerCP) / CD19 (SJ25C1, APC)

2) CD4 (SK3, FITC) / CD8 (SK1, PE) / CD3 (SK7, PerCP)

3) HLA-DR (L243, APC)

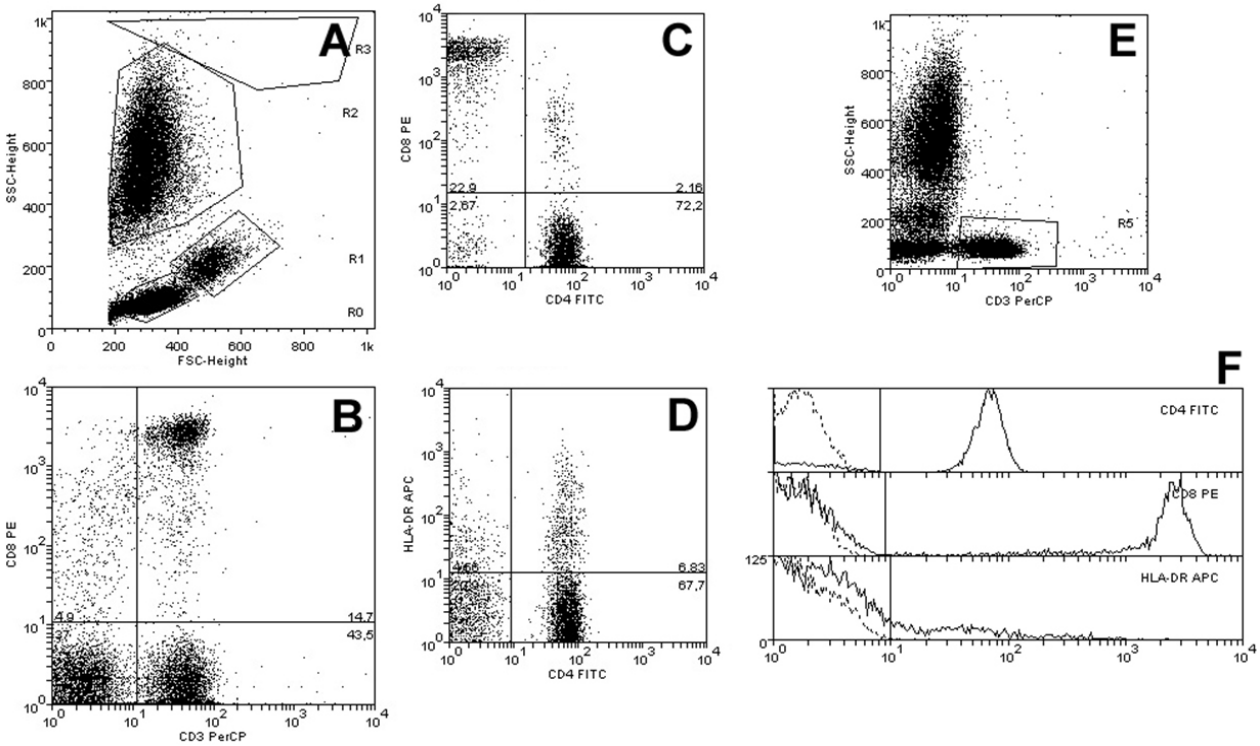
4) CD4 (SK3, APC)

5) CD184 (CXCR4) (12G5, PE)

6) CD195 (CCR5) (2D7 / CCR5, FITC)

7) CD25 (M-A251, FITC).

Для определения иммунофенотипа клеток кровь в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами 15 мин при 4 ºС. Затем эритроциты лизировали раствором хлорида аммония 15 мин при 18–25 ºС и центрифугировали пробирки 5 мин при 250 g для осаждения клеток, после чего удаляли супернатант. Клетки суспендировали в 200–300 мкл 1% раствора параформальдегида и проводили учет и анализ на проточном цитофлюориметре «FACSCalibur» («Becton Dickenson», США) с использованием программного обеспечения «CellQuest» 3.3 и «Weasel» версии 2.9 (WEHI, Австралия) (рисунок).



A — цитограмма светорассеяния в координатах FSC/SSC; регион R0 включает лимфоциты. B — цитограмма флюоресценции в координатах FL3/FL2. C — цитограмма флюоресценции в координатах FL1/FL2. D — цитограмма флюоресценции в координатах FL1/FL4. E — цитограмма флюоресценции в координатах FL3/SSC; регион R5 создан для выделения $CD3^+$-клеток. F — гистограммы флюоресценции по каналам FL1, FL2, FL4; сплошной линией показана экспрессия молекул клетками после инкубации с соответствующими антителами, пунктирной — после инкубации с изотипическими контролями

Рисунок — Анализ иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови (контрольная группа)

Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере с использованием пакета «Statistica» версии 8. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро-Вилка. Для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна — Уитни. Для сравнения трех групп независимых данных был использован метод рангового анализа вариаций Краскела — Уоллиса (H-критерий). В случае если уровень значимости составлял меньше 0,05, проводили парное сравнение данных между группами, используя метод Манна — Уитни. Для определения зависимостей между показателями использовали коэффициент корреляции Спирмана (R).

В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1 — Характеристика пациентов в группах наблюдения

Показатель	1 группа ВИЧ/ВГС n = 51	2 группа ВИЧ n = 23	3 группа ВГС n = 10
1	2	3	4
Возраст, годы	34,1 ± 5,9	33,4 ± 6,3	40,3 ± 11,7
Мужчины, абс.(%)	39 (76,5)	11(47,8)	7 (70)
Женщины, абс. (%)	12 (23,5)	12 (52,2)	3 (30)
Потребители инъекционных наркопрепаратов (ПИН) n (%)	28 (54,9)***	—	1(10)

Продолжение табл. 1

1	2	3	4
1 клиническая категория, n (%)	22 (43,1)	16 (69,6)	
2 клиническая категория, n (%)	23 (25,1)***	2 (8,7)**	
3 клиническая категория, n (%)	4 (7,8)	4 (17,4)	
4 клиническая категория, n (%)	2 (3,9)	1 (4,4)	
СПИД, n (%)	12 (23,5)	6 (26,1)	
антиретровирусная терапия АРТ, n (%)	17 (33,3)	6 (26,1)	

Примечания:
1. ** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 1 группы
2. *** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 2 группы, тест χ^2

Как видно из представленной таблицы, возраст не различался достоверно в группах пациентов. В 1 и 3 группах пациентов было большинство мужчин, в то время как во 2 группе распределение пациентов по полу было приблизительно одинаковым. Парентеральный путь инфицирования ВИЧ в связи с употреблением наркопрепаратов был установлен в 55% случаев в 1 группе, в 10% в 3, и не отмечен во 2 группе.

АРТ получали 17 (33,3%) пациентов в 1 группе и 6 (26,1%) — во 2 группе.

Иммунологические показатели, характеризующие основные субпопуляции лимфоцитов и, следовательно, иммунологическую стадию ВИЧ-инфекции представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Показатели содержания Т-лимфоцитов и их субпопуляций в группах наблюдения

Показатели, Mean ± SD	Контроль n = 16	1 группа ВИЧ/ВГС n = 51	2 группа ВИЧ n = 23	3 группа ВГС n = 10
$CD3^+$ (%)	70,9 ± 6,3	81,2 ± 7,1*	79,7 ± 10,7*,****	76,3 ± 5,8***
$CD3^+$ (кл/мкл)	1684,2 ± 536,9	1616,1 ± 676,4	1517,6 ± 735,1	1597,1 ± 644,2
$CD3^+CD4^+$ (%)	41,9 ± 7,6	22,3 ± 9,9*,****	26,2 ± 11,5 *,****	39,1 ± 8,5**,***
$CD3^+CD4^+$ (кл/мкл)	1014,0 ± 413,4	475,8 ± 326,2*,****	501,3 ± 331,3*	823,5 ± 349,5**
$CD3^+CD8^+$ (%)	24,7 ± 6,1	55,3 ± 12,5*,****	50,6 ± 15,0*,****	33,0 ± 6,9*,**,***
$CD3^+CD8^+$ (кл/мкл)	565,2 ± 161,3	1064,3 ± 448,1*,****	962,2 ± 527,6 *,****	699,1 ± 386,2**,***
CD4/CD8	1,8 ± 0,7	0,5 ± 0,3*,****	0,6 ± 0,5*,****	1,3 ± 0,5*,**,***

Примечания**:**
1. * — $p < 0,05$ при сравнении с контролем
2. ** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 1 группы
3. *** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 2 группы
4. **** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 3 группы, тест Манна — Уитни

Как видно из таблицы 2, содержание $CD3^+$-Т-лимфоцитов было достоверно выше во всех группах пациентов по сравнению с К, что связано с вовлечением Т-клеточного звена иммунитета в ИО при рассматриваемых инфекциях. Однако абсолютное число $CD3^+$-лимфоцитов не различалось достоверно в группах пациентов и К. Отмечено достоверное снижение относительного содержания $CD3^+CD4^+$ в 1 и 2 группах пациентов по сравнению с К и 3 группой, что связано с преимущественным поражением данных клеток при ВИЧ-инфекции. Абсолютное число Т-хелперов $CD3^+CD4^+$ в 1 и 2 группах также было достоверно ниже по сравнению с К, а в 1 группе также ниже, чем в 3.

Как представлено в таблице 2, показатель $CD3^+CD8^+$ как в относительных, так и в абсолютных значениях был достоверно выше в группах ВИЧ-инфицированных пациентов по сравнению с контролем и 3 группой, что указывает на более выраженную активацию Th1-типа иммунного ответа по сравнению с ВГС-инфекцией.

Исходя из представленного выше, закономерным является снижение иммунорегуляторного индекса (ИРИ) CD4/CD8 по сравнению с контролем во всех группах пациентов. Однако в 1 и 2 группах отмечено более выраженное снижение ИРИ также при сравнении с 3 группой.

Экспрессия HLA-DR на различных клетках в группах пациентов представлена в таблице 3.

Таблица 3 — Показатели HLA-DR в группах пациентов

Показатели Mean ± SD	Контроль n = 16	1 группа ВИЧ/ВГС n = 51	2 группа ВИЧ n = 23	3 группа ВГС n = 10
HLA-DR (%)	22,9 ± 5,8	43,9 ± 15,7*,****	38,6 ± 15,2*,****	21,7 ± 9,9
HLA-DR кл/мкл	563,6 ± 277,0	795,6 ± 355,1*,****	745,2 ± 502,9	503,8 ± 412,7
$CD3^+HLA\text{-}DR^+$ (%)	9,5 ± 5,0	32,9 ± 15,1*,****	28,6 ± 14,8*,****	10,9 ± 6,8
$CD3^+HLA\text{-}DR^+$ кл/мкл	220,3 ± 144,6	594,5 ± 321,3*,****	532,1 ± 391,5*,****	246,6 ± 231,4
$CD4^+HLA\text{-}DR^+$ (%)	5,1 ± 1,8	4,3 ± 1,7	4,3 ± 2,2*	4,3 ± 2,0
$CD4^+HLA\text{-}DR^+$ кл/мкл	121,8 ± 67,6	78,5 ± 46,0*	79,2 ± 44,8*	89,8 ± 48,9
$CD8^+HLA\text{-}DR^+$ (%)	7,6 ± 4,5	31,9 ± 14,1*,****	28,4 ± 13,6*,****	9,2 ± 5,3
$CD8^+HLA\text{-}DR^+$ кл/мкл	182,2 ± 144,2	580,1 ± 319,1*,****	536,1 ± 380,5*,****	206,0 ± 187,0

Примечания**:**

1. * — $p < 0,05$ при сравнении с контролем
2. ** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 1 группы
3. *** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 2 группы
4. **** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 3 группы, тест Манна — Уитни

Как видно из таблицы 3, в 1 и 2 группах отмечена повышенная частота экспрессии HLA-DR на ЛК, $CD3^+$- и $CD8^+$-Т-лимфоцитах по сравнению как с К, так и с 3 группой пациентов (моно-ВГС), что ассоциируется с более выраженной активацией ИС при ВИЧ-инфекции [2]. В группе коинфекции отмечено отсутствие различий в относительном показателе частоты экспрессии HLA-DR на $CD4^+$-клетках с таковым как в К, так и в 3 группе. Снижение абсолютного показателя $CD4^+HLA\text{-}DR^+$ по сравнению с таковым в К отмечено в 1 и 2 группах. CD4-молекулы являются корецепторами для распознания HLA-DR на АПК, чем можно объяснить снижение частоты экспрессии HLA-DR на $CD4^+$-клетках у ВИЧ-инфицированных пациентов, кроме того абсолютный показатель $CD4^+$ Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции ниже, чем в группе К и 3 группе.

Показатели экспрессии молекул CD25 и CD4 на лимфоцитах периферической крови представлены в таблице 4.

Таблица 4 — Показатели экспрессии молекулы CD25 на клетках крови в группах пациентов

Показатели Mean ± SD	Контроль n = 16	1 группа ВИЧ/ВГС n = 51	2 группа ВИЧ n = 23	3 группа ВГС n = 10
$CD25^+$ (%)	5,7 ± 1,5	4,0 ± 1,9*	4,5 ± 3,8*	5,7 ± 3,2
$CD25^+$ кл/мкл	134,3 ± 56,1	78,6 ± 57,2*,****	86,0 ± 67,8*	108,5 ± 43,7**
$CD4^+$ $CD25^+$ (%)	3,9 ± 1,2	2,2 ± 1,3*,****	2,2 ± 1,1*,****	4,0 ± 1,9**,***
$CD4^+$ $CD25^+$ кл/мкл	92,7 ± 38,6	44,1 ± 40,9*,****	43,3 ± 30,8*,****	79,4 ± 34,5**,***

Примечания**:**

1. * — $p < 0,05$ при сравнении с контролем
2. ** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 1 группы
3. *** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 2 группы
4. **** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 3 группы, тест Манна — Уитни

Как видно из таблицы 4, в 1 и 2 группах отмечено снижение экспрессии $CD25^+$ в целом на клетках и снижение числа регуляторных $CD4^+CD25^+$-клеток, обладающих иммуносупрессивными свойствами, как по сравнению с К, так и по сравнению с 3 группой пациентов.

Показатели ТЛЕК у пациентов разных клинических групп представлены в таблице 5.

Таблица 5 — Показатели содержания ЕК и ТЛЕК в группах пациентов

Показатели Mean ± SD	Контроль n = 16	1 группа ВИЧ/ВГС n = 51	2 группа ВИЧ n = 23	3 группа ВГС n = 10
$CD3^+CD16^+$ $CD56^+$ (%)	5,9 ± 4,1	6,0 ± 3,5	6,6 ± 5,4	5,6 ± 3,5
$CD3^+CD16^+CD56^+$ (кл/мкл)	137,2 ± 114,7	106,8 ± 71,9	137,9 ± 153,0	100,6 ± 42,3

Как видно из таблицы 5, ТЛЕК (относительный и абсолютный показатели) не различались достоверно в группах пациентов.

Экспрессия ХР на лимфоцитах ассоциируется с определенным типом ИО. Так, доказано, что экспрессия ХР CCR5 выявлена лишь на Th1-хелперах, и не обнаружена на Th2. В то же время клетки Th2-типа экспрессируют ХР CXCR4 и CCR8 [6, 9].

Результаты изучения экспрессии ХР CXCR4 и CCR5 представлены в таблице 6.

Таблица 6 — Показатели экспрессии CXCR4 и CCR5 лимфоцитами периферической крови в группах пациентов

Показатели Mean ± SD	Контроль n = 16	1 группа ВИЧ/ВГС n = 51	2 группа ВИЧ n = 23	3 группа ВГС n = 10
$CXCR4^+$ (%)	16,0 ± 4,5	14,7 ± 7,2	17,1 ± 9,8	19,3 ± 9,0
$CXCR4^+$ кл/мкл	386,8 ± 194,1	286,4 ± 198,4*	340,8 ± 273,8	446,3 ± 340,4
$CD4^+CXCR4^+$ (%)	4,7 ± 2,1	5,1 ± 4,2	6,8 ± 4,8	7,3 ± 4,5
$CD4^+CXCR4^+$ кл/мкл	118,0 ± 82,0	103,7 ± 104,1	132,6 ± 123,9	168,8 ± 154,1
$CCR5^+$ (%)	21,4 ± 6,5	33,8 ± 13,4*,****	27,7 ± 11,3****	18,8 ± 6,8**,***
$CCR5^+$ кл/мкл	499,3 ± 203,2	597,7 ± 273,7****	541,1 ± 365,5	379,4 ± 178,2**
$CD4^+CCR5^+$ (%)	6,6 ± 3,0	3,3 ± 2,0*,****	2,9 ± 1,6*,****	6,2 ± 3,5**,***
$CD4^+CCR5^+$ кл/мкл	158,4 ± 108,2	60,1 ± 41,0*,****	54,1 ± 34,6*,****	119,8 ± 49,1**,***
$CD4^+CXCR4^+CCR5^+$ (%)	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3****	0,4 ± 0,5****	0,6 ± 0,5**,***
$CD4^+CXCR4^+$ $CCR5^+$ кл/мкл	8,6 ± 10,0	5,0 ± 4,8****	6,0 ± 6,6****	13,5 ± 14,1**,***

Примечания**:**

1. * — $p < 0,05$ при сравнении с контролем
2. ** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 1 группы
3. *** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 2 группы
4. **** — $p < 0,05$ при сравнении с пациентами 3 группы, тест Манна — Уитни

Как представлено в таблице 6, абсолютное число $CXCR4^+$ ЛК было достоверно ниже в 1 группе, хотя экспрессия данного ХР на $CD4^+$ не различались в группах пациентов.

Установлены корреляционные связи относительного числа $CXCR4^+$-клеток с рядом других показателей:

1. прямая корреляционная связь с числом $CD4^+CXCR4^+$-Т-лимфоцитов во всех группах наблюдения, что связано с преимущественной экспрессией молекулы CXCR4 на Т-клетках;

2. прямая коррелятивная связь с числом $CD3^+CD4^+$-клеток в группе К ($R = 0,69$, $p < 0,05$), в 1 группе ($R = 0,39$, $p < 0,05$) и 2 ($R = 0,5$, $p < 0,05$);

3. обратная коррелятивная связь с показателем $CD3^+CD8^+$ в 1 группе исследования ($R = –0,28$, $p < 0,05$);

4. прямая коррелятивная связь с числом $CD3^+CD16^+CD56^+$ ТЛЕК в группе К ($R = 0,80$, $p < 0,05$) и группе ВГС-инфекции (3 группа) ($R = 0,83$, $p < 0,05$);

5. обратная коррелятивная связь с показателем $CD25^+$ в 3 группе ($R = –0,67$, $p < 0,05$).

Таким образом, отмечены прямые корреляционные связи $CXCR4^+$ с маркерами торможения ИО и обратные корреляции с показателями активации ИО во всех изучаемых группах пациентов.

Относительное число $CCR5^+$-ЛК было достоверно выше в группе коинфекции ВИЧ/ВГС по сравнению с К. Обращает на себя внимание, что экспрессии CCR5 на ЛК, в 1 и 2 группах ВИЧ-инфицированных пациентов была более высокой, чем в группе моноинфекции ВГС (3 группа).

В противоположность CXCR4, не отмечено прямых корреляций между показателем CCR5 и $CD4^+CCR5^+$, что связано с частой экспрессией данного показателя на клетках, не относящихся к системе Т-лимфоцитов: макрофагах, моноцитах, эозинофилах, базофилах, микроглии, ЕК. Относительный показатель $CD4^+CCR5^+$ в 1 и 2 группах был достоверно ниже по сравнению с таковым в К и 3 группе, абсолютный показатель в 1 и 2 группах был ниже по сравнению с таковым в 3 группе, что вероятно связано с использованием ВИЧ данного CCR5 как корецептора $CD4^+$ для проникновения в клетки человека с первых дней после инфицирования [1].

Т-хелперы с двойным фенотипом ($CD4^+CXCR4^+CCR5^+$) встречались чаще у пациентов 3 группы, чем у ВИЧ-инфицированных (1 и 2 группа).

В отличие от показателя CXCR4 установлена обратная коррелятивная связь между экспрессией $CCR5^+$-ЛК и числом $CD3^+CD4^+$-лимфоцитов в К ($R = –0,5$, $p < 0,05$), в 1 группе ($R = –0,63$, $p < 0,05$) и во 2 ($R = –0,60$, $p < 0,05$). Обнаружена прямая коррелятивная связь экспрессии молекулы CCR5 с $CD3^+CD8^+$ в 1 ($R = 0,47$, $p < 0,05$) и 2 ($R = 0,83$, $p < 0,05$) группах что подтверждает связь данного ХР с ИО Th1-типа в группах ВИЧ-инфицированных пациентов.

В противоположность CXCR4 обнаружена прямая корреляция CCR5 с маркерами активации ИО, показателем HLA-DR: в группе К — $CD3^+HLA^+$ ($R = 0,51$, $p < 0,05$), в 1 группе — HLA-DR ($R = 0,63$, $p < 0,05$), $CD3^+HLA^+$ ($R = 0,67$, $p < 0,05$), $CD3^+CD8^+HLA^+$ ($R = 0,67$, $p < 0,05$); во 2 группе — HLA-DR ($R = 0,56$ $p < 0,05$), $CD3^+HLA^+$ ($R = 0,74$, $p < 0,05$), $CD3^+CD8^+HLA^+$ ($R = 0,72$, $p < 0,05$); в 3 группе — $CD3^+HLA^+$ ($R = 0,66$, $p < 0,05$), $CD4^+$HLA-DR^+ ($R = 0,65$, $p < 0,05$).

В то же время показатели торможения ИО имели обратные корреляции с CCR5. Так, установлена обратная корреляция между $CD3^+CD16^+CD56^+$ ТЛЕК и CCR5-экспрессирующих лимфоцитов в 1 группе ($R = –0,42$, $p < 0,05$) и во 2 группе ($R = –0,61$, $p < 0,05$), а также между $CD4^+CD25^+$ и CCR5 в 1 группе пациентов ($R = –0,42$, $p < 0,05$).

Таким образом, экспрессия CXCR4 ассоциировалась с торможением активности ИО, в то время как CCR5 — с активацией клеточного ИО.

Заключение. Исходя из анализа полученных результатов и данных литературы, можно заключить, что у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС отмечена хроническая активация иммунной системы, что проявилось повышением уровня экспрессии маркеров активации иммунной системы (МНК II типа на ЛК, $CD3^+$-лимфоцитах, цитотоксических Т-лимфоцитах, CCR5 на ЛК) и снижением маркеров торможения ИО (CXCR4, $CD4^+CD25^+$) по сравнению с пациентами с ВГС-инфекцией и контролем. При хронической коинфекции ВИЧ/ВГС отмечена активация ИО по Th1-типу по сравнению с моноинфекцией ВГС. Не выявлено различий в частоте маркеров активации и торможения ИО в группах коинфекции ВИЧ/ВГС и ВИЧ-инфекции, что указывает на доминирующее влияние ВИЧ-инфекции по сравнению с ВГС-инфекцией при формировании ИО у пациентов с коинфекцией.

Литература

1. Levy, J.A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges / J.A. Levy // AIDS. — 2009. — Vol. 23. — P. 147–160.

2. Activation and cell cycle antigens in $CD4^+$ and CD8+ T cells correlate with plasma human immunodeficiency virus (HIV-1) RNA level in HIV-1 infection / J.M. Orendi [et al.] // J. Infect. Dis. — 1998. — Vol. 178, N 5. — P. 1279–1287.

3. Хаитов, Р.М. Иммунология: учебник / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович. — М.: Медицина, 2000. — 432 с.

4. Ji, J. HIV-1 binding to CD4 on CD41CD251 regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in, peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression / J. Ji, M.W. Cloyd // Int. Immunol. — 2009. — Vol. 21, N 3. — P. 283–294.

5. CXCR4–CCR5: a couple modulating T cell functions / R.L. Contento [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — Vol. 105, N 29. — P. 10101–10106.

6. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes / C.C. Bleul [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94. — P. 1925–1930.

7. CCR5 chemokine (C-C motif) receptor 5 [*Homo sapiens*] [Electronic resource] // Gene ID: 1234, updated on 3-Jul-2011. — Mode of access: www.pubmed.com. — Data of access: 03.07.2011.

8. CXCR4 chemokine (C-X-C motif) receptor 4 [*Homo sapiens*] [Electronic resource] // Gene ID: 7852, updated on 3-Jul-2011. — Mode of access: www.pubmed.com. — Data of access: 03.07.2011.

9. Stein, J.V. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview / J.V. Stein, C. Nombela-Arrieta // Immunology. — 2005. — Vol. 116, N 1. — P. 1–12.

Поступила 16.08.2011

MARKERS OF ACTIVATION AND SUPPRESSION OF IMMUNE RESPONSE IN HIV/HCV COINFECTED PATIENTS

Matsiyeuskaya N.V.[1], Tsyrkunov V.M.[1], Hancharou A.Y.[2]

[1]Grodno State Medical University, Grodno, Belarus;
[2]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

Markers of activation and suppression of immunity response (HLA-DR, CD25, B-cells, T-cells and its' subpopulations and chemokine receptors CXCR4 and CCR5 have been studied in 3 groups of patients: the 1st group — 51 patients with coinfection HIV/HCV, the 2nd group — 23 patients with HIV-infection, the 3rd group — 10 patients with HCV-infection. Control group consisted of 16 healthy adult persons. The activation of immune system in patients with coinfection HIV/HCV was established. In the 1st group the expression of CXCR4 on blood lymphocytes was in comparison with control and at the same time the expression of CCR5 by blood lymphocytes was increased in comparison with HVC-infected group of patients. These data assume stronger Th1 immune response in HIV/HCV coinfected patients in comparison with HVC-infected patients.

Keywords: HIV, HCV, coinfection, immune response, chemokine receptors, CCR5, CXCR4.

THE IMPACT OF BETA-HERPESVIRUSES INFECTION ACTIVATION ON EARLY COMPLICATIONS DEVELOPMENT FOLLOWING RENAL TRANSPLANTATION

Chapenko S.[1], Ziedina I.[2], Folkmane I.[2], Sultanova A.[1], Rozental R.[2], Murovska M.[1]

[1]A. Kirchenstein Institute of Microbiology and Virology, Riga Stradins University;
[2]P. Stradins University Hospital, Renal Transplantation Centre of Latvia, Riga, Latvia

Resume. CMV, HHV-6, HHV-7 are ubiquitous immunomodulating viruses belong to the family *Herpesviride* subfamily *β-herpesvirine*. The viruses can be reactivated from latency in the period of immunosuppression, especially after renal transplantation (RT). Assessment of the contribution of each virus in post-transplant complications development is difficult due to their concurrent infection as well as their possible simultaneous reactivation after RT. CMV is the known pathogen in post-transplant complications development with well documented clinical spectrum of the active infection. The role of HHV-6 and HHV-7 in these processes are evaluated differently. **The aim** of this study was to determine β-herpesviruses infection activation during early period after renal transplantation and to evaluate the possible influence of these viruses infection activation on the complications development in renal transplant patients. Latent/persistent and active viral infection was studied in 46 renal allograft recipients before and early period (3 months) after RT and in 27 deceased renal donors using serological method (ELISA) and qualitative PCR. Restriction endonuclease analysis was carried out using enzyme *Hind*III for the detection HHV-6A and HHV-6B virus variants. CMV seroprevalence rate was 77.8% among the donors and 81.5% among the recipients; HHV-6 - 81.5% and 80.4%, respectively. Active single HHV-6 and single HHV-7 infection (plasma viremia) only was found in 17.4% recipients before RT. The frequency of active viral infection was significantly higher in the recipients after RT then before RT (58.7%, p=0.0001). Activation of single CMV and concurrent (CMV+HHV-7, HHV-6+HHV-7, CMV+HHV-6+HHV-7) infection was detected only after RT. Clinical complications which may be associated with beta-herpesviruses activation, were diagnosed in 9 recipients. In two from them unclear etiology acute hepatitis was observed and active HHV-6 and CMV+HHV-6-+HHV-7 was detected; in two — "CMV disease" was diagnosed and active dual (CMV+HHV-7) and triple (CMV+HHV-6+HHV-7) infection was found. In 5 recipients AR episodes was diagnosed and activation of HHV-7 was detected in 3 from them, HHV-6 – in one and HHV-6+HHV-7 – in one recipients. Only HHV-6B variant was detected in the HHV-6 DNA positive PBL (11) and plasma (7) samples. Taking into account, that as single as well as concurrent beta-herpesviruses infection is an increased risk factors for the development of complication in recipients after RT. The detection of simultaneous activation of several viruses by concurrent infection suggest relationship between beta-herpesviruses viruses.

Keywords: renal transplantation, beta-herpesviruses infection, activation, post-renal complications.

Introduction. Cytomegalovirus (CMV), Human herpesvirus 6 and 7 (HHV-6, HHV-7) are closely related viruses classified into the family *Herpesviride* subfamily *β-herpesvirine* [1]. The viruses are ubiquitous (seroprevalence rate in adult's 50–90%) immunomodulating viruses that after primary infection establish a lifetime latent/persistent infection and can be reactivate in immunocompromised and immunosuppressed hosts, especially after renal transplantation (RT) [2]. Both HHV-6 and HHV-7 are lymphotropic viruses but HHV-6 may also infect other cell types, such as monocytes, epithelial and endothelial cells [3]. HHV-6 isolates are classified into two variants (termed HHV-6A and HHV-6B). The specific pathogenicity of each variant remains poorly understood [4]. Most infections in renal transplant recipients are due to HHV-B.

The clinical spectrum of active CMV infection in immunosuppressed patients in the early period after RT is wide and includes a "viral syndrome" (fever, leukopenia and/or thrombocytopenia, arthralgia, myalgia, anorexia) and tissue-invasive "CMV disease" (pneumonia, hepatitis, gastritis, enteritis, encephalitis). The widespread use of antiviral prophylaxis and preemptive therapy has markedly diminished the incidence of CMV-related morbidity in allograft recipients however at the risk for the development of "late" CMV disease remain [5].

Both HHV-6 and HHV-7 active infection has been associated with an increased risk of viral syndrome and "CMV disease" developing as opportunistic infections in RT recipients [6-8]. It has been suggested that the HHV-6 infection and activation result in clinical symptoms, including fever, skin rash, interstitial pneumonitis, hepatitis, bone marrow suppression, encephalitis, and rejection [9]. In contrast to studies of HHV-6 infection in organ-transplant recipients, the number of studies examining HHV-7 infection in these patients is limited. According to several recent studies, HHV-7 may act as a co-factor for HHV-6, CMV activation and "CMV disease" development in organ-transplant recipients [10]. At present, no effective specific antiviral treatment for HHV-6 and HHV-7 reactivation has been identified. Efficiency of gancyclovir prophylaxis for prevention of these viruses activation remains contradictory [9, 10].

The aim of this study was to determine β-herpesviruses infection activation during early period after renal transplantation and to evaluate the possible influence of these viruses infection activation on the complications development in renal transplant patients.

Patients and Methods. ***Patients.*** Forty-six renal allograft recipients, who were transplanted during 2007 year in the Transplantation Centre of the Stradins University Hospital of Riga, and 27 deceased renal donors were included in this study. The medium age of patients was 42 yr (range 16–63 yr). Initial immunosuppression in all patients consisted of cyclosporine (CsA), mycophenolate mofetil (MMF) and prednisolone (P) and induction with monoclonal anti-CD25 antibodies (Basilixibam/Daclizumab). Maintenance immunosuppression consisted of CsA, MMF and P. A treatment with oral CsA in microemulsion which was started before surgery (10 mg/kg/d) to obtain therapeutic CsA blood levels and then was adjusted, based on target through levels 150–250 ng/ml during the first four weeks and at 150–200 ng/ml thereafter. The maintenance dose of orally administered MMF was 1.0–2.0 g/d. Methylprednisolone 5.0 mg/kg/d was administered on three consecutive days from the day of RT. Oral prednisolone was started on the first day after operation at 0.5 mg/kg/d and reduced gradually till 5.0–10 mg/d. Acute rejection (AR) episodes were diagnosed on the basis of a rise in serum creatinine (>25% from baseline), clinical evidence, and graft biopsy. AR episodes were treated with i.v. methylprednisolone. In ineffective treatment cases, the course was repeated or administered by polyclonal antithymocitary globulin (ATG). The patients with high (donor [D]+/recipient [R]-) and moderate (D+/R+, D-/R+) risk for CMV disease, as well as patients with ATG therapy, had received gancyclovir (GCV) orally 5 mg/kg/day twice per day for 2 weeks). GCV dose was adjusted to renal function and to viral infection activity. The cohort was established with the approval of the Ethics Committee of the Riga Stradins University and all participants gave their informed consent prior to the examination.

CMV and HHV-6 serology. The serum samples were tested for CMV IgG (Abbott) and IgM (Imx, Abbott) class antibodies by microparticle enzyme immunoassay (MEIA). Antibody testing for HHV-6 in the serum/plasma samples was carried using HHV-6 IgG and IgM ELISA kits (Panbio, Australia) according to manufacturer's recommendation.

Nested polymerase chain reaction (nPCR) was used for the detection of viral genomic sequences in peripheral blood leukocytes (PBL) DNA and cell free plasma DNA (markers of latent/persistent and active infection, respectively) samples of patients before and at 7–14 days and 12 weeks after transplantation. Total DNA was isolated from blood by phenol-chloroform extraction. For DNA purification from plasma, QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen) was used. To assure the quality of the PBL DNA, as well as exclude

contamination of plasma DNA by cellular DNA, a β-globin PCR was performed. The detection of HHV-6, HHV-7 and CMV DNA was performed according Secchiero et al. [11], Berneman et al. [12] and Studahl et al. [13], respectively. Positive (virus genomic DNA) and negative (DNA without virus-specific sequences) as water controls were included in each experiments.

Restriction endonuclease analysis was carried out using enzyme *Hind*III for the detection HHV-6A and HHV-6B virus variants [11].

Statistical difference in the prevalence of latent/persistent and active CMV, HHV-6 and HHV-7 infection before and after RT was assessed by Fisher's exact test.

Results. According data of serologic study specific anti-CMV antibodies was detected in 77.8% (21/27) of the donors (IgM+IgG – 2/27, IgG – 19/27) and in 80.4% (37/46) of the recipients before RT (IgM – 1/46, IgM+IgG – 4/46, IgG – 32/46). Specific anti-HHV-6 IgG class antibodies were found in 81.5% (22/27) of the donors and in 80.4% (37/46) of pre-transplant patients (IgG – 36/46, IgM+IgG – 1/46).

Viral infections in the donors and recipients before RT (nPCR). Latent/persistent beta-herpesviruses infection was detected in 81.5% (22/27) of donors. From them single viral infection was revealed in 55.6% (15/27) of donors (CMV infection 2/27, HHV-6 – 1/27, HHV-7 infection – 12/27) and concurrent viral infections - in 26.0% (7/27) of the donors (CMV+HHV-7 – 2/27, HHV-6+HHV-7 – 4/27, CMV+HHV-6+HHV-7 -1/27). Active viral infection was detected in 14.8% (4/27) of the donors (CMV – 2/27, HHV-7 – 2/27).

Viral genomic sequences in PBL DNA were detected in 81.5% (40/46) of pre-transplant recipients and in 17.4% (8/46) from them plasma viremia (HHV-6 -1, HHV-7 -7) was revealed (Table). In six recipients beta-herpesviruses genomic sequences in PBL and plasma DNA was not detected.

Prevalence of active beta-herpesviruses infection in patients after RT (nPCR). After two weeks the rate of active viral infection (17/46, 37.0%) was significantly higher in comparison with the frequency before RT ($p = 0.013$). From 17 recipients active single HHV-6 infection in two patients, active HHV-7 infection — in 14 and dual HHV-6+HHV-7 infection — in one patient was revealed.

Presence of beta-herpesviruses genomic sequences in PBL and in plasma DNA samples from the patients before and after renal transplantation (RT) detected by nPCR

Viral infection	Before RT		After RT (3 months)
	PBL	Plasma	Plasma
Single CMV	3/46	0/3	2/3
Single HHV-6	1/46	1/1	1/1
Single HHV-7	21/46	8/21	12/21
Dual CMV+HHV-6	0/46	0	0
Dual CMV+HHV-7	5/46	0/5	5/5 (CMV-1, HHV-7-2, CMV+HHV-7- 2)
Dual HHV-6+HHV-7	7/46	0/7	4/7 (HHV6-1, HHV-7-1, HHV-6+HHV-7-2)
Triple CMV+HHV-6+HHV7	3/46	0/3	3/3 (HHV-6-1, CMV+HHV-6+HHV-7-2)
CMV+	11		7
HHV-6+	11	1	6
HHV-7+	36	8	21
Negative for all	6/46		
Positive for 1 or more	40/46		

After three months the frequency of active viral infection (27/46, 58.7%) considerably exceed the frequency of active infection as before as well as in two weeks after RT ($p = 0.0001$ and $p = 0.042$, respectively) (Table). For the first time the activation of single CMV infection, dual CMV+HHV-7 infection, CMV+HHV-6+HHV-7 infection was detected (Table). The increase of the rate of active dual HHV-6-+HHV-7 and single HHV-7 infection in this time period was revealed in compare to the rate before and two weeks after RT.

Only HHV-6B variant was detected in the HHV-6 DNA positive PBL (11) and plasma (7) samples.

Relationship between active beta-herpesviruses infection and clinical complications development after RT. Different clinical complications in early period (3 months) after RT, which may be associated with

beta-herpesviruses activation, were detected in 9 out of 27 (33.3%) recipients. Seven out of 9 patients received antiviral prophylaxis with ganciclovir or ganciclovir and valgancyclovir. In 5 recipients AR episode was diagnosed and activation of HHV-7 (3/5), HHV-6 (1/5) and HHV-6+HHV-7 (1/5) was detected. The unclear etiology acute hepatitis was observed in the two patients and in one from them active triple (CMV+HHV-6+HHV-7) infection and active single HHV-6 infection in other was found. Active dual CMV+HHV-7 infection in one patients and triple CMV+HHV-6+HHV-7 infection in the other patient with "CMV disease" was detected.

Discussion. A large number of new effective immunosuppressive drugs are available and antiviral therapy effective prevents acute rejection and "CMV disease" in RT patients [14]. However, despite to successful renal transplantation, the viral infections remains one of the causes of post-transplant morbidity and mortality. Ganciclovir is shown to be more effective in inhibition of CMV than HHV-6 or HHV-7 [9, 10, 15]. HHV-6 is reported as significant factor in complications development in solid organ transplant recipients however, the importance of HHV-7 infection in this process is still unknown.

Our data of the serological and virological studies shows that latent/persistent beta-herpesviruses infection is widely prevalent as in renal transplant donors as well as in recipients before RT, thus confirming the ubiquity of these viruses. Although CMV, HHV-6 and HHV-7 are ubiquitous, we found that HHV-6 and HHV-7 infection are dominant among these patients. Mentioned data give the possibility to determine the high-risk groups of RT patients for the viruses' reactivation after RT and to validity of antiviral prophylaxis application.

The presence active HHV-6 and HHV-7 infection before RT (17.4%) can be connected with impaired of cellular immune function in patients with end-stage renal failure and uraemic intoxication. We found significant increase of these viruses activation frequency in early period after RT (47.8%) that can be connected with immunosupressive regimen. It is possible that HHV-6 and HHV-7 might enhance the state of immunoderegulation due to their selective tropism to CD4+ T lymphocytes or alter cytokine profile. It supposition is coordinated with the data of Lusso [2] and Clark [8].

The possible relationship between beta-herpesviruses activation and complications development is connected with the presence of simultaneous dual HHV-6 and HHV-7 and triple CMV, HHV-6 and HHV-7 activation, confirming our previous reports [6, 7]. The unclear etiology of acute hepatitis and "CMV disease" observed only in recipients with active beta-herpesviruses infection (HHV-6 and CMV+HHV-6-+HHV-7, and CMV+HHV-7 and CMV+HHV-6+HHV-7, respectively). In this time we did not revealed association between activation of HHV-6 and HHV-7 infection and AR.

Only the HHV-6B variant is detected in PBL and plasma DNA samples from the patients with HHV-6 infection, indicating that either the HHV-6A variant occurs infrequently in these patients or it may be limited to sites other than the peripheral blood.

Acknowledgements. *This work was supported in part by the National Research Program in Medicine "Multi-Disciplinary Research Consortium on Major Pathologies Threatening the Life Expectancy and Quality of Life of the Latvian Population" project no.11 and grant "Role of blood-borne viruses infection in the development of post-transplant complications"*

References

1. Nicholas, J. Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus / J. Nicholas // J. Virol. — 1996. — Vol. 70. — P. 5975–5989.

2. Lusso, P. HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape / P. Lusso // J. Clin. Virol. — 2006. — Vol. 37, suppl. 1. — P. 4–10.

3. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6 / F. Santoro [et al.] // Cell. — 1999. — Vol. 99. — P. 817–827.

4. Identification of human herpesvirus 6 variants A and B by primer-specific realtime PCR may help to revisit their respective role in pathology / D. Boutelleau [et al.] // J. Clin. Virol. — 2006. — Vol. 35. — P. 257–263.

5. Prophylactic versus preemptive oral valgancyclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients / J.A. Khoury [et al.] // Am. J. Transplant. — 2006. — Vol. 6. — P. 2134–2143.

6. Co-infection of two β-herpesviruses (CMV and HHV-7 as an increased risk factor for "CMV disease" in patients undergoing renal transplantation / S. Chapenko [et al.] // Clin. Transplant. — 2000. — Vol. 14. — P. 486–492.

7. Infection of β-herpesviruses (CMV, HHV-6, HHV-7): role in post-renal transplantation / S. Chapenko [et al.] // Transplant. Proc. — 2001. — Vol. 33. — P. 2463–2464.

8. Clark, D.A. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7: emerging pathogens in transplant patients / D.A. Clark // Int. J. Hematol. — 2002. — Vol. 76, suppl. 2. — P. 246–252.

9. The prevalence of human herpesvirus-7 in renal transplant recipients is unaffected by oral or intravenous ganciclovir / D.C. Brennan [et al.] // J. Infect. Dis. — 2000. — Vol. 181. — P. 1557–1561.

10. Influence of ganciclovir prophylaxis on cytomegalovirus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7 viremia in renal transplant recipients / M.C. Galarraga [et al.] // Transplant. Proc. — 2005. — Vol. 37. — P. 2124–2126.

11. Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction / P. Secchiero [et al.] // J. Infect. Dis. — 1995. — Vol. 171. — P. 273–280.

12. Human herpesvirus 7 is T-lymphotropic virus and is related to, but significantly different from, human herpesvirus 6 human cytomegalovirus / Z.N. Berneman [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 10552–10556.

13. Detection of cytomegalovirus DNA in cerebrospinal fluid in immunocompetent patients as a sign of active infection / M. Studahl [et al.] // J. Med. Virol. — 1995. — Vol. 46. — P. 274–280.

14. Cytomegalovirus infection after solid-organ transplantation, its risk factors, direct and indirect effects and prevention strategies / M. Varga [et al.] // Orv. Hetil. — 2008. — Vol. 149. — P. 551–558.

15. An assessment of herpesvirus co-infection in patients with CMV disease: correlation with clinical and virologic outcomes / A. Humar [et al.] // Am. J. Transplant. — 2009. — Vol. 9. — P. 374–81.

Поступила 13.09.2011

ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ БЕТА-ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА РАЗВИТИЕ РАННИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧЕК

Чапенко С.[1], Зиедина И.[2], Фолкмане И.[2], Султанова А.[1], Розенталь Р.[2], Муровска М.[1]

[1]Институт микробиологии и вирусологии им. А. Кирхенштейна Рижского университета Страдыня;
[2]Больница Рижского университета Страдыня, Центр трансплантации почек, Рига, Латвия

Цитомегаловирус, герпесвирус человека -6, -7 (ЦМВ, ГВЧ-6, -7) являются широко распространенными иммуномодулирующими вирусами, которые классифицируются как семейство *Herpesviride подсемейство β-herpesvirine*. Вирусы могут реактивироваться в период иммуносупрессии, в частности, после пересадки почки. Оценка участия каждого вируса в развитии осложнений после трансплантации затруднена из-за наличия смешанных инфекций и возможности одновременной реактивации нескольких вирусов. ЦМВ является известным патогеном с хорошо документированным спектром осложнений при активной инфекции. Роль ГВЧ-6 и ГВЧ-7 активации в этих процессах оценивается неоднозначно.

Целью данного исследования было определение частоты реактивации данных вирусов в ранний период после трансплантации и оценка возможного влияния активации на развитие осложнений у реципиентов почечного трансплантата. Латентная и активная вирусные инфекции были изучены у 46 реципиентов до и в течение 3 месяцев после трансплантации и у 27 доноров трансплантата, используя серологический метод (ELISA) и качественную реакцию полимеразных цепей (РПЦ). Рестрикционно-ферментный анализ был осуществлен с рестриктазой *HindIII* для определения ГВЧ-6А и ГВЧ-6В вариантов вируса. Антитела к ЦМВ выявлены у 77.8% доноров и у 81.5% пациентов, к ГВЧ-6 — у 81.5% и 80.4% соответственно. Активная вирусная (ГВЧ-6 и ГВЧ-7) инфекция была определена до пересадки у 17.4% реципиентов и ее частота значимо возрастала после пересадки (58.7%), причем активация ЦМВ-инфекции и смешанных инфекций (ЦМВ+ГВЧ-7, ГВЧ-6+ГВЧ-7, ЦМВ+ГВЧ-6+ГВЧ-7) была выявлена только после пересадки. Клинические осложнения, которые могут быть ассоциированы с активацией вирусных инфекций, были диагностированы у 9 реципиентов. У 2 из них выявлен неясной этиологии острый гепатит и активная ГВЧ-6- и ЦМВ+ГВЧ-6+ГВЧ-7-инфекция. У 2 реципиентов была диагностирована ЦМВ-инфекция и активная двойная (ЦМВ+ГВЧ-7) и тройная (ЦМВ+ГВЧ-6+ГВЧ-7) инфекции. Эпизоды острого отторжения трансплантата наблюдались у 5 реципиентов и активация ГВЧ-7 была выявлена у 3 из них, ГВЧ-6 — у одного и ГВЧ-6+ГВЧ-7 — у одного реципиента. ГВЧ-6В вариант был определен в ДНК ГВЧ-6 положительных образцах периферической крови.

Заключение. Активные как одинарные так и смешанные бета-герпесвирусные инфекции являются повышенным фактором риска для развития осложнений у реципиентов почечного трансплантата. Выявленная одновременная активация нескольких вирусов позволяет предположить существование взаимодействия между ними.

Ключевые слова: трансплантация почки, бета-герпесвирусы, активация, постоперационные осложнения.

БАПНА-АМИДАЗНАЯ И ЛИЗИН-Р-НИТРОАНИЛИД-АМИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Окулич В.К., Сенькович С.А., Чередняк А.Н., Мацкевич Е.Л.

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

Резюме. В реакциях с хромогенными субстратами — бензоил-аргинин-р-нитроанилид (БАПНА) и лизин-р-нитроанилид (ЛПА) — исследована протеолитическая активность иммуноглобулинов класса G пациентов с острой и хронической хирургической инфекцией в сравнении с лицами без инфекционного процесса. Выявлено, что уровень БАПНА-амидазной активности у пациентов с хирургической инфекцией был достоверно выше, чем у лиц без гнойно-воспалительных процессов. Установлена связь уровня БАПНА-амидазной активности с клинико-лабораторными проявлениями заболевания. Уровень ЛПА-амидазной активности оказался крайне низким у пациентов с хирургической инфекцией и у лиц без гнойных процессов. Не обнаружено корреляции уровней БАПНА- и ЛПА-амидазной активностей между собой.

Ключевые слова: абзим, хирургическая инфекция, протеолитическая активность.

Введение. Развитие бактериального инфекционного процесса протекает в виде сложного взаимодействия микроорганизма с системой иммунитета макроорганизма. При этом микроорганизм воздействует на макроорганизм за счет своих факторов инвазии и агрессии, в том числе ферментов с различной субстратной специфичностью. Поскольку в активных центрах ферментов содержатся антигенные детерминанты, возможно образование антител к ним, у которых активный центр будет представлять собой как бы зеркальное отражение активного центра бактериальных ферментов. Далее, согласно теории идиотип-антиидиотипического взаимодействия [1], происходит образование антител второго порядка, активный центр которых будет являться зеркальным отражением активного центра первичных антител, то есть фактически повторять структуру активного центра микробных ферментов. Такие антитела могут приобретать способность катализировать химические реакции той же специфичности, что и ферменты-матрицы, а вследствие эволюции активного центра антител в процессе иммунного ответа возможно образование иммуноглобулинов и с другой специфичностью.

Антитела с собственной каталитической активностью получили название абзимы (от английской аббревиатуры antibody-enzyme, иначе — каталитические антитела) [2]. Развитие абзимологии началось с 1986 г., когда была опубликована работа Pollack S.J. с соавторами [3], хотя первые публикации о возможности антительного катализа появились значительно ранее [4]. При изучении каталитических антител основные усилия изначально были направлены на определение и исследование особенностей появления и механизма действия абзимов у здоровых лиц и пациентов с неинфекционной патологией. Был обнаружен ряд механизмов возникновения каталитических антител у пациентов с различными аутоиммунными процессами, системными заболеваниями соединительной ткани, а также у здоровых лиц [5]. Установлены механизмы абзимного катализа, доказано участие абзимов в патогенезе системных заболеваний соединительной ткани. Существует мнение о возможности протективного действия каталитических антител при различных патологических процессах [6]. Делаются попытки использования абзимов в терапии некоторых заболеваний.

Системного изучения каталитических антител при инфекционном процессе длительное время не проводилось. Публиковались лишь отдельные эпизодические работы, посвященные абзимам при некоторых инфекциях [7, 8]. Между тем антитела с каталитической активностью могут оказывать собственное влияние на развитие и течение инфекционного процесса, отличное от действия истинных ферментов за счет большей длительности и мягкости ферментного действия. Совершенно не исследована возможность прямого цитотоксического действия абзимов на клетки микроорганизмов, хотя, учитывая широкий спектр катализируемых реакций, длительность действия, повышение скорости катализа за счет «концентрации» абзимов на поверхности микроорганизма, такое воздействие представляется вполне возможным. Тем более что к настоящему времени показана возможность цитотоксического действия каталитических антител на эукариотические клетки [9, 10].

Наиболее удачной моделью для исследования каталитических антител при инфекционном процессе, с нашей точки зрения, является хирургическая инфекция, поскольку гнойно-воспалительные

процессы в хирургической практике, как правило, весьма выражены, что обеспечивает массивное воздействие бактериальных ферментов на макроорганизм. Кроме того, спектр синтезируемых ферментов у микроорганизмов — возбудителей хирургической инфекции — достаточно значителен. Наиболее перспективным для изучения видом каталитической активности мы считаем протеолитическую, поскольку соответствующие ферменты широко встречаются у возбудителей хирургической инфекции. Важно отметить, что абзимы могут обладать весьма высокой субстратной специфичностью, поэтому целесообразно определение протеолитической активности антител в реакциях с несколькими субстратами. При этом мы предпочли использовать хромогенные субстраты, поскольку в связи с относительной простотой постановки реакции это позволяет достичь высокой точности и воспроизводимости результатов.

Цель работы: оценить уровень протеолитической активности иммуноглобулинов у пациентов с хирургической инфекцией с использованием хромогенных субстратов — бензоил-аргинин-р-нитроанилида и лизин-р-нитроанилида.

Материалы и методы. Выделение и очистка иммуноглобулинов проводилась в несколько этапов. Первый этап — осаждение сыворотки крови 0,75% раствором риванола (2-этокси-6,9-диаминоакридина лактат) с последующей обработкой надосадка активированным углем. Затем проводили аффинную хроматографию полученного материала на агарозе, коньюгированной с протеином А золотистого стафилококка. Хроматографическую колонку последовательно отмывали 0,01 М фосфатным буферным раствором с pH 7,4, содержащим 1% раствор твин 20, и 0,01 М фосфатным буферным раствором с pH 7,4 без детергента до исчезновения белка в элюенте. Элюцию связавшихся с коньюгированным протеином А IgG вели 0,1 М глицин-HCl буфером с pH 2,8, которую контролировали по выходу белка с помощью метода Бредфорда.

Полученные иммуноглобулины концентрировали и дополнительно очищали переосаждением в 40% растворе сульфата аммония с последующим диализом против 2,5 л 0,9% NaCl четыре раза. В связи с тем, что подкласс 3 иммуноглобулинов G не связывается аффинно со стафилококковым протеином А, полученный препарат содержал только IgG подклассов 1, 2 и 4. Контроль чистоты полученных препаратов иммуноглобулинов проводили с помощью электрофореза в 10% и градиентном 4–20% полиакриламидном геле в присутствии додецил-сульфата натрия в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Гель окрашивали нитратом серебра. Для проверки стерильности полученного материала осуществляли выборочный посев проб иммуноглобулинов на кровяной агар и сахарный бульон.

Определения бензоил-аргинин-р-нитроанилид-амидазной (БАПНА) и лизин-р-нитроанилид-амидазной (ЛПА) активностей производили посредством модифицированных нами методов. В основе метода лежит изменение оптической плотности раствора вследствие высвобождения р-нитроанилина при расщеплении субстрата по амидной связи (аналог пептидной). Для оценки БАПНА-амидазной активности в реакционную смесь брали 0,1 мл раствора иммуноглобулинов на 0,9% NaCl в концентрации 1,5 мг/мл и 0,1 мл раствора БАПНА в концентрации 0,8 мг/мл на 0,02 М трис-буфере, pH 7,4. При определении ЛПА-амидазной активности реакционная смесь состояла из раствора иммуноглобулинов в концентрации 1 мг/мл и 0,1 мл раствора ЛПА в концентрации 0,8 мг/мл. В качестве отрицательного контроля использовали 0,1 мл физиологического раствора с 0,1 мл раствора БАПНА или ЛПА. Длительность инкубации составила 20 часов, после чего производился учет результатов реакции на многоканальном спектрофотометре АИФ-М/340 при длине волны 405 нм.

Для пересчета полученных единиц оптической плотности в пикокаталы при определении БАПНА-амидазной активности использовалась формула: $Y = 0{,}028 + 11 \times E_{оп}$, где $E_{оп}$ — разница между оптической плотностью пробы и оптической плотностью контроля. Предложенная формула была выведена на основе определения зависимости оптической плотности, измеренной на иммуноферментном анализаторе АИФ-М/340, от молярной концентрации р-нитроанилина в растворе (при распаде 1 молекулы БАПНА образуется 1 молекула р-нитроанилина). Нами был построен калибровочный график с коэффициентом корреляции 0,99 ($p < 0{,}001$). Учет результатов определения ЛПА-амидазной активности производился в единицах оптической плотности (ЕОП).

БАПНА-амидазная активность иммуноглобулинов была определена у 143 пациентов, которые были разделены на следующие группы: пациенты с хроническими остеомиелитами ($n = 40$),

с острыми гнойно-воспалительными заболеваниями (n = 35), с инфекцией челюстно-лицевой области (n = 33), группа пациентов без гнойно-воспалительных процессов (n = 20), которую составили лица, прооперированные по поводу заболеваний невоспалительной природы, находящиеся в послеоперационном периоде, протекающем без гнойных осложнений, и группа здоровых доноров (n = 15).

ЛПА-амидазная активность иммуноглобулинов была определена у 19 пациентов с острой хирургической инфекцией и у 5 человек без инфекционного процесса.

Статистическая обработка полученных результатов производилась посредством прикладных программ: Microsoft Excel 2000, BIOSTAT, Statgraphics Plus, Version 5.1. Для определения достоверности отличия между группами использовали критерий Манна — Уитни, поскольку распределение данных отличалось от нормального. Корреляции вычислялись методом Пирсона. Для оценки силы влияния использовали однофакторный и многофакторный дисперсионный анализ.

Результаты исследования. При исследовании БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов оказалось, что ее уровень в группах пациентов с гнойными процессами был достоверно выше, чем у пациентов без хирургической инфекции или здоровых доноров, причем достоверных отличий между группами в зависимости от остроты и локализации гнойного процесса выявлено не было (таблица).

Таблица — БАПНА-амидазная активность IgG

Группа	N	Медиана, Пкат	Процентиль, 25–75 Пкат	Достоверность отличий
1. Хронический остеомиелит	40	0,27	0–0,524	$P_{1-4} < 0,05$ $P_{1-5} < 0,01$ $P_{2-4} < 0,01$ $P_{2-5} < 0,001$ $P_{3-5} < 0,001$ $P_{3-4} < 0,05$
2. Острые гнойно-воспалительные заболевания	35	0,281	0,148–0,453	
3. Гнойно-воспалительные заболевания челюстно-лицевой области	33	0,226	0,149–0,361	
4. Пациенты без гнойных процессов	20	0,168	0,062–0,237	
5. Здоровые доноры	15	0,056	0,006–0,105	

Примечание — между остальными группами достоверных отличий не выявлено (p>0,05)

При изучении связи БАПНА-амидазной активности с клиническими данными была выявлена отрицательная корреляция между уровнем активности иммуноглобулинов и временем пребывания пациента в стационаре ($r = –0,43$; $n = 21$; $p < 0,05$). Вероятным объяснением этой связи мы считаем снижение продукции абзимов у лиц с иммунодефицитными состояниями, которые и находятся в стационаре более длительно. Не исключено, что более быстрое выздоровление у пациентов с высокой каталитической активностью антител свидетельствует об их протективном действии. Также обнаружена положительная корреляция между наличием у больных высокого уровня БАПНА-амидазной активности IG и повышением СОЭ ($r = 0,53$; $n = 21$; $p = 0,01$).

При оценке группы пациентов с острыми гнойно-воспалительными процессами (включая больных с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области) методом однофакторного дисперсионного анализа выявлено, что на уровень БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов класса G оказывали влияние следующие факторы: абсолютный уровень лейкоцитов — 3% ($n = 38$, $p < 0,05$), абсолютный уровень лимфоцитов — 2,9% ($n = 38$, $p < 0,05$), абсолютный уровень моноцитов — 3,3% ($n = 38$, $p < 0,01$), абсолютный уровень эозинофилов — 8,3% ($n = 38$, $p < 0,01$). Низкая степень влияния отдельных клинико-лабораторных проявлений на уровень БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов свидетельствует о том, что формирование последней происходит при совокупном взаимодействии многих разнонаправленных факторов. Не удалось выявить связи между уровнем БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов и видом вызвавшего инфекционный процесс микроорганизма, что также свидетельствует о полифакторной природе возникновения этого процесса. Наличие БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов у пациентов без инфекционного процесса может быть связано с влиянием сапрофитной микрофлоры, а также с возникновением активности под влиянием факторов неинфекционной природы.

При оценке ЛПА-амидазной активности оказалось, что ее уровень был чрезвычайно низким и составил у пациентов с острой хирургической инфекцией: медиана — 0 ЕОП, 25–75 процентили — 0–9 ЕОП, и у пациентов без инфекционного процесса 0 (0–8) ЕОП. Причем только у 2 пациентов уровень активности достоверно отличался от контроля. Низкие результаты уровня ЛПА-амидазной активности в сравнении с БАПНА-амидазной свидетельствуют о различной субстратной специфичности данных абзимов.

Выводы:

1. У пациентов с острой и хронической хирургической инфекцией уровень БАПНА-амидазной активности достоверно выше, чем у лиц без инфекционного процесса. Выявлены связи БАПНА-амидазной активности с продолжительностью пребывания больного в стационаре, уровнем СОЭ, абсолютным количеством лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов.

2. Уровень ЛПА-амидазной активности иммуноглобулинов у больных с хирургической инфекцией и у пациентов без гнойных процессов оказался низким и не коррелировал с уровнем БАПНА-амидазной активности.

3. Каталитические антитела с протеолитической активностью у пациентов с инфекционным процессом могут обладать высокой субстратной специфичностью и проявлять разный уровень активности в отношении даже сходных соединений.

Литература

1. Jerne, N.K. Towards a network theory of the immune system / N.K. Jerne // II Ann. Immunol. (Paris). — 1974. — Vol. 125. — P. 373–389.

2. Leatnerbarrow, R.J. Designer catalytic antibodies / R.J. Leatnerbarrow // Nature. — 1989. — Vol. 338. — P. 206–207.

3. Pollack, S.J. Selective chemical catalysis by an antibody / S.J. Pollack, J.W. Jacobs, P.G. Schults // Science. — 1986. — Vol. 234, N 4783. — P. 1570–1573.

4. Slobin, I.I. Preparation and some properties of antibodies with specifity toward p-nitrophenyl esters / I.I. Slobin / Biochemistry. — 1966. — Vol. 5, N 9. — P. 2836–2844.

5. Генералов, И.И. Абзимная активность иммуноглобулинов / И.И. Генералов. — Витебск: ВГМУ, 2000. — 152 с.

6. Marx, E.J. Making antibodies work like enzymes / E.J. Marx // Science. — Vol. 234, N 4783. — P. 1497–1498.

7. ДНК-азная активность IgG антител из крови больных синдромом приобретенного иммунодефицита человека / Е.С. Одинцова [и др.] // Молекул. биология. — 2006. — Т. 40, № 5. — С. 857–864.

8. Multifunctional antigens of *A. fumigatus* and specific antibodies / S. Purkayastha [et. al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2000. — Vol. 83, N 1–3. — P. 271–283.

9. Собирзянова, А.З. Влияние антител класса IgG к нативной ДНК на моноциты человека in vitro / А.З. Собирзянова, Т.А. Невзорова // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. естеств. науки. — 2008. — Т. 150, кн. 2. — С. 186–200.

10. Complement-independent lysis of human red blood cells by cold hemagglutinins // I. Salama [et al.] // Vox Sang. — 1988. — Vol. 55. — P. 21–25.

Поступила 29.07.2011

BAPNA-AMIDASE AND LYSINE-P-NITROANILIDE-AMIDASE ACTIVITY OF IMMUNOGLOBULINS IN PATIENTS WITH SURGICAL INFECTIONS

Okulich V.K., Senkovich S.A., Charadnyak A.N., Matskevich E.L.

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Proteolytic activity of IgG class antibodies in patients with acute and chronic surgical infections was studied with two chromogenic substrates – benzoyl-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) and lyzin-p-nitroanilid (LPA). Control group comprised donors and surgical non-infections patients. It was been determinedthat BAPNA-amidase levels in patients with surgical infections were significantly higher than in patients withoit suppurative surgical complications. Multiple interrelationships were determined between BAPNA-amidase levels and clinical and laboratory manifestations of diseases. LPA-amidase activity was low both in patients and control groups. There were no any correlations between BAPNA and LPA IgG activities.

Keywords: abzyme, surgical infection, proteolytic activity.

INCIDENCE OF HUMAN HERPESVIRUS 6, 7, AND PARVOVIRUS B19 INFECTION IN PATIENTS WITH THYROID GLAND DISORDERS

Gravelsina S.[1], Nora-Krukle Z.[1], Chapenko S.[1], Sultanova A.[1], Boka V.[2], Cunskis E.[3], Murovska M.[1]

[1]A. Kirchenstein Institute of Microbiology and Virology, Riga Stradins University; [2]Riga Eastern Hospital Riga, Latvia; [3]Riga Eastern Hospital, Clinic "Linezers", Riga, Latvia

Resume. The thyroid gland plays a very important role in controlling the body's metabolism and viral infections are often cited as a major environmental factor involved in disorders of thyroid gland. Human herpesvirus-6 (HHV-6), human herpesvirus-7 (HHV-7) and parvovirus B19 are an immunomodulating viruses characterized by widespread tissue tropism and have been found as well in the thyroid gland tissues, thereby changed antigen spectrum of the thyroid cell surface could be a base of autoimmune process. They can be reactivated under immune suppression and may lead to the development of different pathological conditions. The aim of the study was to examine frequency of HHV-6, HHV-7 and parvovirus B19 infection in patients with thyroid gland diseases and to prove viral hypothesis for pathogenesis of autoimmune thyroid disease. The study included 25 patients who were diagnosed with diseases of thyroid gland. Nested polymerase chain reaction (nPCR) was used for the detection of viral sequences in DNA isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or whole blood, thyroid gland tissue and plasma. Patients were divided into the two groups - patients with thyroid gland disorders with autoimmune process (1st group) and patients with thyroid gland disorders without autoimmune process (2nd group). HHV-6 genomic sequence in the DNA extracted from thyroid gland tissues was detected in 55.6% patients from the 1st group and in 75% patients from the 2nd group. High prevalence of HHV-6 genomic sequence in the DNAs samples extracted from whole blood or PBMC was found in the 1st and 2nd group's - 7/9 (77.77%) and 15/16 (93.75%), respectively. Active viral infection (plasma viremia) was revealed in 2/7 (28.57%) patients from the 1st group and in 3/15 (20.0%) patients from the 2nd group. Prevalence of HHV-7 in the DNA extracted from whole blood or PBMCs was similar in both groups (1st – 9/9; 2nd – 16/16). HHV-7 in the DNA extracted from the thyroid gland tissues was found more frequently in the 1st group 7/9 (77.77%) than in the 2nd group which includes patients without autoimmune process 9/16 (56.25%). Specific HHV-7 genomic sequence in plasma DNAs was found in 6/9 (66.66%) patients from the 1st group and in 9/16 (56.25%) patients from the 2nd group which includes patients without autoimmune process. Active B19 infection was found in 3 patients from the 1st group and in 5 patients from the 2nd group: 33.33% and 31.25% respectively. The presence of B19 genomic sequence was detected in DNA extracted from thyroid gland tissues of two (22.22%) patients from the 1st and of five patients (31.25%) from the 2nd group. 11.11% 1st groups' patients was found B19 DNA which was extracted from whole blood or PBMC and 18.75% in 2nd group. Lymphotropic HHV-6 and HHV-7 prevalence in thyroid gland tissues in patients with different thyroid diseases is high. B19 influence on thyroid gland disorder also can't be excluded. Further studies are nessesary to clarify the relationship between viruses and different thyroid diseases.

Keywords: HHV-6, HHV-7, B19, thyroid gland disorders.

Introduction. Thyroiditis is an inflammation of the thyroid gland. The most common forms are Hashimoto's disease, subacute granulomatous thyroiditis, postpartum thyroiditis, subacute lymphocytic thyroiditis, and drug-induced thyroiditis (caused by amiodarone, interferon-alfa, interleukin-2, or lithium). Patients may have euthyroidism, hyperthyroidism, or hypothyroidism, or may evolve from one condition to another over time [1]. The thyroid gland plays a very important role in controlling the body's metabolism and viral infections are often cited as a major environmental factor involved in subacute thyroiditis and autoimmune thyroid diseases [1]. Viral infections can be responsible for the onset and sustaining of autoimmune processes. Chronic inflammation may favor the priming of autoreactive T cells that have escaped thymic selection and are specific for self-mimicking viral peptides in the periphery. Viral persistence and inflammation can act synergistically to induce and sustain autoimmunity either unveiling cryptic self-epitopes, or favoring determinant spreading, or activating dendritic cells, or promoting constant priming of new autoreactive T cells, or contributing to the efficient generation of effector cells, or, finally, restimulating memory T lymphocytes [2]. Direct evidence of the presence of viruses or their components in the organ are available for retroviruses (HFV) and mumps in subacute thyroiditis, for retroviruses (HTLV-1, HFV, HIV

and SV40) in Graves's disease and for HTLV-1, enterovirus, rubella, mumps virus, HSV, EBV and parvovirus B19 in Hashimoto's thyroiditis [3].

The B19 is a small nonenveloped single-stranded DNA virus who belongs to the *Erythrovirus* genus, *Parvoviridae* family, Parvovirinae subfamily and is known for causing a childhood exanthem but it has also been associated with a wide spectrum of autoimmune diseases – autoimmune neutropenia, thrombocytopenia, hemolytic anemia and rheumatoid arthritis [4, 5]. Only few studies have suggested the association of parvovirus infection with thyroiditis.

Human herpesvirus-6 (HHV-6) and human herpesvirus-7 (HHV-7) are members of the *Roseolovirus* genus, *Herpesviridae* family, *Beta-herpesvirinae* subfamily [Roizman et al., 1981] and discovered in 1986 and 1990 year, respectively [6, 7]. They are closely related widespread lymphotropic, immunomodulating viruses characterized by widespread tissue tropism and have been found as well in the thyroid gland tissues, thereby changed antigen spectrum of the thyroid cell surface could be a base of autoimmune process. They can be reactivated under immune suppression and may lead to the development of different pathological conditions.

Objective. The aim of the study was to examine frequency of HHV-6, HHV-7 and parvovirus B19 infection in patients with thyroid gland diseases and to prove viral hypothesis for pathogenesis of autoimmune thyroid disease.

Materials and methods. EDTA blood, plasma and resected tissue were received from Riga Eastern Hospital Clinic "Linezers" and were collected from each patient, aliquoted and stored at -70°C. The Ethic Committee of the Riga Stradins University (Riga, Latvia) approved the study and informed mutual consent was obtained from a total of 25 patients (23 females, 2 males, 32 to 77 years old, mean age 49 years) who were diagnosed with diseases of thyroid gland. A total of 25 patients with and without autoimmune process were included in this study.

To extract DNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or whole blood and thyroid tissue samples phenol-chloroform method was used. QIAamp DNA Blood Mini Kit was used to extract DNA from cell free blood plasma. β-globin PCR according to Vandamme et al. 1995 was assessed the quality of extracted DNA [8]. Negative β-globin PCR result for DNA isolated from plasma shows that there is no cell DNA in the sample. It is very important for virus reactivation detection. Nested polymerase chain reaction (nPCR) with the corresponding primer pairs was used for the detection of HHV-6 and HHV-7 and B19 genomic sequences [9-11, respectively] in DNA isolated from PBMC and whole blood, tissue and plasma. DNA samples negative for HHV-6, HHV-7 and B19 specific sequences and water controls were included in each experiment to exclude the possibility of contamination during the PCR. Obtained amplicones were analyzed in 1.7% agaroze gel with ethidium bromide staining and analyzed using Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290 ASV.

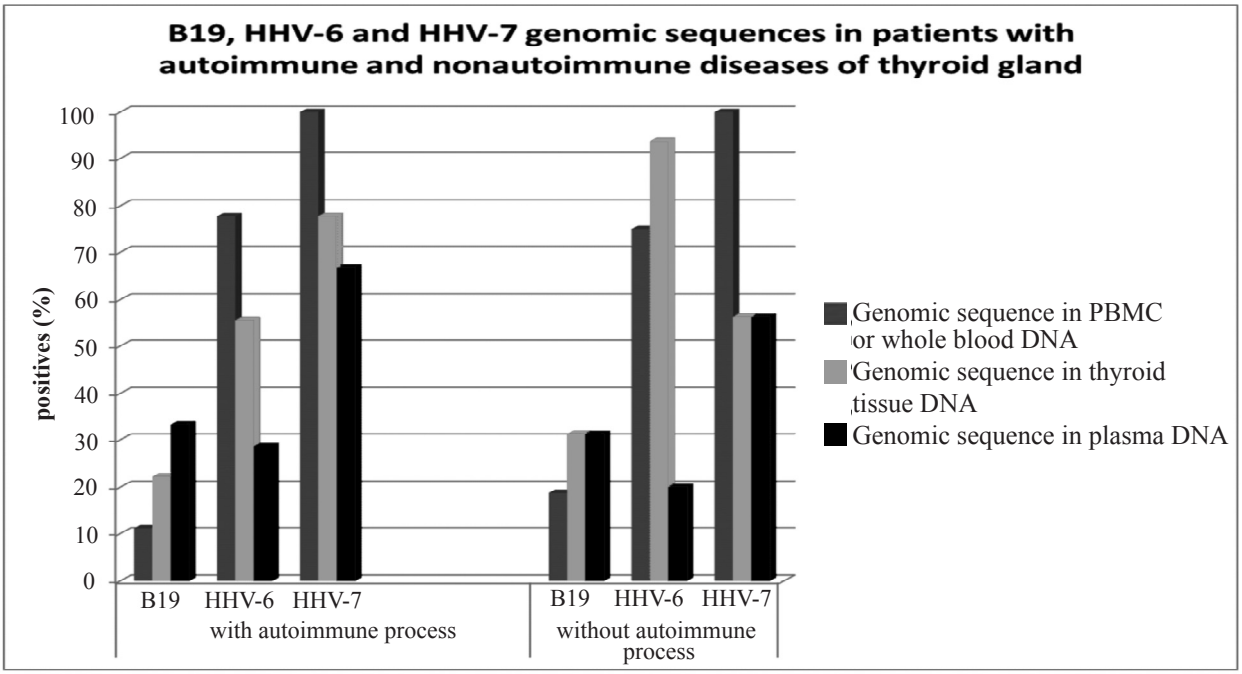
Results. Patients were divided into the two groups – patients with thyroid gland disorders with autoimmune process (1st group) and patients with thyroid gland disorders without autoimmune process (2nd group). There were no differences found between both groups regarding the age and gender.

HHV-6 genomic sequence in the DNA extracted from thyroid gland tissues was detected in 55.6% patients from the 1st group and in 75% patients from the 2nd group. High prevalence of HHV-6 genomic sequence in the DNAs samples extracted from whole blood or PBMC was found in the 1st and 2nd group's – 7/9 (77.77%) and 15/16 (93.75%), respectively. Active viral infection (plasma viremia) was revealed in the both of patients groups: in 2/7 (28.57%) patients from the 1st group and in 3/15 (20.0%) patients from the 2nd group.

Prevalence of HHV-7 in the DNA extracted from whole blood or PBMCs was similar in both groups (1st – 9/9; 2nd – 16/16). HHV-7 in the DNA extracted from the thyroid gland tissues was found more frequently in the 1st group 7/9 (77.77%) than in the 2nd group which includes patients without autoimmune process 9/16 (56.25%). Specific HHV-7 genomic sequence in plasma DNAs was found in 6/9 (66.66%) patients from the 1st group and in 9/16 (56.25%) patients from the 2nd group which includes patients without autoimmune process.

Active B19 infection was found in 3 patients from the 1st group and in 5 patients from the 2nd group: 33.33% and 31.25% respectively. The presence of B19 genomic sequence was detected in DNA extracted from thyroid gland tissues of two (22.22%) patients from the 1st and of five patients (31.25%) from the 2nd group. 11.11% 1st groups' patients was found B19 DNA which was extracted from whole blood or PBMC and 18.75% in 2nd group.

The overall results are summarized in the figure.



Discussion. Since HHV-6 and HHV-7 establish latency following primary infection, they are important pathogens in immunocompromised hosts including patients with thyroid gland disorders.

The exact diagnosis of thyroid gland pathology was established by histological analysis of resected tissue and analysis of thyroid gland hormonal activity but amount of individuals in each group were too small yet to divide them more specific but it is very important for the further studies to clarify the relationship between viruses and different diseases of thyroid gland.

In large proportion in both groups of patients latent/persistent HHV-6 and HHV-7 infection was found, what consistents with previously published data. As HHV-6 and HHV-7 have been associated with autoimmune diseases, we investigated the prevelance of these viruses infection in patients with thyroid gland disorders with autoimmune and non-autoimmune process. nPCR data shows high HHV-6 and HHV-7 DNA prevalence in both groups – 72.0% and 64.0%, respectively. Nevertheless there is no statistically significant difference detected between HHV-7 and HHV-6 prevalence between different DNAs samples and groups of patients investigated. In literature are only few data about HHV-6 and HHV-7 association with autoimmune thyroid gland disorders, in one of them Leite and co-authors [12] are analyzing those two viruses and Graves disease (GD). Their results showed that HHV-6 infection rates were similar in GD patients and among control group. HHV-7 infection increased the risk of developing GD by more than three times [12]. In our laboratory few years ago we did small pilot study on Lymphotropic herpesviruses infection and diseases of thyroid gland. This work also confirmed high prevalence of HHV-7 in thyroid gland tissues [13]. It is important to remember that HHV-6 and HHV-7 are lymphotropic viruses and latent/persistent infection of those viruses in healthy population is high. In a case of chronic inflammatory process lymphocyte infiltration has been observed and findings of HHV-6 and HHV-7 genomic sequences can be explained by presence of HHV-6 and/or HHV-7 carrying lymhocytes in thyroid gland tissue. To be able to draw final conclusions about possible HHV-6 and/or HHV-7 role in ethiopatogenesis of thyroid gland autoimmune and non-autoimmune disorders, more serious research need to be done, in progress ongoing work with mRNA extraction, viral load detection, detection of antiviral antibodies, detection of TNF-α, IL-6, IL-1β expression level and epigenetic analysis of TSHR, TTF1, TTF2, ERp29, APC, RAR-β, PAX8 and TSHR genes.

Infection with parvovirus B19 (B19) is a global concern, and it is the etiological agent of many diseases [14] but there is very poor information about the B19 persistence in thyroid tissues. J.H. Wang and co-authors investigated and concluded that B19 DNA may exist in human thyroid tissues with different disorders more frequently than in normal thyroid tissues [15] but in Kouki Mori and co-authors research they did detection of viruses by serology and PCR in patients with subacute thyroiditis (SAT) and they couldn't find evidence supporting hypothesis of the viral contribution to the etiology of SAT [16]. Also in our

research only 28.0% patient DNA extracted from thyroid gland tissues was found to be positive on B19 specific sequence and 75% from them had active viral infection. No statistically significant difference was observed between both groups- autoimmune and nonautoimmune thyroid disease.

Conclusion. Lymphotropic HHV-6 and HHV-7 prevalence in thyroid gland tissues in patients with different thyroid diseases is high. B19 influence on thyroid gland disorder also can not be excluded. Further studies are necessary to clarify the relationship between viruses and different thyroid diseases.

References

1. Prummel, M. The environment and autoimmune thyroid diseases / M. Prummel, T. Strieder, W.M. Wiersinga // Eur. J. Endocrinol. — 2004. — Vol. 150. — P. 605–618.
2. Persisting viruses and autoimmunity / M. Paroli [et al.] // J. Neuroimmunol. — 2000. — Vol. 107. — P. 201–204.
3. Desailloud, R. Viruses and thyroiditis: an update / R. Desailloud, D. Hober // Virol. J. — 2009. — Vol. 6. — 5 [Electronic resource]. — Mode of access: http://www.virologyj.com/content/6/1/5. — Date of access: 13.09.2011.
4. Lehmann, H.W. Parvovirus B19 infection and autoimmune disease / H.W. Lehmann, P. von Landenbergb, S. Modrowc // Autoimmun. Rev. — 2003. — Vol. 2. — P. 218–223.
5. Incidence and clinical significance of parvovirus B19 infection in patients with rheumatoid arthritis / S.V. Kozireva [et al.] // J. Rheumatol. — 2008. — Vol. 35. — P. 1265–1270.
6. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders / S.Z. Salahuddin [et al.] // Science. — 1986. — Vol. 234. — P. 596–601.
7. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells / N. Frenkel [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1990. — Vol.87. — P. 748–752.
8. Standardisation of primers and an algorithm for HIV-1 diagnostic PCR evaluated in patients harbouring strains of diverse geographical origin / A.M. Vandamme [et al.] // J. Virol. Meth. — 1995. — Vol. 51, N 2–3. — P. 305–316.
9. Human herpesvirus 6 (HHV-6)-positive Burkitt's lymphoma:establishment of a novel cell line infected with HHV-6 / Z.N. Bandobashi [et al.] // Blood. — 1997. — Vol. 90. — P. 1200–1207.
10. Human herpesvirus 7 is a T-lymphotropic virus and is related to, but significantly different from, human herpesvirus 6 and human cytomegalovirus / Z.N. Berneman [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 10552–10556.
11. B19 infection in real transplant recipients / R. Cavallo [et al.] // J. Clin. Virol. — 2003. — Vol. 26. — P. 361–368.
12. Herpesvirus type 7 infection may play an important role in individuals with a genetic profile of susceptibility to Graves' disease / J.L. Leite [et al.] // Eur. J. Endocrinol. — 2010. — Vol. 162. — P. 315–321.
13. Lymphotropic herpesviruses infection and thyroid gland diseases / M. Murovska [et al.] // Articles of RSU. — 2003. — P. 389–393.
14. Association of parvovirus, B19 infection and Hashimoto's thyroiditis in children / Lehmann H.W. [et al.] // Viral Immunol. — 2008. — Vol. 21. — P. 379–383.
15. Detection of human parvovirus B19 in papillary thyroid carcinoma / J.H. Wang [et al.] // Brit. J. Cancer. — 2008. — Vol. 98. — P. 611–618.
16. Failure in detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in specimen obtained by fine needle aspiration biopsy of thyroid in patients with subacute thyroiditis / K. Mori [et al.] // Tohoku J. ExP. Med. — 1998. — Vol. 186. — P. 13–17.

Поступила 13.09.2011

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ 6, 7 И ПАРВОВИРУСНОЙ В19 ИНФЕКЦИЙ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЯМИ ФУНКЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Гравелсина С.[1], Нора-Крукле З.[1], Чапенко С.[1], Султанова А.[1], Бока В.[2], Цунскис Е.[3], Муровска М.[1]

[1]Институт микробиологии и вирусологии им. А. Кирхенштейна Рижского университета Страдыня;
[2]Рижская восточная больница;
[3]Клиника «Линэзерс» Рижской восточной больницы, Рига, Латвия

Щитовидная железа играет важную роль в контроле метаболизма в организме, и вирусные инфекции часто являются факторами, вовлеченными в заболевания данного органа. Герпесвирусы человека -6 и -7 (ГВЧ-6 и ГВЧ-7) и парвовирус В19 являются иммуномоделирующими вирусами с широким тканевым тропизмом и найдены также в тканях щитовидной железы, изменяя антигенный спектр на клеточной поверхности, что может быть основой аутоиммунных процессов. Вирусы могут реактивироваться в условиях иммуносупрессии и приводить к развитию различных патологий.

Цель исследования: изучение частоты ГВЧ-6, ГВЧ-7 и парвовирусной В19 инфекции у пациентов с заболеваниями щитовидной железы и подтверждение гипотезы об участии вирусных инфекций в патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. В исследовании участвовало

25 пациентов с заболеваниями щитовидной железы: 9 с аутоиммунными процессами (I группа) и 16 пациентов без аутоиммунных процессов (II группа). Метод полимеразной цепной реакции (nPCR) был использован для выявления вирусных последовательностей в ДНК, выделенной из мононуклеарных клеток периферической крови (МНКПК) или цельной крови, тканей щитовидной железы и плазмы крови. ГВЧ-6-геномные последовательности были определены у 55,6% пациентов I группы и у 75,0% II группы. Высокая частота наличия ДНК ГВЧ-6 была выявлена в образцах ДНК, экстрагированных из цельной крови, и МНКПК пациентов I и II групп (7/9, 77,8% и 15/16, 93,8% соответственно). Активная ГВЧ-6-инфекция (вирус в плазме) была выявлена у 28,6% (2/7) пациентов I группы и у 20,0% (3/15) пациентов II группы. Распространенность ГВЧ-7-инфекции была сходной в обеих группах (9/9 в I группе и 16/16 во II группе) пациентов. ДНК ГВЧ-7 более часто определялась в ДНК выделенной из ткани щитовидной железы I группы пациентов 77,8% (7/9), чем в ДНК II группы 56,3% (9/16) пациентов. Активная ГВЧ-7-инфекция была найдена у 66,7% (6/9) I группы пациентов и у 56,3% (9/16) II группы пациентов. Наличие B19-геномных последовательностей было определено как в ДНК, экстрагированной из ткани щитовидной железы пациентов I и II групп (2/9, 22,2% и 5/16, 31,3% соответственно), так и в ДНК, выделенной из МНКПК (11,1 и 18,8% соответственно). Активная B19-инфекция была выявлена у 3 пациентов I группы и у 5 пациентов II группы (33,3 и 31,3% соответственно). Выявляемость геномных последовательностей лимфотропных ГВЧ-6 и ГВЧ-7 в ДНК ткани щитовидной железы является высоким у пациентов с различными заболеваниями щитовидной железы. Влияние B19-инфекции на развитие заболевания не может быть исключено. Дальнейшие исследования необходимы для выяснения взаимосвязи между вирусными инфекциями и заболеваниями щитовидной железы.

Ключевые слова: ГВЧ-6, ГВЧ-7, B19, заболевания щитовидной железы.

НЕГЛАДКОЕ ТЕЧЕНИЕ ВЕТРЯНОЙ ОСПЫ У ДЕТЕЙ

Позняк Т.В., Шеремет А.Н., Очеретний М.Д., Булдык Е.А., Русикевич С.С., Комир В.В., Валькович Е.М., Волкова Н.Г., Кепеть В.А., Ключарева А.А., Кудин А.П.

Белорусский государственный медицинский университет;
Белорусская медицинская академия последипломного образования;
Городская детская инфекционная клиническая больница, Минск, Беларусь

Резюме. Гнойносептические осложнения (ГСО) являются наиболее частыми осложнениями ветряной оспы (ВО) у детей. Ведущую роль в развитии ГСО играет *Streptococcus pyogenes*. Стартовая этиотропная терапия должна включать сочетание цефтриаксона с клиндамицином. В комплексное лечение таких детей следует как можно раньше включать назначение внутривенного иммуноглобулина. Отсутствие эффекта от такой терапии требует оперативного лечения. Поражения ЦНС на фоне ВО протекают преимущественно в виде транзиторной мозжечковой атаксии (ТМА), возникающей обычно на 5–8-й день от начала ВО. Применение глюкокортикостероидов патогенетически обоснованно. Назначение противовирусной терапии (ацикловира) таким пациентам не обязательно.

Ключевые слова: ветряная оспа, осложнения, дети, терапия, внутривенный иммуноглобулин.

Введение. Несмотря на то, что современная вакцина против ветряной оспы (ВО) существует с 1994 г., в Республике Беларусь она пока не вошла в календарь обязательных профилактических прививок. Поэтому в настоящее время заболеваемость ВО в нашей стране пока остается самой высокой среди всех воздушно-капельных инфекций, уступая только острым респираторным инфекциям.

Заболевание у иммунокомпетентных детей протекает, как правило, благоприятно и заканчивается выздоровлением. Однако примерно у 2–5% больных развиваются осложнения. Наиболее частыми из них (исключая пиодермию) являются гнойно-септические осложнения (ГСО) и поражения нервной системы (мозжечковая атаксия, энцефалит и др.) [1–4]. Летальные исходы крайне редки и связаны, в первую очередь, с ГСО (сепсис, синдром токсического шока, некротизирующий фасциит и др.) [3, 4].

Поражения нервной системы могут проявляться, прежде всего, в виде ветряночного энцефалита и транзиторной мозжечковой атаксии (ТМА). Следует отметить, что это два принципиально различных патологических состояния.

Собственно ветряночный энцефалит (ВЭ) развивается в период разгара заболевания (на 1–3 день высыпаний или даже до появления сыпи) с частотой примерно 1 случай на 50 000 эпизодов ВО. Его клинические проявления принципиально не отличаются от других энцефалитов (лихорадка, нарушение сознания, судороги, различная очаговая симптоматика и т.д.) [1, 2, 4, 5]. Развитие ВЭ связано с действием самого вируса на ЦНС, поэтому лечение этого осложнения требует, кроме всего прочего, адекватной этиотропной терапии (ацикловир в больших дозах) [1, 4, 6].

Постветряночный энцефалит (ПВЭ) (или в зарубежной литературе — ТМА) встречается значительно чаще (примерно у одного из 4000 заболевших). Он манифестирует в период угасания сыпи, когда новые элементы уже не появляются (обычно на 5–8 день от начала ВО), т.е. на этапе уже сформировавшегося иммунитета и прекращения циркуляции возбудителя. В клинической картине заболевания доминирует атаксический синдром (нарушение координации, вестибулярная рвота, невнятная речь, мышечная гипотония и т.д.). Этот вариант поражения ЦНС при ВО протекает доброкачественно и всегда заканчивается выздоровлением [1, 2, 4, 5]. По механизму развития ПВЭ является иммуноопосредованным заболеванием. Учитывая патогенез развития ПВЭ, становится понятным отсутствие необходимости в назначении таким пациентам противовирусного лечения и обоснованность применения средств противовоспалительной и иммуносупрессивной терапии [1, 5, 6]. Последняя может включать в себя глюкокортикостероиды (ГКС) (как в обычных дозах, так и в виде пульс-терапии), высокие дозы внутривенного иммуноглобулина (ВВИГ), плазмаферез и их сочетание [6].

Развитие ГСО при ВО обусловлено прежде всего β-гемолитическим стрептококком группы А (СГА) и *S. aureus*. Значительно реже в этот процесс вовлекаются другие микроорганизмы (грамотрицательные энтеробактерии, анаэробные микробы — пептострептококки, бактериоды, превотелла и др.) [2–4, 7].

Лечение детей с данной патологией, несмотря на наличие широкого спектра эффективных в отношении СГА антибиотиков (АБ) (в первую очередь, β-лактамных), далеко не всегда представляется простой задачей. Только адекватная антибактериальная терапия при тяжелых ГСО оказывается неэффективной и на определенном этапе развития патологического процесса происходит образование гнойного экссудата (изолированного или нет) и некроза мягких тканей, требующих оперативного вмешательства. Причем нередко возникает потребность в повторных операциях. У пациентов с инвазивными бактериальными инфекциями мягких тканей всегда существует угроза развития сепсиса и септического или токсического шока. Поэтому являются обоснованными рекомендации по включению в лечение тяжелых ГСО у детей с ВО комбинированной антибактериальной терапии (АБТ) и препаратов внутривенного иммуноглобулина (ВВИГ) [3, 4, 7–9].

Целью нашей работы было оценить частоту развития осложнений ВО у госпитализированных детей, клинико-лабораторные особенности различных осложнений и проанализировать тактику проводившейся терапии.

Материалы и методы. В представленной работе проанализированы клинические и параклинические данные детей с осложнениями ВО, находившихся на лечении в Городской детской инфекционной клинической больнице г. Минска (ГДИКБ) с 2006 г. по июль 2011 г. В таблице 1 представлены наиболее частые осложнения ВО у госпитализированных детей за этот период. В подавляющем большинстве случаев дети госпитализировались по эпидемиологическим показаниям, и заболевание у них протекало без осложнений. Однако у 24 детей развились тяжелые ГСО (флегмона мягких тканей, некротизирующий фасциит и др.), у 9 — ПВЭ и у 2 — бактериальная пневмония. За этот промежуток времени не было отмечено случаев ветряночного энцефалита (так называемого, раннего ветряночного энцефалита).

Таблица 1 — Осложнения ВО у госпитализированных детей за 2006 – июль 2011 гг.

Период	Без осложнений	ПВЭ	ГСО	Пневмония	Всего
2006 г.	178	0	0	0	178
2007 г.	189	1	0	1	191
2008 г.	149	1	4	0	150
2009 г.	128	1	0	0	130
2010 г.	117	4	9	0	128
2011 г. (по июль)	118	2	11	1	131
Всего:	879	9	24	2	908

У пациентов оценивались анамнестические данные, жалобы, объективное состояние, неврологический статус. Обследование детей включало общеклинические методы (общий анализ крови (ОАК), общий анализ мочи, биохимический анализ крови (БАК)), определение антистрептолизина-О (АСЛ-О) как серологического маркера СГА-инфекции, посевы по стандартным методикам содержимого ран после вскрытия гнойных очагов в мягких тканях пораженных областей. Проводилось обследование на вирусы простого герпеса 1/2 типов (ВПГ) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (что в настоящее время считается «золотым стандартом» обследования на герпетическую инфекцию [6]) и на энтеровирусную инфекцию путем определения IgM к энтеровирусам в крови. Все дети с ГСО консультированы хирургами, которыми при необходимости и проводилось оперативное лечение (как в условиях ГДИКБ, так и после перевода в специализированный стационар). Обработка полученных данных производилась на компьютере с использованием стандартного пакета программ статистического анализа Microsoft Excel Windows 2000.

Результаты и их обсуждение. Возраст детей с ПВЭ колебался от 3 до 17 лет и в среднем составил 5,7 ± 1,4 года. Мальчиков было 6, девочек — 3. У 7 детей ВО протекала в среднетяжелой и у 2 — в тяжелой форме. Признаки ПВЭ появлялись после прекращения высыпаний, с 5-го по 8-й день от начала ВО (в среднем на 6,9 ± 0,3 суток). Госпитализировались такие дети обычно в первые 1–3 дня развившегося осложнения, однако в одном случае ребенок попал в стационар спустя 9 дней от начала ПВЭ.

Лечение детей включало в себя назначение глюкокортикостероидов (ГКС), дезинтоксикационной, симптоматической и ноотропной (в периоде реконвалесценции) терапии. ГКС применялись практически во всех случаях с момента поступления в стационар. Начиналась ГКС-терапия с 1–3 дня ПВЭ (в среднем спустя 1,9 ± 0,3 дня), за исключением одного случая, когда ребенок поступил в стационар спустя 9 дней от начала ПВЭ. В 8 случаях использовался дексаметазон в максимальной дозе 0,66 ± 0,04 мг/кг/сут внутривенно. В таком режиме препарат применялся в течение 3,0 ± 0,5 дня, а затем доза постепенно уменьшалась вплоть до полной отмены. Продолжительность ГКС-терапии составила от 4 до 11 дней (в среднем 8,4 ± 0,9 суток). Один ребенок с тяжелым ПВЭ получил пульс-терапию метилпреднизолоном (10 мг/кг внутривенно 1 раз в сутки 3 дня подряд с последующим постепенным снижением дозы и переходом на прием препарата внутрь. Общий курс ГКС-терапии у него составил 10 дней). Кроме того, 6 из 9 детей получили полноценный курс ацикловира: 45,1 ± 3,3 мг/кг/сут внутривенно в течение 7,0 ± 0,7 дня.

Для оценки эффективности ацикловира при ПВЭ все дети были разделены на 2 группы: получавшие адекватный курс ацикловира (1-я группа) и практически не получавшие ацикловир (2-я группа). Во 2-ю группу вошли 3 ребенка, из которых ацикловир вовсе не получал один пациент, еще один получил препарат в течение 1,5 суток (что нельзя признать полноценным лечением) и последний ребенок начал получать ацикловир через 9 дней от начала ПВЭ, когда симптоматика уже стала исчезать самостоятельно без какого-либо лечения. Ни у кого из пациентов не были выявлены признаки активной ВПГ-инфекции. У одного ребенка из 1-й группы обнаружены IgM к энтеровирусам в крови (что, свидетельствует об активной инфекции без уточнения ее клинической формы: от бессимптомной до участия в развитии ТМА. При этом тактика лечения таких детей не меняется). По одному ребенку в каждой группе получили ВВИГ в курсовой дозе 1,0 и 1,2 г/кг.

В клинической характеристике ПВЭ обращает на себя внимание отсутствие или слабая выраженность синдрома системного воспалительного ответа (ССВО). Так, повышение температуры до 37,5–38,8 ºС отмечалось только у 3 детей и сохранялось в течение 1–3 суток. Лейкоцитоз отмечался также у 3 детей и исчезал через 3 дня. Сдвиг лейкоцитограммы влево был зарегистрирован у 1 ребенка (возможно, из-за сопутствующей пиодермии). Токсигенная зернистость нейтрофилов отсутствовала. На изменения в ОАК могли также повлиять ГКС. СОЭ повышалась у 4 детей (максимум до 22 мм/ч). СРБ у 8 детей был нормальный, и только в одном случае отмечалось повышение уровня этого острофазового белка до 15 мг/л. Содержание трансаминаз сохранялось в пределах нормальных значений, и только в одном случае отмечено незначительное увеличение концентрации АсАТ (до 62 ЕД/л). В таблице 2 приведена неврологическая характеристика детей с ПВЭ.

Таблица 2 — Неврологические особенности ПВЭ у детей сравниваемых групп

Показатель	Дети 1-й группы, n = 6	Дети 2-й группы, n = 3
Сознание	Сохранено	Сохранено
Нарушение координации, дни	8,8 ± 2,2	9,7 ± 4,2
Способность сидеть	Сохранена у 3 из 6	Сохранена у 1 из 3
Способность ходить	С поддержкой — 3 из 6	С поддержкой — 2 из 3
Пальце-носовая проба	Не выполняли 4 из 6	Не выполняли 2 из 3
Пяточно-коленная проба	Не выполняли	Не выполняли
Смазанность речи, дни	4,0 ± 0,7	3,7 ± 1,9
Рвота, дни	1,8 ± 0,5	1,0 ± 0,6
Мышечная гипотония	У всех	У всех
Слабость конвергенции	У 2 из 6	У всех
Девиация языка	У 3 из 6	У всех
Сухожильные рефлексы	Сохранены	Сохранены
Рефлекс Бабинского	Слабо (+) у 4 из 6	Слабо (+) у 1 из 3
Рефлексы орального автоматизма	У 1 из 6	У 1 из 3
Менингиальные симптомы	У 1 из 6 — слабо (+)	У 1 — слабо (+)

Как видно из представленных данных, ведущим в клинике ПВЭ является ТМА с соответствующей симптоматикой. Однако на фоне преобладания мозжечковых нарушений у части больных отмечаются признаки поражения пирамидной системы: кортико-нуклеарных (рефлексы орального автоматизма, девиация языка) и кортико-спинальных путей (анизорефлексия, снижение брюшных рефлексов, патологический симптом Бабинского, снижение силы в конечностях), а также легкая стволовая симптоматика в виде нарушения конвергенции (вследствие заинтересованности медиального продольного пучка). Мышечная гипотония и мышечная слабость у разных пациентов были выражены в различной степени, но у всех в большей мере и дольше сохранялись в ногах. Кроме того, следует обратить внимание на то, что, хотя сознание у пациентов с ПВЭ сохранено, почти у половины пациентов (у 4 из 9) в первые 3–5 дней отмечались вялость, апатичность и резко негативная реакция на осмотр, дети отказывались разговаривать, неохотно шли на контакт. По мере проведения лечения эта симптоматика исчезала одной из первых, что можно рассматривать как один из ранних признаков выздоровления. Достоверных отличий в клинике заболевания и продолжительности сохранения признаков МА в двух группах детей обнаружено не было: срок пребывания в стационаре составил 19,3 ± 3,4 дня в 1-й группе и 19,3 ± 2,3 дня — во 2-й. Это подтверждает тот факт, что необходимости в назначении противовирусной терапии (в частности — ацикловира) нет. Более того, даже назначение ГКС лишь облегчает течение заболевания и сокращает сроки болезни. В этом мы согласны с существующим в литературе мнением [5].

Пациенты с ГСО поступали в клинику на 1–7 сутки ВО (в среднем на 4,3 ± 0,3 дня). Начало осложнений отмечалось с 3-го по 8-й день ВО (в среднем на 4,6 ± 0,3 суток). У половины пациентов ГСО развились за 1–3 дня до или в день поступления в стационар, а у второй половины — уже в больнице. Продолжительность пребывания в ГДИКБ составила 11,9 ± 0,9 суток.

У всех пациентов отмечались признаки ССВО. Максимальная температура составляла 39,2 ± 0,15 °С (с колебаниями от 37,5 до 40,4 ºС). Лихорадка сохранялась в течение 3,6 ± 0,5 суток (от 0 до 9 дней). В ОАК отмечался лейкоцитоз (в течение 4,3 ± 0,8 суток), сдвиг лейкоцитограммы влево (молодые формы нейтрофилов максимально составили 20,6 ± 3,3%) в течение 4,0 ± 0,9 дня. У 3 больных (12,5%) сдвига лейкоцитограммы не было. СОЭ повышалась до 35,8 ± 3,4 мм/ч. Токсигенная зернистость нейтрофилов (на + или ++) зафиксирована у 7 детей (29,2%). В БАК регистрировались маркеры острофазового ответа: повышение уровня СРБ (94,6 ± 19,7 мг/л) и снижение концентрации сывороточного железа (3,8 ± 0,7 мкг/л).

Серологическое обследование на СГА-инфекцию проводилось у 17 пациентов (70,8%). Повышение уровня АСЛ-О отмечалось у 8 из 17 обследованных детей (47,1%), и у 3 из них из очага воспаления был выделен СГА. Еще у 1 больного пиогенный стрептококк был выделен из раневого содержимого, но содержание АСЛ-О у него не увеличивалось. Таким образом, участие СГА в развитии ГСО у наших пациентов доказано у 52,9% обследованных детей. У 6 пациентов исследование

АСЛ-О проводилось до 5-го дня целлюлита, что не позволяет говорить об участии или неучастии СГА в развитии ГСО у этих детей. И только у 2 из 17 обследованных больных (11,8%) уровень АСЛ-О после 7 дня развития воспалительного инфильтрата не повышался. Кроме того, у 3 пациентов с доказанной СГА-инфекцией была выявлена сопутствующая инфекция: у 2 детей – *S. aureus* (выделен с кожи над воспалительным инфильтратом, а не из раневого содержимого) и у 1 пациента — *Aerococcus viridans*.

Полученные данные подтверждают ведущую роль *Streptococcus pyogenes* в развитии тяжелых ГСО у детей с ВО, что должно определять тактику этиотропной терапии таких пациентов. Кроме того, приняв во внимание увеличение данной патологии с октября 2010 г. по июнь 2011 г. (в ГДИКБ с данной патологией проходило лечение 17 человек или 70,8% всех случаев ГСО, зарегистрированных за отчетный период в нашем регионе), можно прийти к выводу о том, что у нас стал циркулировать новый, высокопатогенный серотип СГА (или несколько новых серотипов).

Стартовая этиотропная терапия детей с ГСО, за одним исключением, включала назначение β-лактамных АБ (цефалоспорины, аминопенициллины, карбопенемы) в виде монотерапии или в комбинации с препаратами других групп. Самой популярной схемой АБТ была комбинация цефтриаксона с клиндамицином — она использовалась у 14 пациентов (58,3). Только у 2 из них (14,3%) она оказалась неэффективной и потребовала замены цефтриаксона на карбопенемы. Причиной неэффективности может быть как участие в патологическом процессе нечувствительной к этим АБ микробов, так и неадекватная хирургическая санация очага поражения. В тех случаях, когда был получен эффект от проводимой этиотропной терапии, цефтриаксон применялся в течение 8,0 ± 1,1 суток (в дозе 95,3 ± 1,1 мг/кг/сут), клиндамицин — в течение 8,1 ± 1,0 день (36,0 ± 1,6 мг/кг/сут), карбопенемы — в течение 7,6 ± 1,2 дня (в соответствующих дозах).

Фактически смена АБТ по клинико-лабораторным показаниям (сохранение или возвращение признаков ССВО, отсутствие динамики со стороны местного воспалительного процесса несмотря на проводимое комплексное лечение — АБТ, оперативное вмешательство, применение ВВИГ) была необходима у 2 больных (8,3%), причем в 1 случае этиотропную терапию меняли дважды.

Учитывая ведущую роль *Streptococcus pyogenes* в развитии ГСО у детей на фоне ВО, в перспективе следует иметь в виду, что стартовая этиотропная терапия у таких пациентов должна включать сочетание цефтриаксона с клиндамицином (или равноценную им замену, например, другие β-лактамы в комбинации с макролидами или линкомицином). Отсутствие четкого эффекта от такой комбинации следует, в первую очередь, рассматривать как признак формирования гнойного воспаления с некрозом мягких тканей. Это требует оперативного лечения, как правило, без замены АБТ.

Хирургическое лечение потребовалось 14 пациентам (58,3%). У 9 пациентов достаточным оказалось 1 оперативное вмешательство, у 3 больных — 2, а 2 пациентам потребовалось проведение 3 операций. Таким образом, в повторных операциях нуждались 5 из 14 прооперированных детей (35,7%). Причиной этого может быть, вероятно, смешанная или не-СГА-этиология заболевания (это те 2 ребенка, у которых смена АБТ была обоснована). Но у остальных пациентов возможной причиной повторных оперативных вмешательств могли оказаться макроскопические особенности воспаления в очаге поражения, которые заставляли хирургов, по понятным причинам, делать более щадящие операции, чем требовалось. Дело в том, что некротизирующий фасциит стрептококковой этиологии отличается от фасциитов другой этиологии наличием прозрачного серозного экссудата в пораженных тканях, отсутствием запаха; пораженная фасция белесоватого цвета, дряблая, без видимого гнойного расплавления и с незаметным переходом в здоровую ткань [8].

В комплексное лечение детей с ВО, осложнившейся тяжелыми ГСО, включалась также иммунозаместительная терапия в виде применения ВВИГ. Последний применялся у 19 детей (79,2%) в дозе от 156,3 до 312,5 мг/кг на одно введение (в среднем 247,3 ± 11,7 мг/кг) ежедневно или через день с кратностью применения от 1 до 4 (в среднем 1,6 ± 0,2).

У детей, получавших ВВИГ, в 10 случаях из 19 удалось обойтись без операции (52,6%). У пациентов, которым этот препарат не назначался, хирургическое лечение не проводилось заметно реже (у 20%). Эффект от ВВИГ отсутствовал у 2 из 19 пациентов, которым он назначался (у одного однократно, у второго двукратно). У остальных 17 детей (89,5%) отмечался частичный или полный ответ на применение препарата.

Выводы:

1. Поражения ЦНС на фоне ВО развиваются редко и в большинстве случаев протекают в виде ПВЭ. В клинике ПВЭ отсутствует или слабо выражен ССВО. Ведущим в клинике этого осложнения является ТМА с соответствующей симптоматикой. На фоне преобладания мозжечковых нарушений у части больных отмечаются признаки поражения пирамидной системы: кортико-нуклеарных и кортико-спинальных путей, а также легкая стволовая симптоматика. Мышечная гипотония выражена в различной степени, но у всех в большей мере и дольше сохраняются в ногах. Признаки ПВЭ появляются после прекращения высыпаний обычно на 5–8-й день от начала ВО. При отсутствии признаков активной сопутствующей ВПГ-инфекции (по клиническим данным и данным ПЦР) нет необходимости в назначении этиотропной противовирусной терапии (ацикловира). Применение ГКС-терапии патогенетически обоснованно и может быть рекомендовано для ускорения выздоровления детей с ПВЭ.

2. ГСО являются наиболее частыми осложнениями ВО у детей. Гнойное воспаление мягких тканей у таких пациентов развивается быстро (порой молниеносно), в течение 1–2 суток, проходя так называемую «точку возврата» (когда процесс еще обратим). Заподозрить развитие таких осложнений можно по сохранению на протяжении более 3–4 суток лихорадки, интоксикации и других признаков системного воспаления (или их возврату после «светлого промежутка»).

3. Полученные данные подтверждают ведущую роль *Streptococcus pyogenes* в развитии тяжелых ГСО у детей с ВО. Это может свидетельствовать о том, что в нашем регионе стал циркулировать новый, высокопатогенный серотип СГА (или несколько серотипов).

4. Учитывая ведущую роль *Streptococcus pyogenes* в развитии ГСО у детей на фоне ВО, стартовая этиотропная терапия у таких пациентов должна включать сочетание цефтриаксона с клиндамицином (или равноценную им замену, например, другие β-лактамы в комбинации с макролидами или линкомицином). Отсутствие четкого клинико-лабораторного эффекта от такой комбинации (особенно в сочетании с введением ВВИГ) следует, в первую очередь, рассматривать как признак формирования гнойного воспаления с некрозом мягких тканей. Это требует оперативного лечения, как правило, без необходимости замены АБТ.

5. При проведении хирургического лечения следует помнить, что некротизирующий фасциит стрептококковой этиологии отличается от фасциитов другой этиологии наличием прозрачного серозного экссудата в пораженных тканях, отсутствием запаха; пораженная фасция белесоватого цвета, дряблая, без видимого гнойного расплавления и с незаметным переходом в здоровую ткань.

6. Назначение ВВИГ в большинстве случаев (89,5%) дает частичный или полный эффект: снижение признаков ССВО вплоть до их купирования, уменьшение размеров воспалительного инфильтрата и его постепенное разрешение (нередко без оперативного вмешательства). Наилучшего эффекта следует ожидать при раннем применении ВВИГ (на 1- и иногда 2-е сутки ГСО).

Литература

1. Матвеев, В.А. Инфекция, вызываемая varizella-zoster вирусом: учеб.-метод. пособие / В.А. Матвеев, В.В. Шевцова. — Минск, 2009. — 32 с.

2. Feigin and Cherry's textbook of pediatric infectious diseases / R.D. Feigin [et al.]. — 6th ed. — Elsevier Health Sciences, 2009. — Vol. 2. — P. 2077–2088.

3. Gnann, J.W. Varicella-zoster virus: atypical presentations and unusual complications / J.W. Gnann // J. Infect. Dis. — 2002. — Vol. 186 (suppl. 1). — S. 91–98.

4. Nelson textbook of pediatrics / R.M. Kliegman [et al.]. — 18th ed. — Saunders, 2008. — P. 1366–1372.

5. Лещинская, Е.В. Острые вирусные энцефалиты у детей / Е.В. Лещинская, И.Н. Мартыненко; АМН СССР. — М.: Медицина, 1990. — С. 128–141.

6. Solomon, T. Viral encephalitis: a clinician's guide / T. Solomon, I.J. Hart, N.J. Beeching // Pract. Neurol. — 2007. — Vol. 7. — P. 288–305.

7. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. — Смоленск: МАКМАХ, 2007. — С. 101–112, 244–245.

8. Брико, Н.И. Инвазивная стрептококковая (группы А) инфекция: взгляд на проблему / Н.И. Брико, Н.А. Малышев, В.И. Покровский // Тер. архив. — 2005. — № 11. — С. 10–14.

9. Severe invasive group A streptococcal infections: a subject review / American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases // Pediatrics. — 1998. — Vol. 101, № 1. — P. 136–140.

Поступила 11.07.2011

COMPLICATIONS OF THE CHICKENPOX IN CHILDREN

Poznyak T.V., Scheremet A.N., Ocheretniy M.D., Buldyk E.A., Rusikevich S.S., Komir V.V., Valkovich E.M., Volkova N.G., Kepet V.A., Klyuchareva A.A., Kudin A.P.

Belarusian State Medical University;
Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education;
Municipal Children's Infection Clinical Hospital, Minsk, Belarus

Purulent complications (PC) are the most often complications of a chickenpox in children. The leading part in PC development plays *Streptococcus pyogenes*. Starting antibacterial therapy should include a combination ceftriaxone with clindamicin. It is necessary to include purpose of an intravenous immunoglobulin in complex treatment of such children as soon as possible. Absence of clinical and paraclinical effects from such therapy testifies to formation purulently-necrosis inflammations. It demands operative treatment, as a rule, without necessity of replacement of antibacterial therapy. The CNS defeats on a background chickenpox develop seldom and in most cases proceed as cerebellar ataxia. Attributes of cerebellar ataxia appear after the termination of rasch, is usual on 5-8-th day from the beginning of chickenpox and are connected with immunopathological inflammation. In clinical characteristic of cerebellar ataxia the absence or weak expressiveness of the system inflammatory response syndrome pays to itself. There is no necessity for antivirus therapy (acyclovir). Application of glucocorticosteroids is proved and it can be recommended for acceleration of recovery.

Keywords: chickenpox, complications, children, antibacterial therapy, intravenous immunoglobulin, cerebellar ataxia.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СТРУКТУРЫ ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ НА КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Абитаева М.С.

Институт микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

Резюме Иммунопотенциаторы, относящиеся к разным структурным группам, способны с разной интенсивностью индуцировать синтез ИЛ-4.

Ключевые слова: Клеточный иммунитет, иммуностимулятор, цитокин, иммуноферментный анализ.

Введение. Известно, что в регуляции иммунных реакций организма участвуют хелперы подклассов Th1 и Th2, т.е. клетки, ответственные за системы приобретенного иммунитета. Системы врожденного иммунитета предоставляют системам приобретенного иммунитета информацию, необходимую для выбора основного регулятора иммунной реакции, то есть хелперов Th1 и Th2, а также эффекторных механизмов иммунной реакции, клеточных или гуморальных.

Наивные, то есть не взаимодействовавшие с каким-либо антигеном, Th0 $CD4^+$-клетки могут стать или хелперами Th1 или хелперами Th2. Интерлейкин-12, образуемый антигенпрезентирующими клетками, — это главный индуктор дифференциации Th0 $CD4^+$-клеток до хелперов Th1. Таким образом, регуляторное влияние данного цитокина вместе с влияниями интерлейкина-18 и интерферонов вызывает клеточную иммунную реакцию (Th1-реакцию). Интерлейкин-12 вместе с интерлейкином-1, фактором некроза опухолей, а также интерфероном усиливают функциональную активность цитотоксических Т-клеток, натуральных киллеров, а также активированных макрофагов, которые являются главными эффекторами клеточной иммунной реакции. Цитокины 1 типа — интерлейкин-12, фактор некроза опухолей и интерферон усиливают синтез окиси азота и других флогогенов, которые являются медиаторами отсроченных реакций повышенной чувствительности. Эти цитокины называют главными провоспалительными.

Хелперы Th1 и Th2 оказывают друг на друга тормозящие влияния. Интерлейкин-12 и интерферон ослабляют функциональную активность хелперов Th2. Интерлейкин-4 и интерлейкин-10 ослабляют функциональную активность хелперов Th1. Интерлейкины 4 и 10 усиливают гуморальную иммунную реакцию, стимулируя рост и активацию тучных клеток и эозинофилов, а также дифференциацию В-клеток до В-клеток, секретирующих антитела, и вызывают сдвиг синтеза

иммуноглобулинов В-клетками в сторону иммуноглобулинов Е. При этом данные цитокины тормозят активацию макрофагов, пролиферацию Т-клеток, а также образование провоспалительных цитокинов. Поэтому данные цитокины 2 типа хелперов Th2, интерлейкин-4 и интерлейкин-10 называют главными противовоспалительными цитокинами и могут быть основной целью при сравнительном изучении различных иммуностимулирующих препаратов, использующихся в вакцинологии [1].

Целью работы являлось сравнительное изучение влияния различных иммуностимуляторов, используемых в вакцинных противовирусных препаратах на экспрессию цитокина ИЛ-4 в сыворотке экспериментальных животных.

Материалы и методы. В работе использовали инактивированный вирус гриппа A/FPV/Rostock/34 (H7N1), в сочетании с различными иммуностимуляторами: гидроокисью алюминия, сапонинсодержащими препаратами Saponaria officinalis и Gipsophila paniculata.

Иммунизацию животных (белых беспородных мышей) осуществляли с помощью подкожного способа введения препаратов. Объем вводимого материала соответствовал рекомендациям международных организаций и не превышал 0,2 мл на одно животное.

Животных иммунизировали очищенным концентрированным вирусом (30 мкг/животное), смесью вируса с гидроокисью алюминия (0,5 мг/животное) или сапонинсодержащим препаратом (15 мкг/животное).

Повторную иммунизацию животных проводили через 2 недели той же дозой антигена. Кровь брали в соответствии с рекомендациями международных организаций через 1 неделю после 2-й иммунизации.

При определении уровня цитокинов в крови мышей использовали метод, рекомендованный фирмой производителем «R&D systems». В каждом определении использовали индивидуальную сыворотку мыши без следов гемолиза. Перед подсчетом результатов проводили измерение стандартов для проверки адекватности калибровочной кривой. Учет результатов проводили спектрофотометрически с использованием многоканального спектрофотометра «TECAN».

Основные результаты. При сравнительном изучении способности различных иммуностимуляторов (гидроокиси алюминия, сапонинсодержащих адъювантов) индуцировать синтез ИЛ-4 (рисунок) было установлено, что инактивированный вирус гриппа индуцирует уровень интерлейкина в 10 раз превышающий уровень стандартного контрольного образца.

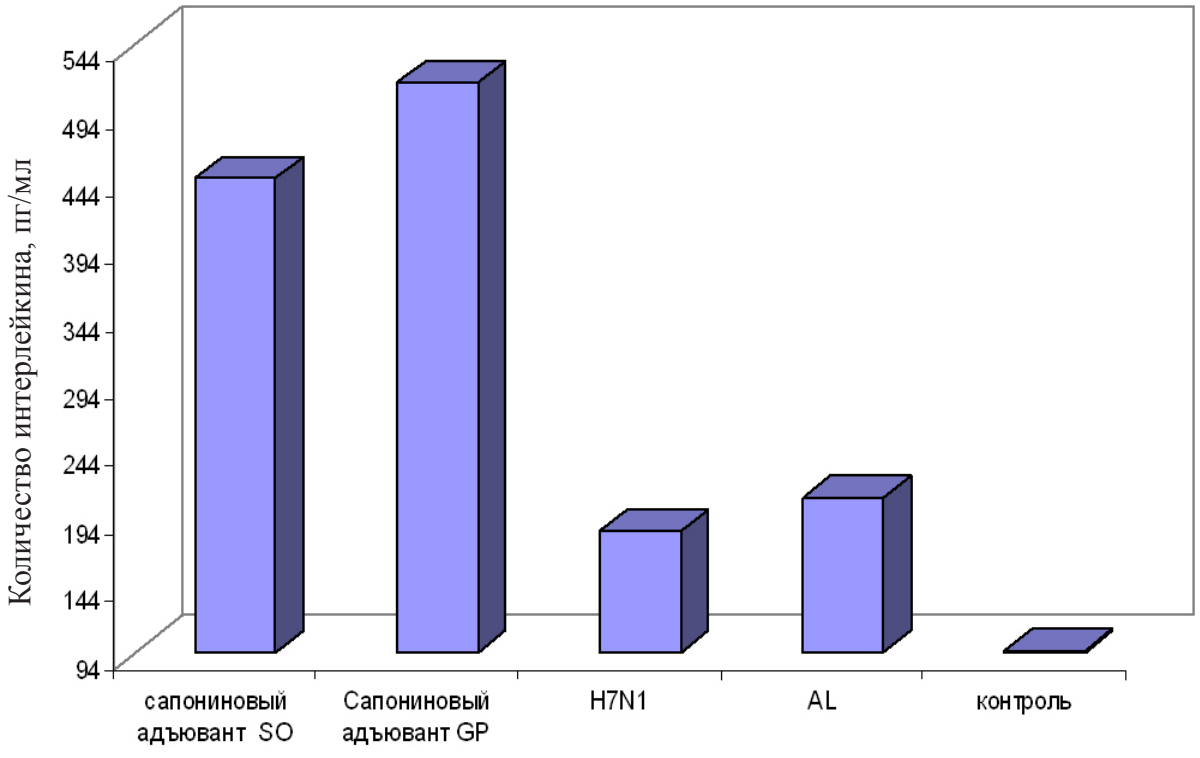


Рисунок — Уровень ИЛ-4 в сыворотках мышей

Использование гидроокиси алюминия увеличивает уровень цитокина не более чем на 10%, а использование сапонинсодержащих адъювантов привело к более чем 2-кратному увеличению уровня цитокина по сравнению с цельновирионной инактивированной вакциной. Подобное поведение иммуностимуляторов различного происхождения имеет огромное значение для вакцинопрофилактики вирусных инфекций. Это обусловлено рядом причин. Во-первых, ИЛ-4 является В-клеточным ростовым фактором I [2]. Во-вторых, ИЛ-4 способен усиливать пролиферацию Т-клеток, относящихся к различным субпопуляциям. Его действие на Т-клетки, как и на В-клетки, проявляется только после предварительной их активации антигеном или митогеном. По своей природе ИЛ-4 выступает в качестве плейотропного регулятора, так как взаимодействует с самыми разнообразными типами клеток. Так, его действие на макрофаги проявляется в усилении экспрессии молекул II класса МНС и Fc-рецептора для IgG, приобретении противоопухолевой активности по отношению к фибросаркоме, усилении антигенпредставляющей функции [3].

Заключение. Установлено, что иммунопотенциаторы, относящиеся к разным структурным группам, способны с разной интенсивностью индуцировать синтез ИЛ-4, что может стать новым методом оценки препаратов на иммуностимулирующую активность.

Литература

1. Нестерова, И.В. Особенности функционирования противовирусного иммунитета [Электронный ресурс] / И.В. Нестерова // Цитокины и воспаление. — 2005. — № 3. — Режим доступа: http://www.cytokines.ru/russian/2005/3/Art23.php. — Дата доступа: 25.07.2011.
2. Галактионов, В.Г. Иммунология: учебник / В.Г. Галактионов. — М., 2000. — 112 с.
3. Кадагидзе, З.Г. Цитокины / З.Г. Кадагидзе // Практическая онкология. — 2003. — Т. 4, № 3. — С. 131–139.

Поступила 29.07.2011

STUDY OF INFLUENCE OF IMMUNOSTIMULANT STRUCTURE ON CELLULAR IMMUNE RESPONSE

Abitayeva M.S.

Institute of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

Immunopotentiators belonging to the different structural groups with different intensity could induce synthesis of IL-4.

Keywords: cellular immunity, adjuvant, cytokine, enzyme immunoassay.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ

Ероховец Н.Ф.

Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского, Минск, Беларусь

Резюме. Статья посвящена подбору оптимальных параметров культивирования вируса болезни Ауески свиней для максимального его накопления при промышленном производстве вакцины. Установлено, что наиболее подходящей культурой клеток для накопления вируса является ВНК-21, максимальный титр вируса при стационарном способе культивирования составлял 7,5 lg $ТЦД_{50}$/мл при множественности инфицирования — 0,01–0,1 $ТЦД_{50}$, а при роллерном — 8,0 lg $ТЦД_{50}$/мл.

Ключевые слова: вирус болезни Ауески, свиньи, культивирование, оптимизация, производственный штамм.

Введение. Массовое выращивание клеток в культуре является центральным звеном любого технологического процесса, основанного на использовании клеток животных, и в первую очередь, производства противовирусных препаратов. Эта стадия определяет массу и количество клеток и тем самым в целом технологию получения вирусного сырья. Выбор способа культивирования вируса в значительной мере определяется способностью клеток размножаться на поверхности плотного субстрата или в суспензионной культуре [1–4].

При получении вакцин вирус выращивают в однослойных и суспензионных культурах различного происхождения. Суспензионные культуры постоянных линий клеток оказались весьма продуктивными для промышленного получения вирусного сырья. Вирус в этих системах накапливается в титре 10^8–10^9 $ТЦД_{50}$/мл [5, 6].

Определяющим параметром для изготовления любого вакцинного препарата является способность вируса размножаться в чувствительной биологической модели с накоплением в максимальном титре. **Целью** нашего исследования являлась отработка способа накопления вируса в перевиваемой культуре клеток с максимальным титром, определение множественности инфицирования ткани вируса [5, 6].

Материалы и методы. Для создания вакцины был использован выделенный нами штамм вируса болезни Ауески. Выделение его проводили на перевиваемой клеточной линии ВНК-21. Культивирование осуществляли стационарным методом в 1,5-литровых матрасах. Вирус инокулировали после удаления ростовой среды и трехкратного промывания монослоя раствором Хенкса. Контакт вируса с клетками осуществляли в течение 1 часа. Затем вносили по 150 $см^3$ поддерживающей питательной среды. Инкубирование инфицированных культур клеток проводили при 37 ± 0,5 °С. Контролем служили матрасы с незараженными клетками. Учет результатов проводили начиная с 17-го часа после заражения культуры клеток. При наличии цитопатического действия вируса для освобождения его из клеток матрасы замораживали при температуре минус 40 °С и оттаивали при плюс 25 °С. Исследованию подлежал вирусный материал после однократного замораживания-оттаивания вирусной суспензии, снятой через 1–2 суток после инокуляции вируса в культуру клеток.

После накопления вируса определяли его инфекционную активность титрацией на культуре клеток по стандартной методике.

Готовили десятикратные разведения вирусной суспензии на среде Игла МЕМ. Для получения разведения 10^{-1} в стерильный флакон, содержащий 9,0 $см^3$ питательной среды, вносили 1,0 $см^3$ пробы, тщательно перемешивали пипетированием. Затем 1 $см^3$ этого разведения вносили во второй флакон с 9 $см^3$ среды, тщательно перемешивали, из второго флакона брали 1 $см^3$ раствора и вносили в третий, содержащий 9 $см^3$ среды, и так далее до восьмого флакона, получая последовательно разведения: 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}.

Культуру клеток ВНК-21 заражали каждым разведением вирусной суспензии (по четыре пробирки с культурой клеток для каждого разведения). Для этого в каждую пробирку с монослоем культуры клеток ВНК-21 с помощью пипетки стерильно вносили по 0,2 $см^3$ каждого разведения (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} , 10^{-8}) вируса. Затем пробирки помещали в термостат, обеспечивающий температуру нагрева плюс 37 ± 0,5 °С, и выдерживали в течение часа, затем добавляли по 0,8 $см^3$ среды и оставляли в течение пяти суток. Титр инфекционности вакцины ($ТЦД_{50}$/мл) определяли по методу Рида и Менча.

В дальнейшем определяли чувствительность выделенного вируса к различным клеточным линиям ВНК-21, РК-15, СПЭВ и MDBK. Заражение этих клеточных линий проводили по стандартной методике, описанной выше.

Результаты и их обсуждение. Для определения наиболее оптимальной перевиваемой культуры клеток для накопления вируса в максимальном титре использовали линии ВНК-21, СПЭВ, РК-15, МДВК. Вирус разводили питательной средой и вносили в матрас из расчета 0,1, 0,01 и 0,001 $ТЦД_{50}$ на клетку. На указанных клеточных линиях выделенный штамм накапливался через 1–2 суток после заражения в стационарных условиях в титрах 4,2–7,5 lg $ТЦД_{50}$/мл. На всех культурах клеток было проведено по 7 пассажей вируса. Результаты накопления вируса болезни Ауески представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Накопление вируса болезни Ауески в перевиваемых культурах клеток

Клеточные культуры	ЦПД	Накопление штамма, lg $ТЦД_{50}$/мл
ВНК-21	+	6,0–7,5
РК-15	+	6,0
СПЭВ	+	4,2–5,66
МДВК	+	5,2

Как видно из таблицы 1, наиболее чувствительными оказались ВНК-21 и РК-15, титр вируса достигал 6,0–7,5 и 6,0 lg $ТЦД_{50}$/мл соответственно. В дальнейшем накопление вируса проводили на культуре клеток ВНК-21, так как их можно культивировать на роллерах, что дает больший выход вируса (объем роллера составляет от 2 до 4 л).

Следующий этап работы заключался в определении множественности инфицирования выбранной культуры клеток вирусом. Для этого клеточный монослой заражали различными дозами вируса — от 0,001 до 0,1 $ТЦД_{50}$. Время инкубации составляло 24–48 часов. Результаты накопления вируса представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Определение множественности инфицирования культуры клеток ВНК-21

Доза для заражения, $ТЦД_{50}$ на клетку	Время накопления вируса, часы	Накопление вируса, lg $ТЦД_{50}$/мл
0,2	24	7,5
0,1	24	7,5
0,01	24	7,0
0,001	48	6,0

Как видно из таблицы 2, самыми оптимальными дозами заражения ВНК-21 являются 0,01 и 0,1 $ТЦД_{50}$, так как титр вируса составил 7,0 и 7,5 lg $ТЦД_{50}$/мл соответственно. Увеличение дозы заражения до 0,2 $ТЦД_{50}$ не приводило к увеличению титра.

Известно, что перевиваемая культура клеток ВНК-21 хорошо культивируется на роллерах, поэтому следующий этап работы заключался в изучении возможности культивирования вируса болезни Ауески роллерным способом. Для этого провели 7 пассажей вируса на роллерах с начальным титром 3,5 lg $ТЦД_{50}$/мл.

Как видно из таблицы 3, при роллерном способе культивирования вируса болезни Ауески титр составлял 7,25–8,0 lg $ТЦД_{50}$/мл, в то время как при стационарном культивировании он был ниже и составил 6,0–7,5 lg $ТЦД_{50}$/мл. Следует заметить, что с увеличением количества пассажей до 7 титр вируса начинает снижаться.

Таблица 3 — Результаты сравнительного культивирования штамма вируса болезни Ауески свиней роллерным и стационарным способом в перевиваемой линии клеток ВНК-21

Пассаж	ЦПД	Титр вируса при культивировании	
		стационарный способ, lg $ТЦД_{50}$/мл	роллерный способ, lg $ТЦД_{50}$/мл
1	+	3,5	3,5
2	+	4,0	4,55
3	+	4,66	5,5
4	+	5,3	6,25
5	+	6,0	7,0
6	+	7,5	8,0
7	+	7,5	7,25

Заключение. В результате проведенных исследований отработаны параметры культивирования вируса болезни Ауески, которые заключались в следующем:

- подобрана наиболее подходящая культура клеток ВНК-21 для накопления вируса;
- максимальный титр вируса при культивировании стационарным способом составлял 7,5 lg $ТЦД_{50}$/мл;
- определена множественность инфицирования культуры клеток — 0,01–0,1 $ТЦД_{50}$;
- установлено, что роллерное культивирование вируса является наиболее оптимальным, так как увеличиваются титр вируса до 8,0 lg $ТЦД_{50}$/мл и объем получаемого вируса.

Литература

1. Российская коллекция клеточных культур позвоночных (РККК П) [Электронный ресурс]. — Электрон., текстовые дан. и прогр. (2,33 Мб). — М., 2007. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

2. Рубан, Е.А. Оптимизация и масштабирование процессов глубинного культивирования микроорганизмов и клеток животных / Е.А. Рубан // 100 лет Курской биофабрике и агробиологической промышленности: тез. науч.-производ. конф. — Курск, 1996. — С. 42–57.

3. Самуйленко, С.А. Потребность в кислороде и его снабжение культуры клеток / С.А. Самуйленко, Е.А. Рубан, А.Я. Самуйленко // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: материалы междунар. науч.-практ. конф. — Покров, 2003. — Ч. 2. — С. 562–566.

4. Сергеев, В.А. Культура клеток в ветеринарии и биотехнологии / В.А. Сергеев, Ю.А. Собко. — Киев: Урожай, 1990. — 152 с.

5. Абдрахманов, С.К. Биологические свойства эпизоотического штамма «КОРДАЙ» вируса болезни Ауески / С.К. Абдрахманов, С.М. Мамадалиев // Вест. Алтайского гос. аграрного ун-та. — 2007. — № 5 — С. 55–57.

6. Оценка некоторых биологических свойств штаммов вируса болезни Ауески / В.И. Жестерев [и др.] // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии: материалы науч.-практ. конф. ВНИИВВиМ. — Покров, 1995. — С. 147–148.

Поступила 13.09.2011

CULTIVATION OPTIMIZATION OF AUJESZKY'S DISEASE VIRUS PRODUCTION STRAIN

Erokhovets N.F.

S.N. Vyshelessky Research Institute for Experimental Veterinary, Minsk, Belarus

Article is devoted to selection of optimum parameters of cultivation of Aujeszky's disease virus for its maximum accumulation to vaccine industrial production. It is established that the most suitable cell culture for virus accumulation is ВНК-21, maximum virus title in stationary way cultivation is 7,5 lg TCD50/cm3 in plurality infection — 0,01–0,1 TCD50, and in "spinner-culture" method — 8,0 lg TCD50/cm3.

Keywords: Aujeszky's disease virus, pigs, cultivation, optimization, production strain.

А

Абдикеримов М.М. 149
Абдрашитова Р.Т. 77
Абитаева М.С. 293
Аблова Т.А. 114
Агабеков В.Е. 186
Азарова И.А. 137
Алдашева С.А. 122
Амвросьев П.А. 13
Амвросьева Т.В. 13, 56, 60, 173
Анисько Л.А. 230
Астапов А.А. 44, 214
Асташонок А.Н. 193

Б

Балахнин С.М. 155
Безручко А.А. 56
Белова Е.Ю. 100
Бибикова О.А. 177
Бельская С.В. 73
Беляковский В.Н. 73
Березин В.Э. 163
Бибикова О.А. 177
Бирулина М.Г. 100
Богатырев В.А. 177, 204
Богдан Н.Ю. 183
Богданова Н.Л. 166
Богоявленский А.П. 163
Богуш З.Ф. 56, 60, 173
Бондаренко Т.Ю. 51
Бореко Е.И. 193
Бошьян Р.Е. 142
Булдык Е.А. 287
Бурьяк А.И. 234

В

Валькович Е.М. 287
Вареник В.М. 214
Варивода Е.Б. 90
Василенко А.И. 262
Веденьков А.Л. 102, 103, 106
Верещако Н.С. 234
Винокурова Н.В. 168
Владыко А.С. 152, 168, 234
Волкова Н.Г. 287
Володкович О.И. 106
Волченко А.Н. 73
Воропаев Е.В. 73

Г

Гаврилова И.А. 244
Гаврусев А.А. 254
Газиумарова Л.Д. 250
Галенчик А.В. 147, 199
Ганиева Р.И. 81
Гасич Е.Л. 262
Гашникова Н.М. 155
Германенко И.Г. 28
Глазкова С. 94
Гойлова А.В. 90
Голубых Н.М. 73
Гончаров А.Е. 267
Горбач Л.А. 38, 209
Горбич О.А. 35
Горбич Ю.Л. 227
Горбунова Н.А. 262
Гражданцева А.А. 51
Грибкова Н.В. 16, 21, 28, 258
Гринкевич П.И. 56, 173
Гринь В.В. 65
Грушко П.Н. 262
Грушко Т.П. 262
Гусев А.А. 137

Д

Дашкевич А.М. 258
Докукина Т.В. 129
Домейка М. 94
Дракина С.А. 106, 230
Дыкман Л.А. 177, 204

Е

Елин О.Е. 147
Емберегенова А.А. 163
Ерёмин В.Ф. 147, 262
Ермолович М.А. 44, 47, 147
Ероховец Н.Ф. 134, 137, 295
Ефимов Г.Е. 77, 81

Ж

Жавнерко Г.К. 186
Жолдошев С.Т. 122, 149

З

Зайцева И.А. 163
Залевская О.С. 102
Згировская А.А. 137
Згурская Л.И. 147
Зенова О.В. 100

И

Игнатьев Г.М. 3, 13, 152, 258
Ильенкова В.С. 262
Илькевич Н.Г. 90

К

Кабанова А.А. *183*
Кайданек Т.В. *77, 81*
Казинец О.Н. *56*
Калугина М.Ю. *142*
Капитулец Н.Н. *186, 199*
Капитулец С.П. *129, 186, 199*
Карабан И.А. *65*
Каражас Н.В. *32, 142*
Карпов И.А. *227, 262*
Качкан М.В. *147*
Кепеть В.А. *287*
Киселева Е.П. *238*
Клавсуть Г.А. *199*
Ключарева А.А. *287*
Князева О.Р. *234*
Коломиец Н. Д. *65, 86, 90*
Комир В.В. *287*
Кононович С.И. *199*
Конь Е.В. *223*
Корниенко М.Н. *32*
Коротецкий И.С. *163*
Косогова Т.А. *155*
Кочнева Г.В. *51*
Красько А.Г. *152*
Кречикова О.И. *227*
Кудин А.П. *287*
Кузнецова Л.А. *168*
Кукареко Т.М. *3*
Кулакова М.Н. *102*
Кучеров И.И. *159*
Кучимова Н.А. *77, 81*

Л

Лапушкина Т.Н. *3*
Левшина Н.Н. *90, 227, 250*
Ломако Ю.В. *137*

М

Мамчиц Л.П. *68*
Матвейчук И.В. *129*
Матиевская Н.В. *267*
Махров М.В. *129*
Мацкевич Е.Л. *220, 279*
Маяускене Т.А. *44*
Михайлопуло К.И. *238*
Мишаева Н.П. *106, 230*

Н

Наройчик Л.К. *65*
Неборская Е.И. *258*
Недзьведь М.К. *129*
Нетесов С.В. *51*
Ничипорук О.И. *199*
Новик Г.И. *238*

О

Окулич В.К. *183, 220, 279*
Орлова С.В. *193*
Очеретний М.Д. *287*

П

Павлов К.И. *16, 21*
Павлова Н.И. *3*
Парибок И.В. *186*
Паньшина Е.Ф. *250*
Пекарец Е.И. *68*
Пенязь Т.В. *214*
Петкевич А.С. *3, 114, 166, 199*
Плотников Ф.В. *183, 220*
Позняк Т.В. *287*
Поклонская Н.В. *56, 173*
Полещук Н.Н. *186*
Пучкова Л.И. *155*

Р

Рахуба Д.В. *238*
Рогачева Т.А. *152, 230*
Романенко А.И. *149*
Рубаник Н.Н. *73*
Русанович А.В. *65*
Русикевич С.С. *287*
Рустамова Л.М. *166*
Рыбалкина Т.Н. *32, 142*
Рытик П.Г. *159*

С

Савицкая Н.А. *32*
Сай Н.Г. *137*
Самарина О.В. *258*
Самойлова Т.И. *102, 103, 114*
Самойлович Е.О. *44, 47, 147*
Свирчевская Е.Ю. *44, 47, 147*
Семейко Г.В. *44, 47, 147*
Семижон О.А *106*
Семижон П.А. *168*
Сенькович С.А. *183, 279*
Сергиенко Е.Н. *28*
Сивец Н.В. *28*
Сиволобова Г.Ф. *51*
Силин А.Е. *73*
Синюк К.В. *16, 21*
Сирица А.В. *223*
Соколов О.И. *177*
Соколова Н.С. *163*
Солдатова И.А. *163*
Сосинович С.В. *262*
Староверов С.А. *177, 204*
Стегний В.А. *106*
Суванбеков А.А. *149*

Суетнов О.Н. *262*
Счеслёнок Е.П. *152, 168*

Т

Тамеева И.Н. *73*
Тебеньков А.В. *142*
Теплякова Т.В. *155*
Терновой В.А. *51*
Титов Л.П. *3, 16, 21, 94, 244, 250, 258*
Ткачев С.В. *234*
Тойчуев Р.М. *122*
Тонко О.В. *86, 90*
Тулин С. *94*
Турмагамбетова А.С. *163*

У

Унемо М. *94*
Ушков А.А. *234*

Ф

Федоренко Е.В. *86*
Феклисова Л.В. *32*
Фидаров Ф.М. *199*
Фомина Е.Г. *152, 168*

Х

Ханенко О.Н. *86*

Ц

Цыркунов В.М. *267*

Ч

Чаусов Е.В. *51*
Чередняк А.Н. *220, 279*
Чистенко Г.Н. *35*

Ш

Шайхиева Г.М. *77, 81*
Шатон Н.А. *90*
Шевцова А.Н. *73*
Шеремет А.Н. *287*
Шилин В.Е. *220*
Шилов Г.Н. *129*
Шиманович В.П. *47*
Школина Т.В. *152, 168*
Шмелёва Н.Д *86*
Шмелёва Н.П. *16, 21, 28, 258*
Штыров А.А. *193*

Щ

Щерба В.В. *230*

Я

Яшкова С.Е. *102, 103, 106*

B

Boka V. *283*

C

Chapenko S. *274, 283*
Cunskis E. *283*

F

Folkmane I. *274*

G

Gintere S. *110*
Gravelsina S. *283*

K

Karelis G. *110*
Krūmiņa A. *110*

L

Logina I. *110*

M

Murovska M. *274, 283*

N

Nora-Krukle Z. *283*

P

Pheby D. *125*

R

Rozental R. *274*

S

Sprudzāns G. *110*
Sultanova A. *274, 283*

V

Vīksna L. *110*

Z

Ziedina I. *274*

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

Титов Л.П., Игнатьев Г.М., Петкевич А.С., Павлова Н.И., Лапушкина Т.Н., Кукареко Т.М.
ИТОГИ ВЫПОЛНЕНИЯ ГОСУДАРСТВЕННОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ПРОГРАММЫ «ИНФЕКЦИОННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ»..... 3

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ... 13

Амвросьева Т.В., Игнатьев Г.М., Амвросьев П.А.
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ РАЗВИТИЯ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ 13

Синюк К.В., Титов Л.П., Павлов К.И., Грибкова Н.В., Шмелёва Н.П.
ДИНАМИКА ЭВОЛЮЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕНА НЕЙРАМИНИДАЗЫ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ГРИППА А (H1N1) НА ПРОТЯЖЕНИИ 2009 ГОДА..... 16

Павлов К.И., Титов Л.П., Синюк К.В., Грибкова Н.В., Шмелёва Н.П.
ВАРИАЦИОННОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И МУТАЦИОННОЕ ДАВЛЕНИЕ ГЕНА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА A/CALIFORNIA/04/2009(H1N1)...21

Сивец Н.В., Шмелёва Н.П., Сергиенко Е.Н., Германенко И.Г., Грибкова Н.В.
АССОЦИАЦИЯ РЕСПИРАТОРНОЙ ПАТОЛОГИИ ДЕТЕЙ С БОКАВИРУСОМ ЧЕЛОВЕКА... 28

Корниенко М.Н., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Феклисова Л.В., Савицкая Н.А.
РОЛЬ *PNEUMOCYSTIS JIROVECI* В ЭТИОЛОГИИ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ОСЛОЖНЕННЫМ ТЕЧЕНИЕМ В УСЛОВИЯХ СМЕШАННОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ У ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ 32

Горбич О.А., Чистенко Г.Н.
РОЛЬ *MYCOPLASMA PNEUMONIAE И CHLAMYDOPHILA (CHLAMYDIA) PNEUMONIAE* В РАЗВИТИИ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ СРЕДИ ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ 35

Горбач Л.А.
ТУБЕРКУЛЕЗ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ СРЕДИ ДЕТСКОГО И ПОДРОСТКОВОГО НАСЕЛЕНИЯ ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ 38

Самойлович Е.О., Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А., Семейко Г.В., Маяускене Т.А., Астапов А.А.
ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ К КОРИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2011 ГОДУ 44

Шиманович В.П., Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А.
ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАБОРАТОРНО ПОДТВЕРЖДЕННЫХ СЛУЧАЕВ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА, ВЫЯВЛЕННЫХ В БЕЛАРУСИ В 2011 ГОДУ..... 47

Бондаренко Т.Ю., Терновой В.А., Чаусов Е.В., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Нетесов С.В.
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА А, ВЫЯВЛЕННЫХ В СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ 51

Амвросьева Т.В., Казинец О.Н., Безручко А.А., Гринкевич П.И., Поклонская Н.В., Богуш З.Ф.
СПЕКТР И МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ-КОНТАМИНАНТОВ ВОДЫ ПЛАВАТЕЛЬНЫХ БАССЕЙНОВ..... 56

Богуш З. Ф., Амвросьева Т. В.
ВИРУСНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД И ОЦЕНКА ИХ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ..... 60

Русанович А.В., Коломиец Н.Д., Гринь В.В., Наройчик Л.К., Карабан И.А.
ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ 65

Мамчиц Л.П., Пекарец Е.И.
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ В ГОМЕЛЬСКОМ РЕГИОНЕ 68

Волченко А.Н., Воропаев Е.В., Беляковский В.Н., Силин А.Е., Бельская С.В., Шевцова А.Н., Тамеева И.Н., Голубых Н.М., Рубаник Н.Н.
НОСИТЕЛЬСТВО ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕНОГО РИСКА И ДРУГИХ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ОБЩЕЙ ПОПУЛЯЦИИ ЖЕНЩИН ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ 73

Шайхиева Г.М., Ефимов Г.Е., Кайданек Т.В., Кучимова Н.А., Абдрашитова Р.Т.
ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ОСТРЫМИ КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ НЕУСТАНОВЛЕННОЙ ЭТИОЛОГИИ НА ОТДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН 77

Шайхиева Г.М., Ефимов Г.Е., Кайданек Т.В., Кучимова Н.А., Ганиева Р.И.
ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ОСТРЫМИ КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ УСТАНОВЛЕННОЙ ЭТИОЛОГИИ НА ОТДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН 81

Коломиец Н.Д., Тонко О.В., Ханенко О.Н., Федоренко Е.В., Шмелёва Н.Д.
АЛГОРИТМ АНАЛИЗА И ОЦЕНКИ ВЕРОЯТНОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ КОНТАМИНАЦИИ ПИЩИ 86

Тонко О.В., Коломиец Н.Д., Гойлова А.В., Илькевич Н.Г., Левшина Н.Н., Варивода Е.Б., Шатон Н.А.
РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИЯМИ В УЧРЕЖДЕНИИ РОДОВСПОМОЖЕНИЯ 90

Глазкова С., Тулин С., Титов Л., Домейка М., Унемо М.
ПЕРВАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *NEISSERIA MENINGITIDIS* В БЕЛАРУСИ .. 94

Белова Е.Ю., Бирулина М.Г., Зенова О.В.
РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ МЕНИНГОКОККОВОГО НОСИТЕЛЬСТВА СРЕДИ ОРГАНИЗОВАННЫХ ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА В ПЕРВОМАЙСКОМ РАЙОНЕ Г. МИНСКА В 2011 ГОДУ 100

Самойлова Т.И., Залевская О.С., Кулакова М.Н., Яшкова С.Е., Веденьков А.Л.
ВЫЯВЛЕНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В БЕЛАРУСИ 102

Самойлова Т.И., Яшкова С.Е., Веденьков А.Л.
ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ БУНЬЯВИРУСА ТЯГИНЯ В ЭТИОЛОГИИ СЕЗОННЫХ НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ЛИХОРАДОК В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ 103

Мишаева Н.П., Дракина С.А., Стегний В.А., Веденьков А.Л., Яшкова С.Е., Володкович О.И., Семижон О.А.
РОЛЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В КАЧЕСТВЕ РЕЗЕРВУАРА И ПЕРЕНОСЧИКА КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ 106

Sprudzāns G., Krūmiņa A., Karelis G., Gintere S., Vīksna L., Logina I.
SURVEY OF POST-LYME DISEASE SYMPTOMS 110

Самойлова Т.И., Аблова Т.А., Петкевич А.С.
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ПО ЛИХОРАДКЕ КУ В НЕКОТОРЫХ СТРАНАХ ЕВРОПЫ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ 114

Жолдошев С.Т., Тойчуев Р.М., Алдашева С.А.
О ВОЗНИКНОВЕНИИ И УГАСАНИИ СЛУЧАЕВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ЮЖНЫХ РЕГИОНОВ КЫРГЫЗСТАНА 122

Pheby D.
THE UK NATIONAL ME/CFS OBSERVATORY: THE BALANCE SHEET AFTER THREE YEARS 125

Капитулец С.П., Докукина Т.В., Недзьведь М.К., Шилов Г.Н., Махров М.В., Матвейчук И.В.
ДЕМЕНЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ:
РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ 129

Ероховец Н.Ф.
АНАЛИЗ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО БОЛЕЗНИ АУЕСКИ СВИНЕЙ
В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ 134

Згировская А.А., Гусев А.А., Азарова И.А., Ломако Ю.В., Ероховец Н.Ф., Сай Н.Г.
МОНИТОРИНГ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ
В НЕКОТОРЫХ ОБЛАСТЯХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ 137

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ, ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА 142

Калугина М.Ю., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Бошьян Р.Е., Тебеньков А.В.
ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ ГЕРПЕТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ 142

Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Свирчевская Е.Ю., Елин О.Е., Ермолович М.А., Згурская Л.И., Еремин В.Ф., Качкан М.В., Галенчик А.В.
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА КЛАССИЧЕСКОЙ
И ВАКЦИНОАССОЦИИРОВАННОЙ КОРИ 147

Абдикеримов М.М., Романенко А.И., Суванбеков А.А., Жолдошев С.Т.
ЛАБОРАТОРНОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО
ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С 149

Владыко А.С., Фомина Е.Г., Счесленок Е.П., Красько А.Г., Школина Т.В., Рогачева Т.А., Игнатьев Г.М.
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С 152

Гашникова Н.М., Косогова Т.А, Пучкова Л.И., Балахнин С.М., Теплякова Т.В.
ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ
В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА 155

Кучеров И.И., Рытик П.Г.
ОЦЕНКА АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ
ПРОИЗВОДНЫХ ДИФЕНОЛОВ 159

Турмагамбетова А.С., Зайцева И.А., Коротецкий И.С., Соколова Н.С., Ембергенова А.А., Солдатова И.А., Богоявленский А.П., Березин В.Э.
АНТИВИРУСНЫЙ ПРЕПАРАТ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ 163

Богданова Н.Л., Рустамова Л.М., Петкевич А.С.
СОЧЕТАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РИБАМИДИЛА И ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ
ПРИРОДНОГО СЫРЬЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ,
ВЫЗЫВАЕМОЙ ВИРУСОМ ЛАССА 166

Фомина Е.Г, Счеслёнок Е.П., Кузнецова Л.А., Винокурова Н.В., Школина Т.В., Семижон П.А, Владыко А.С.
ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМА
ВИРУСА ЛИМФОЦИТАРНОГО ХОРИОМЕНИНГИТА 168

Гринкевич П.И., Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Богуш З.Ф.
ВИРУССОРБИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ВОЛОКНИСТЫХ ИОНООБМЕННЫХ
МАТЕРИАЛОВ ТИПА ФИБАН И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ УЛАВЛИВАНИЯ ВИРУСОВ
ИЗ ВОДОПРОВОДНОЙ ВОДЫ 173

Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Староверов С.А., Бибикова О.А., Соколов О.И.
ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЙ АГЕНТ
В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ 177

Плотников Ф.В., Окулич В.К., Кабанова А.А., Богдан Н.Ю., Сенькович С.А.
ВИЗУАЛИЗАЦИЯ БИОПЛЕНОК С ПОМОЩЬЮ КОНФОКАЛЬНОЙ
И СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ 183

Капитулец С.П., Жавнерко Г.К., Парибок И.В., Капитулец Н.Н., Полещук Н Н., Агабеков В.Е.
УПРАВЛЯЕМАЯ ФИКСАЦИЯ КОНФОРМАЦИОННО-ИЗМЕНЕННЫХ БЕЛКОВ
НА ЛОКАЛЬНО АКТИВИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТИ КРЕМНИЯ
ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛОВЕКА 186

Штыров А.А., Орлова С.В., Асташонок А.Н., Бореко Е.И.
РАЗРАБОТКА И ПОЛУЧЕНИЕ АДЕНОВИРУСНОГО АНТИГЕНА
ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ 193

Капитулец С.П., Ничипорук О.И., Капитулец Н.Н., Петкевич А.С., Фидаров Ф.М.,
Клавсуть Г.А., Кононович С.И., Галенчик А.В.
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКИ ЛЕПТОСПИРОЗА 199

Дыкман Л.А., Староверов С.А., Богатырев В.А.
ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ И ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ НА ТУБЕРКУЛИН
И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ 204

Горбач Л.А.
КОЭФФИЦИЕНТ СООТНОШЕНИЯ ЛИМФОЦИТЫ/СЕГМЕНТОЯДЕРНЫЕ НЕЙТРОФИЛЫ
У ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ 209

Астапов А.А., Вареник В.М., Пенязь Т.В.
ПНЕВМОКОККОВЫЕ НЕЙРОИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ: ПЕРСПЕКТИВЫ ЛЕЧЕНИЯ 214

Окулич В.К., Шилин В.Е., Чередняк А.Н., Мацкевич Е.Л., Плотников Ф.В.
КОМПЛЕКСНАЯ СИСТЕМА ДИАГНОСТИКИ АНАЭРОБНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ 220

Сирица А.В., Конь Е.В.
ФАКТОРЫ, СПОСОБСТВУЮЩИЕ ФОРМИРОВАНИЮ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У БАКТЕРИЙ 223

Горбич Ю.Л., Карпов И.А., Кречикова О.И., Левшина Н.Н.
ACINETOBACTER BAUMANNII-АССОЦИИРОВАННЫЕ ИНФЕКЦИИ:
ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ТЕРАПИИ 227

Дракина С.А., Анисько Л.А., Рогачева Т.А., Щерба В.В., Мишаева Н.П.
ДИАГНОСТИКА ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ
ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ, В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ 230

Ткачев С.В., Бурьяк А.И., Князева О.Р., Верещако Н.С., Ушков А.А., Владыко А.С.
ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ 1-АНИЛИНО-8-НАФТАЛИН СУЛЬФОНАТА
ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С *BORRELIA BURGDORFERI* 234

Киселева Е.П., Михайлопуло К.И., Рахуба Д.В., Новик Г.И.
БИОПОЛИМЕРЫ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*, ИЗБИРАТЕЛЬНО
ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С АНТИ-ГЛИАДИНОВЫМИ АНТИТЕЛАМИ ЧЕЛОВЕКА:
ОБНАРУЖЕНИЕ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЦЕЛИАКИИ 238

Гаврилова И.А., Титов Л.П.
ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СУББИОЦИДНЫХ ДОЗ ПОЛИГУАНИДИНА
НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КОЛОНИЙ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК
PSEUDOMONAS AERUGINOSA МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ 244

Газиумарова Л.Д., Паньшина Е.Ф., Титов Л.П., Левшина Н.Н.
РАЗРАБОТКА СУХОГО ПИТАТЕЛЬНОГО БУЛЬОНА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИСТЕРИЙ 250

Гаврусев А.А.
АЛГОРИТМ ОБСЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ УРЕТРОПРОСТАТИТОМ НА УРОГЕНИТАЛЬНЫЙ ТРИХОМОНИАЗ 254

ИМУННЫЕ АСПЕКТЫ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ИХ ИММУНОПРОФИЛАКТИКА 258

Дашкевич А.М., Игнатьев Г.М., Грибкова Н.В., Шмелёва Н.П., Титов Л.П., Самарина О.В., Неборская Е.И.
РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ РЕАКТОГЕННОСТИ И ИММУНОГЕННОСТИ ГРИППОЗНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ «ВАКСИГРИПП» 258

Ерёмин В.Ф., Гасич Е.Л., Сосинович С.В., Суетнов О.Н., Горбунова Н.А., Ильенкова В.С., Грушко П.Н., Грушко Т.П., Василенко А.И., Карпов И.А.
МУТАЦИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ/СПИД, НАХОДЯЩИХСЯ НА ВААРТ 262

Матиевская Н.В., Цыркунов В.М., Гончаров А.Е.
МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ И ТОРМОЖЕНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С КОИНФЕКЦИЕЙ ВИЧ/ВГС 267

Chapenko S., Ziedina I., Folkmane I., Sultanova A., Rozental R., Murovska M.
THE IMPACT OF BETA-HERPESVIRUSES INFECTION ACTIVATION ON EARLY COMPLICATIONS DEVELOPMENT FOLLOWING RENAL TRANSPLANTATION 274

Окулич В.К., Сенькович С.А., Чередняк А.Н., Мацкевич Е.Л.
БАПНА-АМИДАЗНАЯ И ЛИЗИН-Р-НИТРОАНИЛИД-АМИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ 279

Gravelsina S., Nora-Krukle Z., Chapenko S., Sultanova A., Boka V., Cunskis E., Murovska M.
INCIDENCE OF HUMAN HERPESVIRUS 6, 7, AND PARVOVIRUS B19 INFECTION IN PATIENTS WITH THYROID GLAND DISORDERS 283

Позняк Т.В., Шеремет А.Н., Очеретний М.Д., Булдык Е.А., Русикевич С.С., Комир В.В., Валькович Е.М., Волкова Н.Г., Кепеть В.А., Ключарева А.А., Кудин А.П.
НЕГЛАДКОЕ ТЕЧЕНИЕ ВЕТРЯНОЙ ОСПЫ У ДЕТЕЙ 287

Абитаева М.С.
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СТРУКТУРЫ ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ НА КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ 293

Ероховец Н.Ф.
ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ 295

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ 299

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ 302

НАУЧНОЕ ИЗДАНИЕ

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Сборник научных трудов

Выпуск 4

Ответственный редактор А.С. Владыко
Редакторы И.А. Азарова, Т.А. Аблова, О.О. Заливако

Ответственный за выпуск О.С. Капранова
Корректор У.Л. Чапковская
Компьютерная верстка У.Л. Чапковская

Подписано в печать 22.12.2011. Формат 60×84/8.
Бумага офсетная. Печать ризографическая.
Усл. печ. л. 36,27. Уч.-изд. л. 29,32.
Тираж 115 экз. Заказ № 17.
Выпущено по заказу РНПЦЭМ
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

Отпечатано в отделе оперативной полиграфии
государственного учреждения
«Республиканская научная медицинская библиотека»
ЛП № 02330/0494258 от 19.05.2009.
ул. Фабрициуса, 28, 220007, г. Минск