МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

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

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Сборник научных трудов

выпуск 7

Минск
2014

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

ISSN 2310-0990

Сборник нучных трудов
Основан в 2008 г.

Редакционная коллегия:

Т.В. Амвросьева, д-р мед. наук, проф. (зам. главного редактора),
Е.И. Бореко, д-р мед. наук, доц. (зам. главного редактора),
В.А. Горбунов, канд. мед. наук, доц.,
В.Ф. Ерёмин, д-р мед. наук, доц.,
И.И. Кучеров, д-р мед. наук,
Н.П. Мишаева, д-р биол. наук, доц.,
Н.Н. Полещук, д-р мед. наук, проф.,
Т.И. Самойлова, д-р биол. наук, доц.,
Е.О. Самойлович, д-р мед. наук, доц.,
Л.В. Скрипова, д-р биол. наук, проф.,
М.Е. Хмара, д-р мед. наук,
Г.Н. Чистенко, д-р мед. наук, проф.

Редакционный совет:

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

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

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

С 56 **Современные проблемы инфекционной патологии человека:** сб. науч. тр. Вып. 7 / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Электрон. текстовые данные. — Минск: ГУ РНМБ, 2014. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

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

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

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

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

УДК 616.9(066)(045)
ББК Р.25.2.0.1

© Составление. ГУ РНПЦЭМ, 2014.
© Оформление. ГУ «Республиканская научная медицинская библиотека», 2014.

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ОБЕСПЕЧЕНИЯ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Горбунов В.А.[1], Филонюк В.А.[2], Карабан И.А.[2], Мельникова Е.И.[1], Петкевич А.С.[1], Шиманович В.П.[1], Лапушкина Т.Н.[1]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;

[2]Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Минск, Беларусь

Инфекционные болезни (ИБ) занимают значительное место в патологии человека: на их долю в нашей стране и за рубежом приходится не менее 40–60% от всех регистрируемых заболеваний. При этом показатели заболеваемости ИБ являются одним из основных критериев оценки здоровья населения. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) считает распространенность инфекций важнейшим компонентом «индекса здоровья», а усилия здравоохранения, направленные на сокращение заболеваемости и ликвидацию инфекций, рассматривает как важное слагаемое сохранения здоровья нации.

На фоне успехов, достигнутых медицинской наукой и практикой в области борьбы с инфекционными заболеваниями (ликвидация оспы, значительное снижение заболеваемости вакциноуправляемыми инфекциями, создание новых технологий и методов диагностики и профилактики инфекционных заболеваний и т. д.), с инфекционными и паразитарными болезнями связано 25% всей смертности в мире (более 50 млн человек ежегодно), а с учетом роли инфекции в патогенезе «неинфекционных» заболеваний — почти 35%. По данным ВОЗ, первое место по заболеваемости занимают острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), включая грипп, далее — пневмония, ВИЧ/СПИД, диареи, туберкулез, малярия и корь, а по смертности — малярия, ВИЧ/СПИД, туберкулез и вирусные гепатиты.

В настоящее время в природе насчитывается более 1,4 тыс. различных видов возбудителей, способных вызвать инфекционные заболевания, и по многим из них в мире сохраняется нестабильная эпидемиологическая ситуация. Особенностью современного этапа является сочетание двух отчетливых тенденций. Первая обусловлена так называемыми «возвращающимися инфекциями», т. е. доставшимися нам «в наследство» от предыдущих веков и вызывающие сегодня значительные трудности при их профилактике. Вторая связана с появлением новых инфекций, представляющих чрезвычайно серьезную проблему в современном обществе, число которых за последние годы превысило 30 нозологических форм.

Перечень инфекционных болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране на территории Таможенного Союза, включает 24 нозологические формы: натуральная оспа, чума, холера, желтая лихорадка, лихорадка Эбола, лихорадка Марбург, лихорадка Ласса, крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Западного Нила, лихорадка Денге, лихорадка долины Рифт, полиомиелит, грипп птиц, малярия, менингококковая инфекция, туберкулез, бруцеллез, сибирская язва, лихорадки Хунин, Мачупо, ТОРС, сап, мелиоидоз, сыпной тиф. Перечень этот гибкий и в соответствии с Международными медико-санитарными правилами (2005) предусматривает возможность включения в него «новых» опасных инфекционных болезней.

В ближайшие десятилетия частота вспышек новых инфекций человека может увеличиться. Эволюции, распространению и поддержанию инфекционных болезней способствует ряд факторов.

Во-первых — это социальные факторы: бурное развитие современных транспортных коммуникаций, способствующее перемещению населения, миграция вследствие гражданских беспорядков и обеднение стран, постоянное увеличение как общей численности населения, так и количества плотно населенных городов, особенности поведения и питания населения, увеличение продолжительности жизни человека.

Во-вторых — это факторы со стороны микроорганизмов, в частности, изменение вирулентности, токсинопродуцирующей способности и резистентности.

В-третьих — это проблема глобального потепления, последствия которого заключаются в существующей возможности появления тропических инфекционных заболеваний в нехарактерных регионах.

В-четвертых — факторы, связанные с деятельностью систем здравоохранения: появление новых медицинских технологий, широкое применение иммунодепрессантов и антибиотиков. Не последнюю роль играет и современное состояние системы санитарно-противоэпидемической работы в мире: ослабление внимания к инфекционным болезням со стороны отдельных стран, сворачивание некоторых научных и профилактических программ, неадекватное мониторирование инфекций. Это привело в последние годы к замедлению темпов снижения заболеваемости инфекциями, в т. ч. управляемыми средствами вакцинопрофилактики, а заболеваемость некоторыми из них (корью, коклюш, туберкулез) в ряде стран даже увеличилась.

В-пятых — дестабилизирующим фактором являются угрозы и имеющие место акты биотерроризма.

Гибель людей, прямые и косвенные экономические потери от инфекционных заболеваний, составляющие миллиарды рублей, — все это позволяет рассматривать контроль над инфекциями как одну из важнейших задач современного периода для любого государства.

Успех этой работы во многом зависит от согласованных действий науки и практического здравоохранения. Несомненно, развитие системы эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями должно строиться на основе принципов научной обоснованности.

Стратегические направления по борьбе с инфекционными болезнями включают в себя интенсификацию научных исследований, совершенствование системы мониторинга и мер профилактики и лечения, а также развитие инфраструктуры. Это требует целого ряда согласованных мероприятий, лежащих не только в сфере высоких технологий и медицины, но и умелого администрирования, направленных капиталовложений и общественных усилий, а также эффективной международной кооперации.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (далее — Центр) является ведущим научно-исследовательским центром страны, где выполняется широкий спектр научно-исследовательских работ фундаментального и прикладного характера в области эпидемиологии, медицинской вирусологии, микробиологии, иммунологии и паразитологии. Специалистами Центра проводятся работы по созданию высокочувствительных и эффективных методов диагностики, лечения и профилактики паразитарных и инфекционных заболеваний; профессиональные консультации по методам исследований и диагностике инфекций, их профилактике; осуществляется разработка и совершенствование системы эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями.

Исследования в Центре проводятся в рамках практически всех существующих в нашей стране форм организации научных исследований: государственных, государственных научно-технических, отраслевых научно-технических, межгосударственных целевых программ, Белорусского фонда фундаментальных исследований, отечественных и международных проектов. Заказчиком (государственным заказчиком) подавляющего числа программ выступает Министерство здравоохранения Республики Беларусь.

В настоящее время Центр выполняет 56 научных заданий в рамках 14 программ, а также договорные работы по выполнению НИР.

С 2011 г. Центр является головной организацией-исполнителем подпрограммы «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» государственной научно-технической программы «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики» (2011–2015 гг.) [1] (далее — Подпрограмма).

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

В соответствии с поставленной целью решаются следующие задачи Подпрограммы:

- разработка и внедрение молекулярно-генетических методов в систему мониторинга актуальных

[1] Постановление Совета Министров Республики Беларусь № 719 от 15.08.2013 «О внесении изменений и дополнений в постановление Совета Министров Республики Беларусь от 01.02.2011 № 116».

- создание современных средств диагностики вирусных, бактериальных и иммунных заболеваний (ОРВИ, экзантемные, кишечные инфекции, гепатиты, туберкулез и др.);

- разработка средств и методов контроля природно-очаговых, карантинных и особо опасных инфекционных заболеваний;

- разработка и внедрение в практику здравоохранения страны новых средств и методов профилактики и лечения ряда инфекционных и иммунных (аутоиммунных) заболеваний;

- совершенствование и внедрение методов контроля качества медицинских иммунобиологических лекарственных средств.

В ходе выполнения научных заданий получены следующие результаты:

- с использованием молекулярно-биологических методов поддерживается постоянный мониторинг наиболее актуальных для республики инфекций — ОРВИ, ВИЧ, гепатита С, полиомиелита, кори, краснухи, парвовирусной инфекции, эпидемического паротита, коклюша, энтеровирусной и природно-очаговых инфекций, менингита и др.;

- охарактеризованы и депонированы новые штаммы инфекционных агентов, выделенных в стране;

- разработаны новые технологии (методы) диагностики, профилактики и лечения инфекционных и иммунных (аутоиммунных) заболеваний;

- разработаны компоненты диагностических препаратов, лабораторные и экспериментальные образцы тест-систем.

Результаты, полученные при выполнении научно-исследовательских работ фундаментального и прикладного характера, стали базой для научного обоснования и внедрения в организациях практического здравоохранения санитарно-противоэпидемических и профилактических мероприятий, поиска новых подходов к решению актуальных вопросов диагностики, профилактики и лечения инфекционных болезней.

Разработки Центра защищены патентами на изобретения. За последние 20 лет оформлено 72 патента (из них 29 патентов за период 2011–2014 гг.), из них 71 — Республики Беларусь, 1 патент — совместно с Российской Федерацией, 3 патента — на полезную модель. В настоящее время делопроизводство ведется по 16 заявкам на изобретения Республики Беларусь. Зарегистрировано 2 товарных знака.

На основе результатов научно-исследовательских работ Центром разрабатываются важные законодательные, директивные и инструктивно-методические документы, направленные на реализацию санитарно-противоэпидемических мероприятий, мер по профилактике и лечению пациентов. За последние 3 года было утверждено Министерством здравоохранения Республики Беларусь 47 новых методов диагностики и профилактики инфекционных заболеваний. За период 2010–2013 гг. поставлено на производство 15 новых тест-систем, а всего за последние 20 лет создано более 100 тест-систем, предназначенных для диагностики и мониторинга инфекционных болезней.

Все тест-системы и диагностические наборы апробированы в лабораториях учреждений здравоохранения. В результате выполнения плана освоения и внедрения научно-технической продукции, созданной на основе современных технологий (методы биотехнологий, генной инженерии), потребности организаций здравоохранения республики в отечественных диагностических препаратах в среднем обеспечены на 70%, а по некоторым позициям — до 100%. Это способствовало валютосбережению и импортозамещению аналогичных видов продукции.

Ряд инновационных разработок Центра уникальны, имеют мировую новизну, производятся только в нашей республике и находят спрос в других странах.

В целом внедрение результатов научных исследований в практику здравоохранения проводится следующими основными путями:

- разработка приказов Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Санитарных норм и правил, инструкций по применению, издание методических рекомендаций и информационных писем, которые отражают новизну результатов НИР;

- оказание медицинских услуг учреждениям и населению страны по диагностике инфекционных и паразитарных заболеваний;

- контроль качества иммунобиологических препаратов отечественного и зарубежного производства;

- производство и поставка организациям здравоохранения диагностических препаратов;

- планирование и совместная работа с учреждениями здравоохранения;

- предоставление консультативной помощи научными сотрудниками Центра;

- проведение рабочих встреч, научно-практических семинаров, конференций, как в Центре, так и на базе других учреждений;

- обучение на рабочих местах, повышение квалификации работников практического здравоохранения;

- выступления по телевидению и в средствах массовой информации ученых Центра по актуальным проблемам инфекционной патологии.

На высоком уровне в Центре сохраняется редакционно-издательская и публикационная работа. Результаты исследований ежегодно публикуются как в научных изданиях нашей республики, так и за рубежом. За последний год опубликовано более 200 научных статей, сделано более 40 докладов на различных научных собраниях.

Международное сотрудничество является одним из обязательных элементов эффективной работы по контролю инфекционных заболеваний и поддержанию устойчивого санитарно-эпидемиологического благополучия в нашей стране. Центр активно сотрудничает со специалистами из России, Украины, Казахстана, Азербайджана, Латвийской Республики, а также из стран Европы, Азии, Америки. Совместные исследования охватывают широкий спектр вирусных и бактериальных заболеваний. Сотрудники Центра принимают участие в международных форумах с устными докладами и стендовыми сообщениями по различным проблемам инфекционной патологии.

Центр активно сотрудничает с Европейским региональным бюро Всемирной организации здравоохранения (далее — ЕРБ ВОЗ), другими международными организациями и центрами по контролю инфекционных заболеваний, участвуя:

- в международных программах по глобальной эрадикации полиомиелита и элиминации кори и краснухи в Европейском регионе;

- в Европейской лабораторной рабочей группе (ELWGD) и сети эпиднадзора за дифтерией в Европе (DIPNET);

- в Глобальной сети оповещения о вспышках болезней и ответных действий ВОЗ (WHO Global Outbreak Communications Network);

- в межгосударственном координационном Совете СНГ по проблемам внутрибольничных инфекций, мониторингу антибиотикорезистентности микроорганизмов и устойчивости к дезинфектантам.

На базе Центра успешно функционирует Региональная референс-лаборатория по ротавирусам ЕРБ ВОЗ (для Армении, Азербайджана, Грузии, Республики Молдовы, Таджикистана, Украины), а также ряд национальных (республиканских) референс-центров и референс-лабораторий:

- Национальный центр по гриппу и другим острым респираторным заболеваниям;

- Национальный референс-центр по полиомиелиту;

- республиканская референс-лаборатория по кори и краснухе;

- республиканский референс-центр мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов;

- республиканская референс-лаборатория по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний;

- республиканская референс-лаборатория генодиагностики ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов В и С.

Референс-лаборатории (референс-центры) осуществляют научно-методическое руководство выполнения программ эпидемиологического надзора за соответствующими инфекциями на территории Беларуси, являются национальными корреспондентами ВОЗ, работают в тесном сотрудничестве с ее центрами (обмен информацией, биологическими материалами, стажировка аспирантов, подготовка совместных документов и т. д.), координируют деятельность учреждений здравоохранения по реализации международных обязательств в рамках соответствующих глобальных и региональных программ. В своей деятельности референс-лаборатории (референс-центры) подотчетны Министерству здравоохранения Республики Беларусь и ЕРБ ВОЗ и предо-

ставляют в установленном порядке отчеты о результатах проведенных исследований, обзоры по эпидситуации, заключения о выполнении программ эпидемиологического надзора в республике и др.

На базе Центра функционирует «Специализированная коллекция вирусов и бактерий, патогенных для человека» [2], которая объявлена научным объектом и является национальным достоянием Республики Беларусь. Помимо научных исследований данная коллекция осуществляет сотрудничество с национальными коллекциями других стран и обеспечивает подготовку документов для выдачи Министерством здравоохранения Республики Беларусь разрешений на трансграничное перемещение (ввоз/вывоз/транзит) биологических агентов через таможенную границу страны.

Отвечая за контроль качества поступающих в республику вакцинных и других иммунобиологических лекарственных средств (ИЛС), Центр [3] проводит посерийный контроль качества зарегистрированных в Республике Беларусь ИЛС до их реализации, а также их испытания при государственной регистрации на территории страны. С целью обеспечения поступления к потребителю безопасной продукции Центр расширяет свою сертификационную деятельность по контролю качества иммунобиологических препаратов.

В результате реализации этапов заданий НИР 2014 г. планируется:

- создание более 35 новых диагностических препаратов и питательных сред;
- разработка более 20 новых методов диагностики, способов профилактики и лечения инфекционных заболеваний, мониторинга инфекций;
- продолжение работ по разделам фундаментальных и научных исследований в целях изучения эпидемической ситуации по ряду актуальных инфекций.

Учитывая, что в рамках реализации Подпрограммы не будут научно решены все проблемы, стоящие перед отечественным здравоохранением в области эпидемиологии, медицинской вирусологии, микробиологии, иммунологии и паразитологии, а также которые могут возникнуть в ближайшей и отдаленной перспективе, специалисты Центра совместно с Министерством здравоохранения Республики Беларусь в настоящее время ведут работу по подготовке новой программы (подпрограммы), направленной на дальнейшее совершенствование научно обоснованного эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями, создание импортозамещающих и валютосберегающих биотехнологических средств специфической профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекций. Планируется расширить спектр инфекций, как эндемичных для нашей страны, так и новых, малоизученных, шире внедрять методы молекулярной биологии, позволяющие дать более полную характеристику возбудителя.

В перспективе необходима разработка новых поколений отечественных иммунобиологических препаратов для более полного обеспечения потребностей практического здравоохранения. При этом принципиально новым направлением является создание на базе Центра отечественного производства вакцин. Вопросы создания такого производства в настоящее время прорабатываются.

В целом научно-исследовательская, инновационная, научно-методическая и координационная деятельность Центра, как головного научно-практического учреждения по проблеме контроля инфекционных заболеваний, направлена на поддержание устойчивого санитарно-эпидемического благополучия в нашей стране, защиту населения и санитарную охрану территорий, тем самым обеспечивая необходимый уровень биологической безопасности как составного элемента национальной безопасности Республики Беларусь.

Литература

1. Брико, Н.И. Инфекционные заболевания и глобализация / Н.И. Брико // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск, 2010. — Вып. 3. — С. 11–16.

---

[2]Постановление Совета Министров Республики Беларусь от 14.12.2012 № 1152 «Об объявлении коллекций генетических ресурсов растений, штаммов грибов, вирусов и бактерий, которые составляют национальное достояние».

[3]Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.03.2010 № 20.

2. Внутрибольничные инфекции: пер. с англ. / под ред. Р.П. Венцеля. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2004. — 840 с.
3. Руководство по инфекционным болезням / под ред. В.И. Покровского, К.М. Лобана. — М.: Медицина, 1996. — 464 с.
4. 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.
5. Мэй, Р. Инфекционные болезни человека. Динамика и контроль: пер. с англ. / Р. Мэй, Р. Андерсон. — М.: Научн. мир, 2004. — 784 с.
6. Петри, А. Наглядная медицинская статистика / А. Петри, К. Сэбин; пер. с англ.; под ред. В.П. Леонова. — 2-е изд. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 168 с.

НАУЧНЫЙ ВКЛАД АКАДЕМИКА В.И. ВОТЯКОВА В СТАНОВЛЕНИЕ И РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ АРБОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Самойлова Т.И.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Посвящается светлой памяти академика Вениамина Иосифовича Вотякова

Реферат. Статья посвящена памяти академика В.И. Вотякова (1921–2014), возглавлявшего Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения БССР в 1950–1986 гг. Кратко отражена творческая биография академика, участие в Великой Отечественной войне. В послевоенные годы он стал активным организатором борьбы с массовыми эпидемиями. Под его руководством были разработаны стратегия, тактика и реализация программ ликвидации массовых эпидемических заболеваний на территории республики. Одной из самых актуальных арбовирусных инфекций для Беларуси, которую всесторонне изучил В.И. Вотяков, был клещевой энцефалит (КЭ), изучение эпидемиологии, мер профилактики и лечения которого в Беларуси началось с 1952 г. в связи с резким ростом заболеваемости. Одним из основных вопросов в понимании проблемы КЭ встал вопрос о существовании видовых или внутривидовых различий западного и дальневосточного вируса КЭ. С 1985 г. на территории Беларуси в результате комплексных вирусологических, серологических, эпидемиологических и зоолого-паразитологических исследований кровососущих членистоногих, диких и домашних животных, пациентов установлена циркуляция других 13 арбовирусов из 5 семейств. В.И. Вотяков является основателем научной школы вирусологов Беларуси и воспитал многочисленную плеяду учеников.

Ключевые слова: академик В.И. Вотяков, арбовирусы, клещевой энцефалит, эпидемиология, Беларусь.

Академик ВОТЯКОВ Вениамин Иосифович

(1 августа 1921 г. — 18 мая 2014 г.)

Академик Национальной академии наук Беларуси, академик Российской академии медицинских наук, Российской академии естественных наук, Лауреат государственной премии Республики Беларусь, доктор медицинских наук, профессор В.И. Вотяков внес огромный вклад в изучение целого ряда арбо-, арена-, энтеровирусных инфекций, геморрагических лихорадок, бешенства, полиомиелита, гриппа, ВИЧ-инфекции, прионовых болезней, а также в изучение закономерностей циркуляции вирусов в природе, в разработку и создание антивирусных химио- и иммунобиологических препаратов, является автором более 800 научных публикаций и более 100 авторских свидетельств и патентов, основателем научной школы вирусологов Беларуси.

Выдающийся советский и белорусский вирусолог и эпидемиолог академик Вениамин Иосифович Вотяков возглавлял Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии более 35 лет в период с 1950 по 1986 гг.

Творческая биография В.И. Вотякова началась в годы Великой Отечественной войны, когда он, выпускник военного факультета 2-го Московского государственного медицинского института, в 1943 г. был направлен в действующую армию с дипломом врача по специальности «Лечебное дело» в звании капитана медицинской службы и участвовал в Великой Отечественной войне до ее окончания в качестве врача-ординатора хирургического блока, врача-эвакуатора сортировочного блока медико-санитарного батальона, старшего врача полка на Западном, Украинском, Белорусском и других фронтах, освобождал Белоруссию, Украину, Венгрию, Австрию, Чехословакию. В мирное время был членом комитета «Врачи против ядерной войны». За боевые заслуги В.И. Вотяков награжден орденами СССР Красной звезды, Отечественной войны 2-й степени, ему присуждено звание почетного ветерана Воздушно-десантных войск СССР.

В 1950 г. Вениамин Иосифович Вотяков после успешного окончания аспирантуры в Центральном государственном научно-исследовательском контрольном институте им. П.А. Тарасевича (Москва) был направлен в Беларусь, где возглавил Белорусский институт эпидемиологии, микробиологии и гигиены. Этот период его деятельности совпал со становлением и развитием таких социально значимых для здравоохранения республики и медицинской науки направлений, как эпидемиология и микробиология инфекционных заболеваний. В Беларуси в послевоенные годы полыхали эпидемии многих инфекций. Он стал активным организатором борьбы с массовыми эпидемиями. Именно под его руководством и личной ответственностью были разработаны стратегия и тактика, а также реализованы программы ликвидации массовых эпидемических заболеваний на территории республики.

Мне, как одной из учениц Вениамина Иосифовича, выпала огромная честь долгие годы работать под непосредственным руководством этого гениального ученого. Без преувеличения могу сказать, что многие направления научных исследований, выполняемые в институте, а в настоящее время в центре, — это продолжение реализации его идей. Он обладал необыкновенным даром вызывать интерес к проблеме, предлагаемой к разработке. Научная интуиция, широкий диапазон мыслей и интересов, умение поделиться этим богатством с учениками и коллегами являлось ценным качеством его как руководителя.

В данной статье речь пойдет о проблеме арбовирусных инфекций и роли академика В.И. Вотяков в становлении, изучении и решении этой проблемы. Одной из самых актуальных арбовирусных инфекций для Беларуси, которую всесторонне изучил В.И. Вотяков, был клещевой энцефалит (КЭ). Сравнения последствий этой болезни в Беларуси и на Дальнем Востоке легли в основу гипотезы об эволюции вирусов КЭ, согласно которой в различных экосистемах на территории Евразии сформировались генетические вирусные популяции, объединяющиеся в два вида, — вирус западного и вирус восточного КЭ [1–6].

Следует отметить, что арбовирусные инфекции в Беларуси начали изучаться с начала 40-х гг., когда на территории Беловежской пущи были выявлены природные очаги КЭ и выделен вирус из клещей *Ixodes ricinus.* У истоков изучения КЭ в Беларуси стояли выдающиеся ученые: академики М.П. Чумаков и Л.А. Зильбер [7, 8]. Существенный вклад академика В.И. Вотякова в изучение проблемы КЭ в Беларуси отражен не только в его научных трудах, а также в выполненных под его руководством кандидатских и докторских диссертациях по данной проблеме Б.П. Савицкого, Н.П. Мишаевой, В.С. Борткевича, И.И. Протаса [9–14]. А в кандидатской и докторской диссертациях Т.И. Самойловой приведены результаты дальнейших исследований и по другим 12 новым для республики арбовирусным инфекциям [15, 16].

Особенно большое развитие получило изучение эпидемиологии, мер профилактики и лечения КЭ в Беларуси с 1952 г., когда в связи с резким ростом заболеваемости оно стало одним из основных направлений научно-исследовательской работы Белорусского НИИ эпидемиологии и микробиологии (БелНИИЭМ) под руководством и при непосредственном участии академика В.И. Вотякова. Кроме сотрудников института к работам привлекались практические врачи, сотрудники санитарно-эпидемиологической службы, академии наук БССР, преподаватели и студенты Белорусского государственного университета. Широкое комплексирование, привлечение к работе большого числа специа-

листов различного профиля дали возможность в сравнительно короткий срок детально изучить экологию возбудителя, эпизоотологию, эпидемиологию, патогенез инфекции, разработать и испытать на практике рекомендации по профилактике и лечению заболевания в условиях Беларуси [17, 19].

Одним из основных вопросов в понимании проблемы КЭ встал вопрос о существовании видовых или внутривидовых различий западного и дальневосточного вируса КЭ. Этот вопрос является предметом дискуссий на протяжении всей истории изучения данной инфекции. В отечественной литературе преобладала тенденция рассмотрения КЭ как единой нозоформы, а вируса — как единого вида с двумя серотипами. Вместе с тем существует и иной взгляд на проблему. Известно, что один из выдающихся вирусологов современности Л.А. Зильбер придерживался точки зрения, согласно которой западный и восточный вирусы являются возбудителями двух разных клещевых энцефалитов. Последовательный сторонник этой позиции В.И. Вотяков приводит соответствующие аргументы из области вирусологических, экологических, клинических, патоморфологических исследований. Суть их сводится к тому, что антигенные различия вирусов четко выявляются специфическими методами, ареалы и основные переносчики различны, клиника и патогенез заболевания у человека имеет качественные отличия, выражающиеся в преимущественном развитии легких или тяжелых форм болезни, а также в разных мишенях для вирусов и характере патологических изменений в ЦНС [6]. Многолетние комплексные исследования позволили В.И. Вотякову и И.И. Протасу сделать заключение о том, что на территории Беларуси, ряда районов Европейской части бывшего Советского Союза и стран Европы существует самостоятельная нозологическая форма КЭ, вызываемая вирусом из группы КЭ — западный КЭ. Указанный вирус имеет общий с другими вирусами КЭ групповой или родовой антиген, определяющий особенности патогенеза, возможно, другие свойства вируса; отличается клиническим течением вызываемого им заболевания, составом хозяев, структурой зооты и путями эволюции очагов [4, 6].

В настоящее время доказана генетическая вариабельность природных популяций вируса КЭ. Принципиальное значение имеют результаты молекулярно-эпидемиологических исследований, которые показывают, что на территории огромного ареала вируса КЭ в Евразии существует 3 основных типа (генотипа): дальневосточный — тип 1; западный (центрально-европейский) — тип 2 и урало-сибирский — тип 3 [20, 21].

Основываясь на палеогеографических различиях огромного ареала вируса КЭ, простирающегося через всю территорию северной Евразии, выдвинута идея, что на протяжении эволюционного времени эти различия играли важную роль в формировании природных популяций вируса КЭ. Академик В.И. Вотяков выдвинул концепцию дифференциации ареала КЭ, согласно которой на земной поверхности стоит различать 3 основные экосистемы существования вируса КЭ. Получены данные о качественных клинических различиях КЭ дальневосточного региона и Беларуси. В Дальневосточном регионе (генотип 1) регистрируется наиболее тяжелый, очаговой формы, КЭ с высокой (30–35%) летальностью, в западной части ареала очаговые формы редки (примерно 2%), а летальность практически отсутствует. Западный КЭ с клинических позиций фактически является серозным менингитом или диффузным менингоэнцефалитом. Отмечено, что эти различия постоянны и фиксируются на протяжении всей истории КЭ. В работах В.И. Вотякова и И.И. Протаса детально изучены различия патогенности восточных и западных штаммов вируса КЭ и показано, что вирус западного КЭ первично поражает мезенхимальные клетки ЦНС, а вирус восточного КЭ вызывает первичную дегенерацию моторных нейронов [6].

Таким образом, было впервые проведено сравнительное изучение клинических форм западного и восточного КЭ на западных и восточных территориях в условиях применения использования одних и тех же критериев учета. Результаты этих исследований четко показали качественные клинические различия изучаемых заболеваний.

Другие арбовирусные инфекции в Беларуси до 1970 г. не были известны. В то же время на сопредельных с республикой территориях (Украина, Литва, Польша) уже была обнаружена циркуляция новых арбовирусов [22–24]. Это определило необходимость комплексного изучения различных аспектов проблемы арбовирусных инфекций, и в первую очередь Вениамин Иосифович ставит задачу о необходимости выделения и изучения ранее неизвестных арбовирусов в Беларуси.

Первым новым арбовирусом, выделенным нами на территории республики, был вирус Укуниеми. Он был изолирован в 1971 г. из клещей *I. ricinus* при вирусологическом обследовании клещей,

собранных на территории Беловежской пущи. Были изучены его биологические свойства и антигенная характеристика, а также его распространение в природных очагах Беларуси [15, 25]. В дальнейшем было изолировано еще 72 штамма. Изучены свойства вируса и показано, что вирус Укуниеми обладает способностью персистировать в инфицированном организме. Изучено его влияние на рост и развитие крыс и куриных эмбрионов. Установлена множественность популяций вируса Укуниеми из семейства *Bunyaviridae.* Показано, что природные популяции вируса Укуниеми выявлены во всех ландшафтно-климатических зонах республики и экологически связаны с иксодовыми клещами, мышевидными грызунами и кровососущими комарами. Обоснована схема вирусной популяции среди переносчиков и резервуаров, ядром которой являются клещи *I. ricinus.* На основании экспериментальных исследований можно полагать, что вирус Укуниеми в условиях Беларуси, особенно в зонах, подвергнутых радиоактивному загрязнению, где снижен иммунитет, по-видимому, может принимать участие в развитии персистентных вирусных инфекций, подобно вирусу гриппа [16].

Несколько позже в 1973 г. также из клещей *I. ricinus*, собранных с крупного рогатого скота на территории Гомельской области, был изолирован вирус (штамм 617), который в результате проведенной идентификации оказался вирусом, близкородственным вирусу Трибеч из сем. *Reoviridae* [16, 26].

В.И. Вотяков изучал вирусы не только в лабораторных условиях. Он нередко сам выезжал в экспедиции по сбору полевого и клинического материала для выделения возбудителей природноочаговых инфекций. Памятный след оставила одна из экспедиций в Арктику, проведенная группой сотрудников БелНИИЭМ и АН БССР в 1973 г. Экспедиция выполняла работу на птичьих базарах Мурманского побережья Баренцева моря (Подпахтинская губа). Трое из участников экспедиции, отлавливающих в узком ущелье чаек-маевок, заболели одновременно инфекцией неясной этиологии (клиника: лихорадка, респираторный синдром). Изучение этих случаев показало наличие в сыворотках переболевших антител к вирусу Тюлений, выделенному от клещей *Ceratixodes putus*, собранных на островах Баренцева моря [27]. В этой экспедиции впервые было получено подтверждение этиологической значимости вируса Тюлений (арбовирус из сем. *Flaviviridae*) в инфекционной заболеваемости человека с механизмом трансмиссии через укус клещей и очень вероятно (как это следует из полученных материалов) с механизмом воздушно-капельного пути инфицирования (В.И. Вотяков, Т.И. Самойлова) [28].

С 1985 г. начался новый этап в изучении арбовирусных инфекций в нашей стране, что было связано с созданием Центра по экологии возбудителей инфекционных заболеваний (Москва), а в каждой республике бывшего СССР были созданы лаборатории данного Центра по изучению эпидемиологии и диагностики арбовирусных инфекций. Для организации системы экологического надзора за циркуляцией возбудителей инфекционных заболеваний на территории республики и во исполнение приказа МЗ СССР от 3 сентября 1984 г. № 1019 на базе БелНИИЭМ при отделе особо опасных вирусных инфекций 17 октября 1984 г. была создана лаборатория опорной базы экологического центра по изучению арбовирусных инфекций. Методическое руководство осуществлялось Центром по экологии возбудителей инфекционных заболеваний (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва) под руководством академиков Д.К. Львова и В.И. Вотякова. В задачи лаборатории входило: выявление и изучение природных очагов арбовирусных инфекций на территории республики, выделение и идентификация новых арбовирусов, осуществление контроля по заносу арбовирусов с других территорий, изучение закономерностей развития эпидпроцесса при различных арбовирусных инфекциях, расследование и изучение вспышек инфекционных заболеваний неясной этиологии. Под руководством академика В.И. Вотякова были запланированы и выполнены широкомасштабные работы по выявлению и изучению новых арбовирусов. Нами были впервые получены доказательства циркуляции ранее неизвестных в Беларуси арбовирусов, изучена структура природных вирусных популяций с учетом влияния на них антропогенных факторов. В результате комплексных вирусологических, серологических, эпидемиологических и зоолого-паразитологических исследований кровососущих членистоногих, диких и домашних животных, пациентов установлена циркуляция 13 арбовирусов из 5 семейств (*Flaviviridae* — КЭ и ЗН; *Togaviridae* — Семлики и Синдбис; *Bunyaviridae* — Укуниеми, Батаи, Тягиня, Инко и Зайца-беляка; *Reoviridae* — Трибеч, Блютанг и Киндиа; *Rhabdoviridae* — Моссурил). Почти половина всех выделенных и идентифицированных штаммов арбовирусов (49,5%) изолировано от иксодовых клещей, 31,8% — от мелких диких млекопитающих, 6,6% — от кровососущих комаров, 5,5% — от птиц и 6,6% — из крови и ликвора паци-

ентов. Полученные новые данные позволили научно обосновать гипотезу: «О закономерной циркуляции арбовирусов как с клещевой, так и с комариной трансмиссией, широко распространенных на территории Республики Беларусь, которая входит в ландшафтно-климатическую зону, расположенную между 48^0 и 56^0 северной широты» [16].

Было показано, что в природных очагах Беларуси популяция вируса КЭ находится в различных биологических системах, которые по-разному влияют на патогенность штаммов вируса КЭ. Впервые получены данные о структуре природной вирусной популяции КЭ на территории республики [16, 29]. Установлено, что популяция вируса КЭ находится в клещах *I. ricinus* и *D. pictus*, мелких диких млекопитающих, птицах, комарах и людях. В циркуляции вируса КЭ принимают участие также крупные дикие и домашние животные. Система выпаса крупного рогатого скота (КРС) на пастбищах сеяных трав, по-видимому, привела к формированию устойчивых очагов *D. pictus*, активно участвующих в циркуляции вируса КЭ всеми своими фазами развития (имаго, личинки, нимфы). Если раньше вирус КЭ выделялся в основном от клещей *I. ricinus* (составлявших 98% в сборах), то в настоящее время популяция вируса КЭ находится как в клещах *I. ricinus* (31,25% от количества выделенных штаммов), так и в *D. pictus* (15,4%). Показано участие различных видов членистоногих в циркуляции вируса КЭ в очагах и особенно двух массовых видов иксодовых клещей *I. ricinus* и *D. pictus*. Находясь на культурных пастбищах и постоянно нападая на КРС, который систематически выпасается на них, а значит иммунный к клещам и вирусу, этот вид клеща, возможно, играет роль в ослаблении вируса КЭ при его циркуляции. Наши представления о популяции вируса КЭ показывают, что она может располагаться в популяциях различных видов иксодовых клещей и других членистоногих, например, в комарах и мошках. Если ранее основной зоной и зоной потенциальной опасности в пределах очага считали границы лесного массива, то в настоящее время кроме стаций леса и лесных пастбищ вирус постоянно присутствует в сельскохозяйственных угодьях, а также в пределах сельских населенных пунктов, с чем связаны случаи «безлесного» заражения. Эколого-эпидемиологический мониторинг КЭ в республике, проводимый в течение 40 лет, позволил выделить три основных периода изменения напряженности природных очагов и заболеваемости. Установлено, что в 50–60-е гг. отмечалась высокая заболеваемость населения преимущественно с алиментарным путем заражения. Напряженные очаги были зарегистрированы в основном в Центральной части республики. Период снижения активности природных очагов — 70–80-е гг. (отмечены отдельные вспышки КЭ). Период реактивизации природных очагов КЭ — 90-е гг., сопровождающийся ростом заболеваемости людей в основном с трансмиссивным инфицированием, подъемом численности и вирусофорности клещей, расширением ареала природных очагов на юго-западную и южную части Беларуси [30].

В процессе выделения вируса КЭ из различных источников была обнаружена неоднородность штаммов по патогенности. Из 208 изолированных штаммов вируса КЭ 177 оказались среднепатогенными, 9 — высокопатогенными и 22 — слабопатогенными, что получило отражение в разнообразии клинической картины КЭ в Беларуси. Основу природной вирусной популяции составляют среднепатогенные штаммы, которые входят в состав всех биологических систем [29]. Кроме выявления неоднородности штаммов вируса КЭ по патогенности нами под руководством академика В.И. Вотякова совместно с сотрудниками Иркутского НИИ эпидемиологии и микробиологии Российской Федерации проведено генотипирование 10 штаммов вируса КЭ, изолированных в Беларуси. Установлено, что 1 штамм вируса КЭ (118-КЭ), выделенный от птиц в Мядельском районе на границе с Литвой, оказался штаммом вируса восточного КЭ. Возможно это случайный занос вируса КЭ птицами с сопредельных стран, где циркулируют различные генотипы вирусов, а остальные штаммы оказались вирусом западного генотипа. В дальнейшем генотипирование штаммов вируса КЭ, выделенных в Беларуси, проводилось на базе отдела экологии и эпидемиологии природно-очаговых и неуправляемых антропонозных вирусных инфекций под руководством доктора медицинских наук, профессора Т.В. Амвросьевой. Была установлена циркуляция штаммов западного генотипа вируса КЭ и показано наличие филогенетических связей белорусских штаммов со штаммами, циркулирующими на сопредельных территориях (Литва, Латвия, Россия) [31].

Существенным достижением явилось выделение впервые в республике вируса Западного Нила (ЗН). Штамм (48-ЗН-Тремля) был выделен от птиц на весеннем пролете в Гомельской области и оказался близкородственным африканскому варианту. В дальнейших исследованиях была уста-

новлена экологическая связь штамма с комарами *Aedes, Anopheles, Culex*, птицами и мошками. В некоторых случаях популяция вируса может быть связана с клещами *I. ricinus,* которые играют роль временных потенциальных хозяев вируса. Выделение вируса ЗН от птиц, комаров, мошек, обнаружение антигенов, а также выявление пациентов с ЗН инфекцией указывает на вероятность возникновения эпидемической заболеваемости в республике. На основании полученных результатов полевых и экспериментальных исследований предложена схема циркуляции вируса ЗН и его сохранения в природных очагах. Циркуляция вируса в очагах обеспечивается высокочувствительными к вирусу комарами лесных и синантропных родов *Aedes, Anopheles* и высокочувствительными птицами. Клещи, мелкие млекопитающие, крупный рогатый скот принимают участие в сохранении вируса в персистирующей форме. В дальнейшем при появлении условий для пассирования таких форм через чувствительных членистоногих и птиц могут включаться клещи, мелкие млекопитающие и КРС [16].

Проведенные нами вирусологические и серологические исследования показали, что одним из путей формирования очагов и интродукции некоторых арбовирусов в местные биоценозы является их занос перелетными птицами. Установлено, что природные вирусные популяции не существуют изолированно, а постоянно перемещаются, причем не только в пределах одной территории. Примером пространственно разобщенных природных популяций может служить вирус ЗН. Штаммы вируса ЗН, выделенные в Беларуси, по антигенным свойствам близкородственны африканским (штамм Eg-101). Доказательством перемещения популяций арбовирусов служит выявление на территории РБ циркуляции «типичных» африканских вирусов — Синдбис, Киндиа, Блютанг и Моссурил.

Выявлены и охарактеризованы также новые для Республики Беларусь арбовирусы:

- Батаи из сем. *Bunyaviridae*, выделенный из кровососущих комаров рр. *Anopheles* и *Aedes*. Экспериментально доказана способность комаров *р. Aedes* инфицироваться вирусом Батаи при кормлении на зараженных белых мышах и передавать вирус через укус неинфицированным животным. Серологическими методами доказана циркуляция вирусов серогруппы калифорнийского энцефалита (Тягиня, Инко и Зайца-беляка). Антигены вирусов выявлялись в комарах рр. *Aedes, Anopheles, Culex* [16];

- Семлики из сем. *Togaviridae,* экологически связанного с мелкими дикими млекопитающими, а также птицами на территории Гомельской области. Распространение вируса обнаружено на территории Гомельской, Брестской и Минской областей серологическими методами. Доказана циркуляция вируса Синдбис путем выявления антител в сыворотках крови птиц, КРС, мышевидных грызунов и людей [16].

- Трибеч из сем. *Reoviridae*, выделенного из иксодовых клещей двух видов — *I. ricinus* и *D. pictus.* Впервые выявлена зараженность клещей *D. pictus* этим вирусом. Выделение вируса отмечено лишь в Гомельской и Брестской областях. Антитела обнаруживались у КРС и птиц на территории Витебской и Минской, а у людей — на всей территории республики [16].

Важным разделом работы при изучении вновь выделенных арбовирусов и их идентификации являлось приготовление диагностических препаратов — иммунных асцитических жидкостей (ИАЖ) к различным арбовирусам. Были разработаны и приготовлены высокотитражные моно- и полиспецифические ИАЖ к выделенным и эталонным штаммам арбовирусов, которые используются в лабораторной диагностике, что подтверждено 29 актами внедрения из России, Украины и Гвинейской Республики, созданы коллекция вирусов и банк ИАЖ [32].

В заключение следует выделить основные научные достижения академика В.И. Вотякова в становлении и решении проблемы арбовирусных инфекций в Республики Беларусь:

1. Доказательство существования самостоятельной нозологической формы западного КЭ.

2. Впервые в республике было проведено генотипирование штаммов вирусов КЭ и показана его циркуляция в природных очагах Беларуси.

3. Выявлены и изучены другие, ранее не известные для страны, новые арбовирусы;

4. Научно обоснована и разработана гипотеза о закономерной циркуляции арбовирусов как с клещевой, так и с комариной трансмиссией;

5. Созданы коллекция и банк иммунных асцитических жидкостей к арбовирусам для их индикации и идентификации.

Вениамин Иосифович Вотяков почти до последнего дня, несмотря на тяжелую болезнь, работал с максимальной самоотдачей и постоянно интересовался современным состоянием исследовательской работы в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии по проблеме арбовирусных инфекций, щедро делился своим богатым опытом и глубокими знаниями.

Светлая память о выдающемся ученом, вирусологе, эпидемиологе, учителе навсегда сохранится в сердцах его коллег и многочисленных учеников.

Литература

1. Вотяков, В.И. О типах природных очагов клещевого энцефалита в Белоруссии / В.И. Вотяков // Здравоохранение Белоруссии. — 1959. — № 6. — С. 3–6.

2. Вотяков, В.И. К вопросу классификации зональных, провинциальных и ландшафтных очагов клещевого энцефалита / В.И. Вотяков // Клещевой энцефалит, кемеровская клещевая лихорадка, геморрагические лихорадки и другие арбовирусные инфекции: материалы XI науч. сессии Ин-та полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. — М., 1964. — С. 218-221.

3. Вотяков, В.И. К вопросу о различиях вирусов клещевого энцефалита Запада и Востока / В.И. Вотяков, В.С. Казунина, Е.Д. Егорова // Клещевой энцефалит. — Минск, 1965. — С. 67–74.

4. Вотяков, В.И. Клинические формы клещевого энцефалита в Белоруссии / В.И. Вотяков, И.И. Протас // Журн. невропатологии и психиатрии им. Корсакова. — 1965. — Вып. 3. — С. 361–366.

5. Вотяков, В.И. Материалы клинико-эпидемиологического изучения клещевого энцефалита в Белоруссии в 1952–1961 гг. / В.И. Вотяков, И.И. Протас // Клещевой энцефалит. — Минск, 1965. — С. 358–370.

6. Вотяков, В.И. Западный клещевой энцефалит / В.И. Вотяков, И.И. Протас, В.М. Жданов. — Минск: Беларусь, 1978. — 256 с.

7. Изучение ультравирусных энцефалитов. Сообщение II. Географическое распространение и некоторые особенности эпидемиологии клещевого энцефалита человека в Европейской части СССР, Сибири и Казахстана / М.Н. Чумаков [и др.] // Невропатология и психиатрия. — 1944. — Т. 13, № 2. — С. 20.

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

9. Савицкий, Б.П. Эколого-фаунистические исследования над кровососущими членистоногими в очагах клещевого энцефалита в Белоруссии и вопросы оздоровления очагов: автореф. дис. … канд. биол. наук / Б.П. Савицкий; Бел. гос. ун-т. — Минск, 1963. — 19 с.

10. Савицкий, Б.П. Очаги клещевого энцефалита на западе и востоке ареала вируса и их эволюция под воздействием антропогенных факторов (Белоруссия, Хабаровский край, Сахалин, Камчатка): автореф. дис. … д-ра биол. наук / Б.П. Савицкий; Ин-т вирусологии им. Д.И. Ивановского; АМН СССР. — М., 1972. — 36 с.

11. Мишаева, Н.П. Характеристика Светлогорско-Речицкого очага клещевого энцефалита в БССР: автореф. дис. … канд. биол. наук / Н.П. Мишаева; БелНИИЭМ. — Минск, 1968. — 21 с.

12. Борткевич, В.С. Изучение роли домашних животных в циркуляции вируса клещевого энцефалита в антропургическом очаге: автореф. дис. … канд. мед. наук / В.С. Борткевич; Минск. мед. ин-т; М-во здравоохр. БССР. — Минск, 1970. — 24 с.

13. Протас, И.И. Клиничекая характеристика клещевого энцефалита в Белоруссии (клинико-эпидемиологические наблюдения и исследования 1954–1959 гг.): автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.00.13 / И.И. Протас; Ин-т эксперимент. и клинич. медицины; АН ЛатвССР. — Рига, 1962. — 17 с.

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

15. Самойлова, Т.И. Вирус Укуниеми в Белоруссии: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.06 / Т.И. Самойлова; Ин-т вирусологии им. Д.И. Ивановского; АМН СССР. — М., 1976. — 16 с.

16. 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. — 41 с.

17. Вотяков, В.И. Клещевой энцефалит и борьба с ним в Белорусской ССР / В.И. Вотяков // Мед. паразитология и паразитар. болезни. — 1959. — Т. 28, № 3. — С. 301–304.

18. Вотяков, В.И. К вопросу выделения вируса клещевого энцефалита из клещей Ixodes ricinus L в Белоруссии / В.И. Вотяков, Е.И. Смирнова // Сб. науч. тр. / БелИЭМиГ. — Минск, 1961. — Т. 4. — С. 35–40.

19. Вотяков, В.И. Типы очагов и вопросы борьбы с клещевым энцефалитом в Белоруссии / В.И. Вотяков // Мед. паразитология и паразитар. болезни. — 1963. — Т. 32, № 2. — С. 205–207.

20. Гено- и фенотипическая гетерогенность вируса клещевого энцефалита и проблемы специфической профилактики / В.И. Вотяков [и др.] // Вакцины и иммунизация: материалы V Междунар. Форума по глобальной вакцинологии. — Минск, 2001. — С. 19.

21. Вотяков, В.И. Клещевые энцефалиты Евразии (вопросы экологии, молекулярной эпидемиологии, нозологии, эволюции) / В.И. Вотяков, В.И. Злобин, Н.П. Мишаева. — Новосибирск: Наука, 2002. — 438 с.

22. Выделение вирусов группы Сумах-Укуниеми от членистоногих и птиц в Черновицкой области / И.А. Виноград [и др.] // Вопр. мед. вирусологии: тез. докл. / АМН СССР; Ин-т вирусологии им. Д.И. Ивановского. — М., 1971. — Ч. 2. — С. 116–117.

23. Мотеюнас, Л.И. Иммунологическая структура населения Литовской ССР к вирусу Укуниеми / Л.И. Мотеюнас, П.С. Карасева, В.В. Варгина // Материалы 17-й сес. Ин-та полиомиелита и вирусных энцефалитов: тез. докл. — М., 1972. — С. 302–303.

24. Przesmycki, F. Arboviruses in Poland / F. Przesmycki // Arch. roumain. pathcl. exp. et microbiol. — 1963. — Vol. 22, № 3. — P. 497.

25. Обнаружение вуруса Укуниеми в Белоруссии / Т.И. Самойлова [и др.] // Вопр. вирусологии. — 1973. — № 1. — С. 111–112.

26. Выделение вируса Трибеч в Белоруссии / Н.Н. Ломоносов [и др.] // Вопр. вирусологии. — 1982. — № 3. — С. 113–117.

27. Выделение арбовирусов от колониальных птиц Баренцева моря / В.И. Вотяков [и др.] // Экология вирусов, связанных с птицами: материалы респ. симпоз. — Минск, 1974. — С. 42–44.

28. К вопросу о роли вируса Тюлений в патологии человека / В.И. Вотяков [и др.] // Экология вирусов, связанных с птицами: материалы респ. симпоз. — Минск, 1974. — С. 51–52.

29. Самойлова, Т.И. Природные популяции вируса клещевого энцефалита в Беларуси / Т.И. Самойлова, В.И. Вотяков, Л.П. Титов // Инфекция и иммунитет: материалы респ. науч.-практ. конф. / БелНИИЭМ. — Минск: Хата, 1999. — С. 400–414.

30. Самойлова, Т.И. Флюктуация природных очагов клещевого энцефалита в Республике Беларусь / Т.И. Самойлова, Н.П. Мишаева // 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. 84.

31. Проблема клещевого энцефалита в Республике Беларусь и его генодиагностика / Т.И. Самойлова, В.И. Вотяков, Т.В. Амвросьева, А.А. Михайлова, Н.В. Поклонская, А.А. Безручко // Молекулярная диагностика инфекционных болезней: материалы междунар. науч.-практ. конф. — Минск, 2007. — С. 191–192.

32. Создание банка моно- и поливалентных иммунных асцитических жидкостей к арбовирусам для их индикации и идентификации / Т.И. Самойлова [и др.] // Инфекция и иммунитет: материалы, приуроч. к 5-му Междунар. форуму по глобальной вакцинологии «Вакцины и иммунизация». — Минск: НЕССИ, 2001. — С. 82–90.

SCIENTIFIC CONTRIBUTION OF ACADEMICIAN V.I. VOTYAKOV IN FORMATION AND SOLUTION OF ARBOVIRUS INFECTIONS IN BELARUS

Samoilova T.I.

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

The paper is devoted to the memory of Academician V.I. Votyakov (1921–2014), who headed the Belarusian Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Byelorussian SSR, in 1950–1986. The creative biography of Academician, his participation in World War II is summarized. After the war he became an active organizer of efforts to combat epidemics. Under his leadership strategy, tactics and implementation of programs for the eradication of mass epidemic diseases in the country were developed. One of the most important arboviral infections in Belarus, which is comprehensively studied V.I. Votyakov, was tick-borne encephalitis (TBE), the study of the epidemiology, prevention and treatment of which began in Belarus in 1952 due to a sharp increase in the incidence. One of the key issues in understanding of the TBE problem was a question of the existence of species and the differences in the Western and Far Eastern TBE viruses. Since 1985 in the territory of Belarus as a result of complex virological, serological, epidemiological, zoological and parasitological studies of blood-sucking arthropods, wild and domestic animals, and patients circulation of 13 other arboviruses from 5 families was revealed. V.I. Votyakov is the founder of the scientific school of virologists in Belarus and brought up a large pleiad of disciples.

Keywords: Academician V. I. Votyakov, arboviruses, tick-borne encephalitis, epidemiology, Belarus.

Поступила 30.07.2014

АЛГОРИТМ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСОГО КОНТРОЛЯ ОБЪЕКТОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ ЧЕЛОВЕКА

Амвросьева Т.В.[1], Казинец О.Н.[1], Поклонская Н.В.[1], Барановская Н.Н.[1], Поликарпов А.П.[2]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;

[2]Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Реферат. В статье описываются методы и алгоритм санитарно-вирусологического контроля объектов среды обитания человека (ОСОЧ), основанный на использовании эффективных технологий сорбции вирусов-контаминантов с помощью отечественного волокнистого материала марки Фибан с последующим их концентрированием и индикацией методом ПЦР. Она содержит также результаты апробации предлагаемых технологий в условиях эксперимента и инфекционного стационара.

Ключевые слова: контаминация вирусами объектов среды обитания человека, метод сорбции-элюции, сорбирующий материал Фибан, алгоритм санитарно-вирусологического контроля

Введение. Защита населения от заражения вирусными инфекциями, связанными с действием внешнесредовых факторов, является важнейшей задачей современной профилактической медицины, направленной на обеспечение здоровьесбережения населения. Для данных вирусных инфекций характерен контактно-бытовой путь передачи возбудителей, реализуемый через зараженные предметы и объекты среды обитания человека. Среди наиболее социально значимых возбудителей инфекционных заболеваний, передающихся таким образом, выделяются многочисленные по своему составу кишечные вирусные патогены — норо- (НоВ), рота- (РВ), энтеро- (ЭВ), аденовирусы (АдВ) и др. [1–3]. Они широко распространены в окружающей среде и характеризуются большой устойчивостью и стабильностью в ней [4, 5]. Санитарно-вирусологический контроль ОСОЧ с целью установления факторов передачи вирусных инфекций для пресечения контактно-бытового пути их трансмиссии является важной превентивной мерой, способствующей успешному управлению качеством и безопасностью окружающей среды. Успех данного контроля во многом зависит от эффективности осуществления первых его этапов, связанных с отбором проб и их концентрированием [6, 7], которые требуют применения специальных технологий и эффективных сорбирующих материалов. К сожалению, до начала настоящих исследований научные разработки на эту тему в нашей стране не проводились, и, как следствие, стандартизованный алгоритм действий при осуществлении санитарно-вирусологических исследований ОСОЧ, основанный на применении современных технологий пробоподготовки и молекулярной эпидемиологии, отсутствовал. Центрами гигиены и эпидемиологии осуществлялись исследования только в отношении ЭВ и РВ. Они велись устаревшими и неэффективными методами, не позволяющими получать достоверную информацию о вирусном загрязнении ОСОЧ и их роли в развитии эпидемических процессов.

Цель работы — разработка современного алгоритма санитарно-вирусологического контроля ОСОЧ на основе использования высокоэффективных технологий и средств сорбции-элюции-концентрирования вирусов-контаминантов и применения молекулярно-эпидемиологических методов их исследований с последующей апробацией в экспериментальных и клинических условиях.

Материалы и методы. При моделирования вирусной контаминации ОСОЧ в эксперименте использовали твердые (деревянную, резиновую) и мягкие (искусственный мех, хлопчатобумажную ткань, губку) поверхности, на которые наносили энтеровирус Коксаки В3 (№ В433) с титром 10^7 $ТЦД_{50}$/мл, взятый из коллекции вирусов лаборатории инфекций с природным резервуаром. При отборе проб применяли вирусосорбирующий волокнистый материал марки ФИБАН А6 (пр-во ИФОХ НАНБ). Концентрирование вирусов в отобранных пробах осуществляли по методу сорбции-элюции в малом объеме [8]. Индикацию модельного вируса проводили путем его выделения в культуре клеток BGM (пр-во РНПЦЭМ) и/или методом ОТ-ПЦР. Выделение энтеровирусной РНК в сконцентрированных образцах осуществляли с помощью набора «Рибопреп», постановку реакции обратной транскрипции — с набором «РЕВЕРТА» (пр-во «Амплисенс», РФ). Амплификацию полученной в реакции обратной транскрипции кДНК проводили с помощью наборов реагентов «Амплисенс Enterovirus-FL» (пр-во «Амплисенс», РФ) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Апробацию отработанных методов и разработанного алгоритма санитарно-вирусологического контроля над ОСОЧ осуществляли в условиях стационара инфекционной больницы. Получено 35 образцов смывов с различных предметов и объектов госпитальной среды, находящихся в палатах и туалетных комнатах. После соответствующей пробоподготовки они исследованы на наличие генетического материала РВ, НоВ, АдВ, ЭВ с помощью набора реагентов «ОКИ-скрин» и «Амплисенс Enterovirus-FL» (пр-во «Амплисенс», РФ) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Результаты и их обсуждение. Исходя из своего качества, исследуемые ОСОЧ были разделены на 2 группы — с твердой и мягкой (пористой) поверхностью. Для ОСОЧ, имеющих твердую поверхность (например, оборудование, мебель, стены, посуда и т. д.), применяли технологию отбора проб путем получения смывов. Для мягких, пористых и поглощающих биологический вирусосодержащий материал ОСОЧ (например, постельные принадлежности, одежда, мягкие игрушки, обивка мебели и др.) использовали технологию получения экстрактов. Для каждой из групп разработаны специальные схемы отбора проб, в которых учитывались качество и структура их материалов. Схема для твердых ОСОЧ включала механическую обработку (протирание) поверхности влажным сорбирующим тампоном, экстракцию, получение смыва и его концентрирование, для мягких ОСОЧ — получение экстракта, сорбция вирусов-контаминантов на специальном сорбирующем материале, их элюция и концентрирование. В соответствии с вышеуказанными схемами в основу получения вирусосодержащих проб в сконцентрированном виде положен метод сорбции/элюции с использованием высокоэффективного в отношении кишечных вирусов сорбирующего материала марки Фибан А6, который относится к группе анионитов и проявляет свои вирусосорбирующие характеристики благодаря наличию слабоосновных свойств. Сорбирующие свойства этого материала в отношении кишечных вирусов были нами изучены ранее при разработке санитарно-вирусологических наборов реагентов, предназначенных для контроля качества пищевых продуктов, питьевых и поверхностных вод по вирусологическим показателям [8, 9].

Процедура получения смывов с твердых поверхностей заключалась в сорбции вируса на влажном тампоне из Фибана, смоченным в 0,01н фосфатно-солевом буферном растворе (pH 7,2). Отработанными оптимальными условиями получения смывов и дальнейшей их пробоподготовки были следующие: масса Фибана А6 2 г, использование в качестве элюирующего буферного раствора 3% бифэкстракта с pH 9,6, длительность элюции 30 мин.

В данных условиях эксперимента уровень обнаружения в смывах модельного вируса, нанесенного на твердые поверхности в разных дозах (1–3 lg ТЦД$_{50}$/мл), зависел от формы сорбирующего материала (рисунок 1). При использовании его волокнистой формы уровень выявления энтеровирусной РНК в полученных после обработки пробах составлял 100%. Применение сорбента в прессованной форме было менее эффективным, и 100% регистрация вируса отмечалась только при использовании его в дозе 3 lg ТЦД$_{50}$/мл.

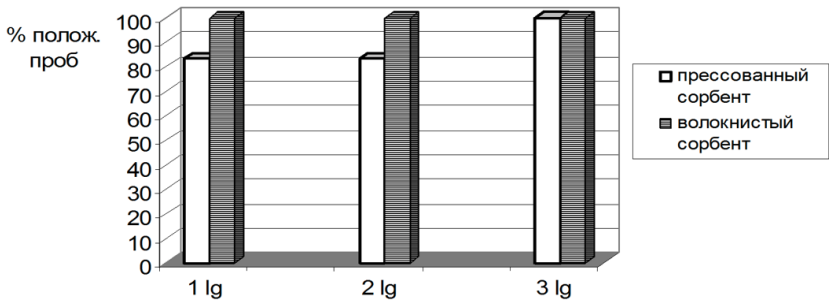


Рисунок 1 — Уровень выявление положительных проб на наличие энтеровирусной РНК при контаминации твердых поверхностей (деревянной, резиновой) вирусом Коксаки В3 в дозах 1–3 lg ТЦД$_{50}$/мл с использованием влажного сорбента в волокнистой и прессованной форме, %

При моделировании искусственной контаминации мягких ОСОЧ использовали хлопчатобумажную ткань, искусственный мех, губку. Исследуемый материал смачивали физиологическим раствором, содержащим вирус Коксаки В3 в концентрации 1–3 lg ТЦД$_{50}$/мл в объеме 5 мл. Для получения экстракта контаминированное вирусом полотно помещали в стакан с 200 мл фосфатно-солевого буферного раствора (pH 7,4) и выдерживали 30 мин. Концентрирование полученного экстракта осуществляли с помощью волокнистого сорбента суспензионным способом методом сорбции-элюции вирусов. Исследуемый предмет удаляли из стакана, а полученный экстракт подвергали концентрированию. Для этого в стакан с жидкостью добавляли 2 г Фибана и оставляли на 30 мин, периодически помешивая стеклянной палочкой. Далее сорбент переносили в чистый флакон и добавляли 5 мл 3% бифэкстракта, выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Полученные элюаты подвергали дополнительному концентрированию с помощью ПЭГ по общепринятой методике и в последующем исследовали их методом ОТ-ПЦР (рисунок 2) или путем выделения ЭВ на культуре клеток.

В указанных условиях искусственной контаминации мягких материалов уровень обнаружения вируса-контаминанта составил 66,7–100,0%. Полученные методом ОТ-ПЦР результаты были сопоставимы с таковыми при выделении инфекционного вируса в культуре клеток.

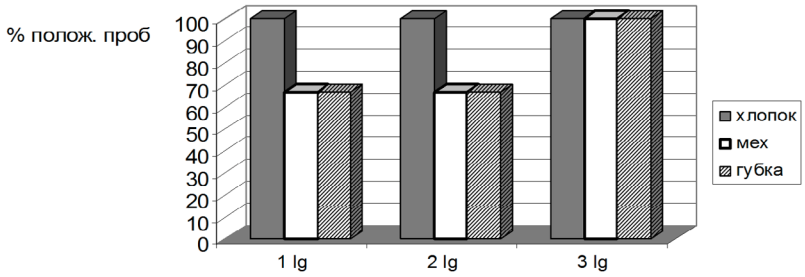


Рисунок 2 — Уровень выявления положительных проб на наличие энтеровирусной РНК при контаминации поверхностей хлопка, искусственного меха и губки вирусом Коксаки В3 в дозах 1–3 lg ТЦД$_{50}$/мл, %

На основе экспериментальных исследований разработан алгоритм осуществления санитарно-вирусологического контроля ОСОЧ, который включает следующие этапы: отбор и концентрирование проб (получение сконцентрированных смывов или экстрактов), обнаружение в них вирусов-контаминантов (методом ПЦР или выделением на культуре клеток), их типирование (серо- и/или генотипирование), биоинформационный анализ идентифицированных вирусных агентов (рисунок 3).

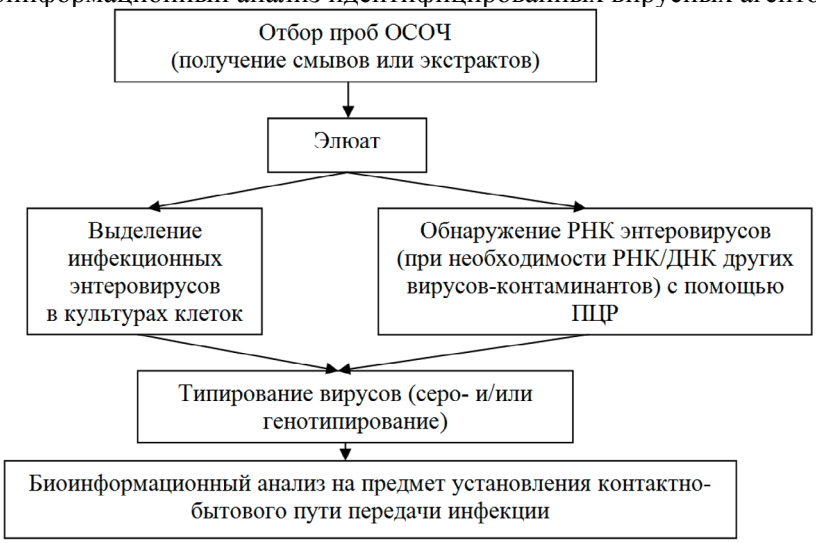


Рисунок 3 — Алгоритм санитарно-вирусологического контроля ОСОЧ

Последний этап данного алгоритма направлен на установление причинно-следственной связи между вирусной контаминацией ОСОЧ и развитием инфекции у пациента. Конечным результатом его осуществления является получение доказательства в пользу контактно-бытового пути передачи инфекции. Для этого проводится параллельное секвенирование определенных участков генома вируса-контаминта ОСОЧ и вируса, выделенного от пациента с вирусной инфекций, с последующим их сравнительным филогенетическим анализом. Тесное генетическое родство (идентичности) между клиническим и внешнесредовым изолятами свидетельствует о свершившемся факте заражения пациента конкретной инфекцией через контаминированный ее возбудителем ОСОЧ.

Разработанный алгоритм санитарно-вирусологического контроля твердых поверхностей ОСОЧ далее был апробирован в условиях инфекционного стационара, где пробы отбирались в палатах, предназначенных для пациентов с острыми кишечными инфекциями (ОКИ). По результатам исследований выявлено 25,71% положительных проб на наличие генетического материала кишечных вирусов. Из перечня детектируемых вирусов-контаминантов были обнаружены РВ, НоВ, АдВ, ЭВ (рисунок 4). Среди идентифицированных возбудителей ОКИ доминировали НоВ (11,43%), которые, как известно, имеют наибольшую эпидемическую значимость в данной группе инфекций [5, 6]. АдВ и ЭВ выявлялись в 5,71% проб, а число положительных проб в отношении РВ составило 2,86%. В пробе смыва с двери туалетной комнаты были обнаружены одновременно 3 возбудителя — РВ, НоВ, АдВ.

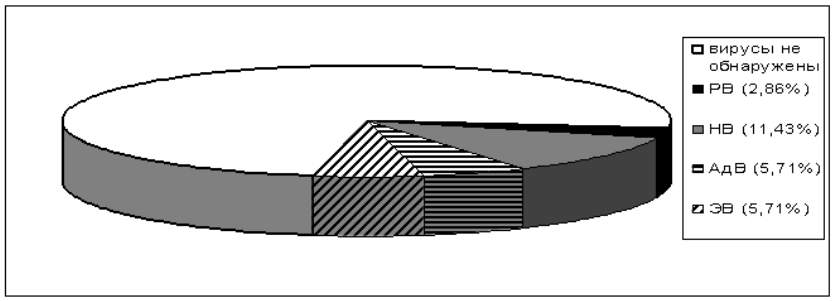


Рисунок 4 — Результаты выявления методом ПЦР генетического материала вирусов в смывах с ОСОЧ, %

Заключение. Полученные в условиях инфекционного стационара данные свидетельствуют о реально существующих фактах загрязнения объектов госпитальной среды возбудителями вирусных ОКИ и указывают на имеющийся риск реализации контактно-бытового пути заражения пациентов и возникновения нозокомиальных вирусных инфекций. Внедрение в практику отечественной лабораторной службы разработанных методов и алгоритма санитарно-вирусологического контроля ОСОЧ позволит улучшить качество и безопасность среды обитания человека в отношении вирусных инфекций и тем самым будет способствовать снижению инфекционной заболеваемости в целом.

Литература

1. An outbreak of viral gastroenteritis following environmental contamination at a concert hall / M.R. Evans [et al.] // Epidemiol. Infect. — 2002. — Vol. 129. — P. 355–360.

2. Boone, S.A. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease / S.A. Boone, C.P. Gerba // Appl. Environ. Microbiol. — 2007. — Vol. 73. — P. 1687–1696.

3. Detection of viruses and body fluids which may contain viruses in the domestic environment / K. Bellamy [et al.] // Epidemiol. Infect. — 1998. — Vol. 121. — P. 673–680.

4. Abad, F.X. Survival of enteric viruses on environmental fomites / F.X. Abad, R.M. Pinto, A. Bosch // Appl. Environ. Microbiol. — 1994. — Vol. 60. — P. 3704–3710.

5. Application of a swab sampling method for the detection of norovirus and rotavirus on artificially contaminated food and environmental surfaces / K. Cherer [et al.] //Food Environ. Virol. — 2009. — Vol. 1. — P. 42–49.

6. Norovirus on swabs taken from hands illustrate route of transmission: a case study / I. Boxman [et al.] // J. Food Protect. — 2009. — Vol. 72. — P. 1753–1755.

7. Comparison of surface sampling methods for virus recovery from fomites / T.R. Julian [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2011. — Vol. 77, № 19. — P. 6918–6925.

8. Волокнистые ионообменные материалы — как эффективные адсорбенты для концентрирования присутствующих в воде вирусов / О.В. Дьяконова [и др.] // Мед. новости. — 2001. — № 11. — С. 76–77.

9. Проблема вирусологической безопасности пищевых продуктов и методы индикации их вирусного загрязнения / О.Н. Казинец [и др.] // Донозология и здоровый образ жизни. — 2012. — № 2. — С. 30–33.

10. Новые методические решения выявления вирусной контаминации объектов среды обитания человека / Т.В. Амвросьева, О.Н. Казинец // Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. / РНПЦ гигиены. — Минск, 2013. — Вып. 22: Экология человека и окружающей среды. — С. 3–6.

ALGORITHM FOR SANITARY AND VIROLOGICAL CONTROL OF HUMAN ENVIRONMENTS

Amvrosieva T.V.[1], Kazinetz O.N.[1], Poklonskaya N.V.[1], Baranovskaya N.N.[1], Polikarpov A.P.[2]

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

[2]Research Institute for Physical & Organic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

The study presents the results obtained on the development of methods and modern algorithm for sanitary and virological control of human environments. The developed methodology involves the using of adsorption-elution concentration method for viral agents in selected samples with sorbent material “Fiban”. Developed sampling methods have been tested in experimental conditions and in infectious hospital.

Keywords: viral contamination of the human environment, adsorption-elution method, fibrous material «Fiban», algorithm for sanitary and virological control of human environments.

Поступила 25.06.2014

ЭНТЕРОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: СТУКТУРА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ И ЕЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

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

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;

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

Реферат. Статья содержит данные официальной статистической отчетности о заболеваемости энтеровирусной инфекцией в Республике Беларусь в последние годы с ее анализом по административным областям, возрасту, клиническим формам в динамике развития регистрируемого эпидроцесса. Представлен спектр циркулирующих в человеческой популяции и окружающей среде неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ), а также результаты молекулярно-эпидемиологических исследований 5 эпидемически значимых для страны серотипов (ЕСНО 11, ЕСНО 30, ЕСНО 6, Коксаки В3, Коксаки А9). Полученные данные свидетельствуют о достаточно быстром и интенсивном распространении новых высоковирулентных геновариантов НПЭВ в рамках единого мирового эпидемического пространства и указывают на занос в нашу страну ряда эпидемически значимых возбудителей, впервые идентифицированных на территории Китая и/или сопредельных стран.

Ключевые слова: энтеровирусная инфекция, структура заболеваемости, энтеровирусы, молекулярная эпидемиология, генотипы.

Введение. Энтеровирусные инфекции (ЭВИ) относятся к числу инфекционных заболеваний, постоянно сохраняющих свою актуальность в связи с их высокой социальной и эпидемиологической значимостью. Она обусловлена вовлечением в эпидпроцесс преимущественно детей, полиморфизмом клинических проявлений, в т. ч. с тяжелыми неврологическими поражениями, отсутствием средств специфической профилактики, возникновением вспышечной заболеваемости, широким распространением и постоянной сменой доминирующих возбудителей.

Ежегодно в Республике Беларусь регистрируется в среднем от 0,6 до 2,0 тыс. случаев ЭВИ (рисунок 1).

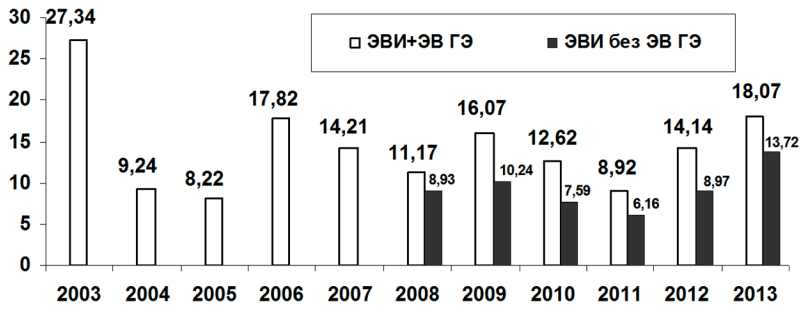


Рисунок 1 — Многолетняя заболеваемость ЭВИ (на 100 тыс. населения)

Чередование периодов подъемов и спадов составляет 3–4 года. Многолетний средний показатель заболеваемости (без ЭВ гастроэнтеритов) по республике достигает 8,90 на 100 тыс. населения, многолетний средний показатель энтеровирусных менингитов — 1,25 на 100 тыс.

Период 2010–2011 гг. по уровню ЭВИ был эпидемически благополучным. С 2012 г. наметилась тенденция к увеличению заболеваемости, а в 2013 г. интенсивность эпидемического процесса значительно возросла (в 1,3 раза). Всего в 2013 г. различными клиническими формами заболело 1710 человек (в 2012 г. — 1343 человека, показатель заболеваемости составил 18,07 на 100 тыс.). Прошедший 2013 г. был вторым годом циклического подъема, который характеризовался ростом заболеваемости ЭВ менингитами в 2,5 раза (с 1,46 до 3,54), ЭВ фарингитами — на 40% (с 5,03 до 7,02 на 100 тыс.), прочими «малыми форма» ЭВИ — на 32% (с 2,29 до 3,04 на 100 тыс.).

В возрастной структуре ЭВИ во все годы наблюдения преобладали дети до 17 лет (около 90% заболевших). В структуре детских возрастных групп дети до 1 года составили 17,7%; 1–2 лет — 33,5%, 3–6 лет — 25,8%; 7–14 лет — 23,6%. В 2013 г. в группе детского населения показатель заболеваемости ЭВИ увеличился на 56,3% — с 42,91 до 67,01 на 100 тыс. детей до 17 лет (по сравнению с 2012 г.). Что касается клинических особенностей течения ЭВИ в этой группе, то заболеваемость легкими формами (фарингиты, гастроэнтериты, прочие ЭВИ) была выше у детей до 2 лет, неврологическими формами (менингиты, энцефалиты) и фарингитами — у детей 3–6 и 7–14 лет.

У взрослых в клинической структуре заболеваемости незначительно превалировали ЭВ гастроэнтериты. По сравнению с предыдущим годом в 2013 г. по ЭВИ суммарно рост заболеваемости детей до 17 лет отмечался на большинстве территорий республики, за исключением Брестской, Гродненской, Минской областей. Значительный рост показателей в разрезе клинических форм среди детей до 14 лет регистрировался: по ЭВ гастроэнтеритам — в Могилевской области (с 1,83 до 8,55 на 100 тыс. детей); по ЭВ менингитам — в Витебской (с 4,15 до 100,88 на 100 тыс.), Гомельской (с 22,41 до 35,15 на 100 тысяч детей) и Минской областях (0,45 до 2,71 на 100 тыс.); по ЭВ фарингитам — в г. Минске (с 18,52 до 29,25 на 100 тыс. детей); по прочим (малым) формам ЭВИ — в г. Минске (с 3,73 до 7,89 на 100 тыс.).

В структуре клинических форм ЭВИ в ретроспективе (рисунок 2) с 2009 г. доминировали ЭВ гастроэнтериты (24–53%) и ЭВ фарингиты (27–39%). Изменение клинической структуры в 2013 г. характеризовалось снижением удельного веса ЭВ гастроэнтеритов, возрастанием доли ЭВ менингитов на 9,5% (до 19,4%) и ЭВ фарингитов на 3,4% (до 38,8%).

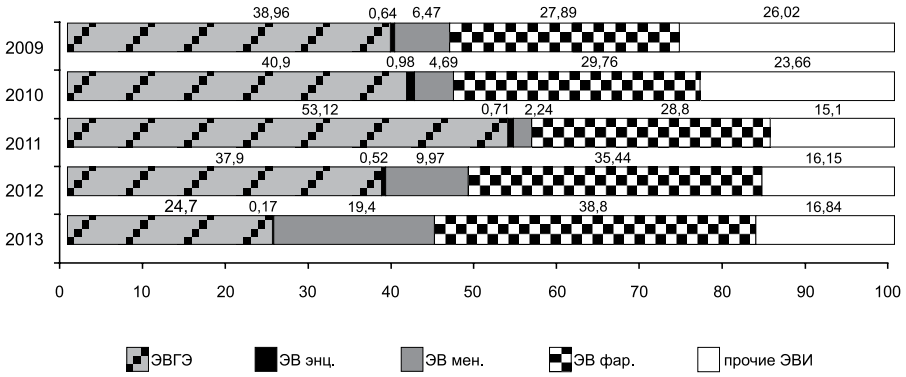


Рисунок 2 — Структура клинических форм ЭВИ в динамике за 2009–2013 гг., %

Заболеваемость ЭВИ традиционно характеризовалась летне-осенней сезонностью. С 2012 г. удельный вес заболеваний, обусловленных влиянием сезонных факторов, возрастал. В 2013 г. он составил 75,5% (при круглогодичном — 25,44%). Максимальные показатели регистрировались с августа по ноябрь (рисунок 3). В годы эпидемического благополучия удельный вес сезонной заболеваемости не превышал 40–50%.

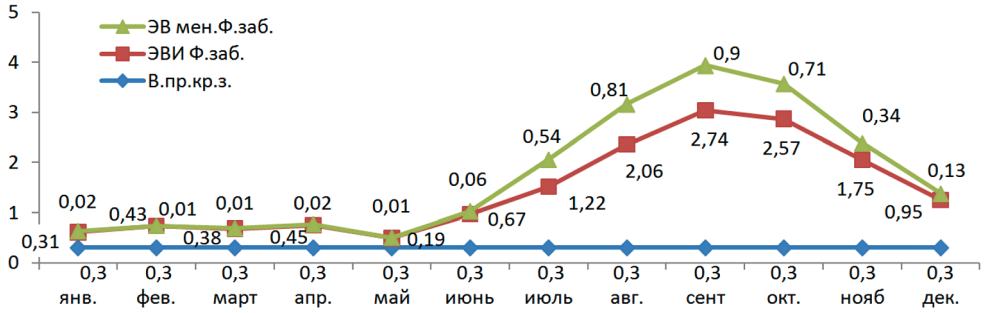


Рисунок 3 — Заболеваемость ЭВИ и ЭВ менингитами в РБ помесячно за 2013 г. на 100 тыс. населения

Показатели заболеваемости ЭВИ существенно различались в разрезе административных территорий республики (рисунок 4). Во все годы наблюдения наиболее высокий уровень регистрировался в г. Минске. В 2013 г. он был в 2,7 раза выше республиканского. Территориями со средним уровнем заболеваемости оказались Брестская, Витебская, Минская, Гомельская и Гродненская области, с низким уровнем — Могилевская область. Указанный рост ЭВИ в Витебской области произошел преимущественно за счет сезонного подъема заболеваемости ЭВ менингитами (с 0,75 до 15,49 на 100 тыс. населения), в г. Минске — ЭВ фарингитами (с 18,52 до 29,25 на 100 тыс.). В структуре клинических форм ЭВИ в разрезе административных территорий во все годы наблюдения также имелись значительные различия. В 2013 г. в структуре ЭВИ преобладали: ЭВ гастроэнтериты — в Брестской, Минской, Гродненской, Могилевской областях (71,2; 57,9; 58 и 55% соответственно); ЭВ менингиты — в Витебской и Гомельской областях (87 и 70%); ЭВ фарингиты — в г. Минске (74%); прочие (малые) формы ЭВИ — в г. Минске и Минской области (20 и 23%).

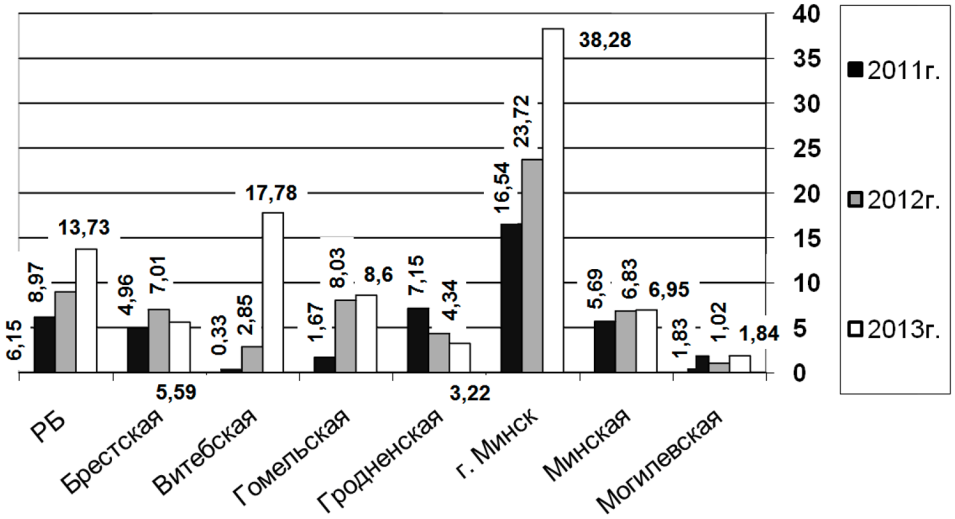


Рисунок 4 — Сравнительная заболеваемость ЭВИ в разрезе территорий и РБ за 2011–2013 гг. (на 100 тыс. населения без учета ЭВ гастроэнтеритов)

Следует отметить, что особую обеспокоенность в изменении клинической структуры ЭВИ в последние годы вызывает рост заболеваемости ЭВ менингитом со средним ежегодным темпом 9,5% (рисунок 5). Что касается роста средне республиканской заболеваемости ЭВ менингитом в 2013 г., то он сформировался преимущественно за счет сезонного подъема в Витебской области в июле-

октябре. Так, показатель заболеваемости ЭВ менингитом в данном регионе, по сравнению с предыдущим годом, увеличился почти в 14 раз. Случаи заболеваний отмечались в основном г. Витебске, а также в городах Полоцк, Новополоцк, г.п. Шарковщина и других. Умеренный подъем ЭВ менингитов отмечался на территории Гомельской области. Вместе с тем в Могилевской области в течение 2012–2013 гг. ЭВ менингиты не зарегистрированы. Данные наблюдения показывают, что циклические подъемы ЭВ менингитов на административных территориях республики возникают не одновременно и могут иметь разбежку в 1–3 года, что влияет на периодичность циклов и удлиняет («растягивает») подъем заболеваемости по республике в целом.

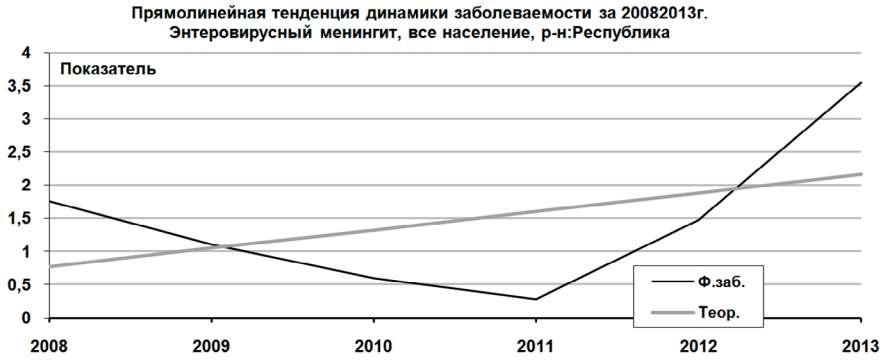


Рисунок 5 — Заболеваемость ЭВ менингитом в Республике Беларусь на 100 тыс. населения в 2008–2013 гг.

В возрастной структуре наиболее высокие уровни ЭВ менингитов регистрировались у детей 3–6 и 7–14 лет. В 2013 г. по сравнению с предыдущим годом заболеваемость увеличилась в разрезе всех детских групп, в т. ч. среди детей: 0–2 лет — с 1,83 до 2,97 на 100 тыс. (на 61%); 3–6 лет — с 11,62 до 20,86 на 100 тыс. (на 79%); 7–14 лет — с 5,20 до 22,08 на 100 тыс. (в 4,2 раза).

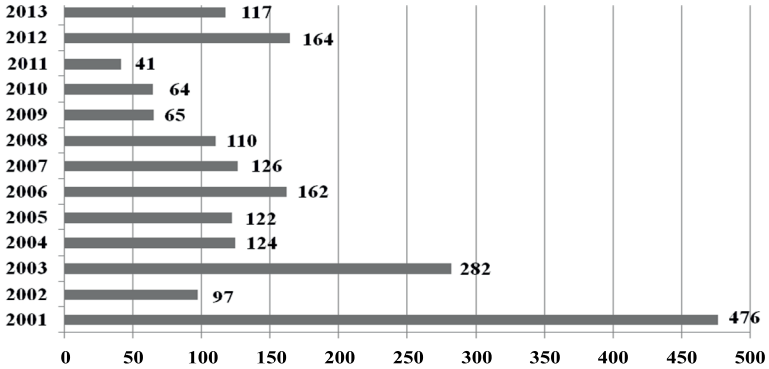


Рисунок 6 — Динамика выделения НПЭВ на территории Республики Беларусь (2001–2013 гг.)

Естественно, что это было особенно характерным для тех регионов страны, в которых отмечались более высокие показатели заболеваемости ЭВИ. В 2012 г. в число таких регионов вошли Брестская, Гомельская области и г. Минск, в 2013 г. — Витебская, Гомельская, Минская области, включая столичный регион (рисунок 7).

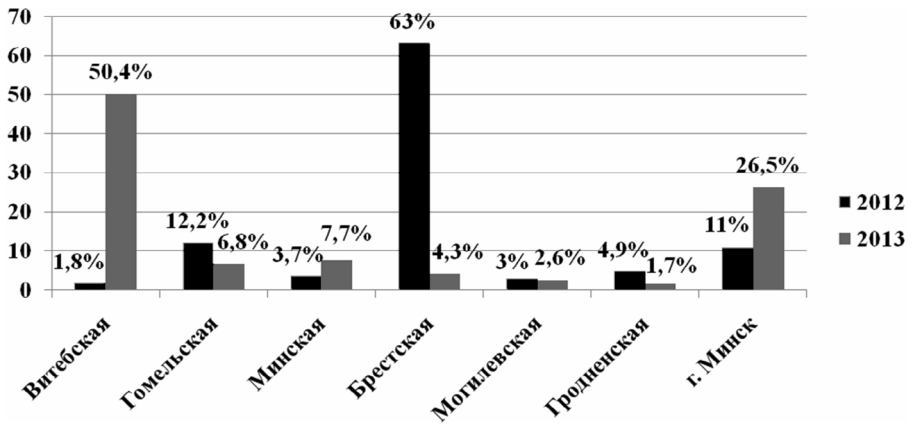


Рисунок 7 — Результаты выделения НПЭВ по регионам Республики Беларусь в 2012 и 2013 гг.

В этот же период, начиная с 2012 г., имело место расширение типового спектра возбудителей ЭВИ, которые были представлены ЕСНО 5, 6, 11, 19, 22, 24, 30; Coxsackie B 1, 3, 4, 5 (рисунок 8). В их структуре доминировали вирусы Coxsackie B — 79,6%, вирусы ЕСНО составили 8,4%, НПЭВ с неустановленным серотипом — 11,6%.

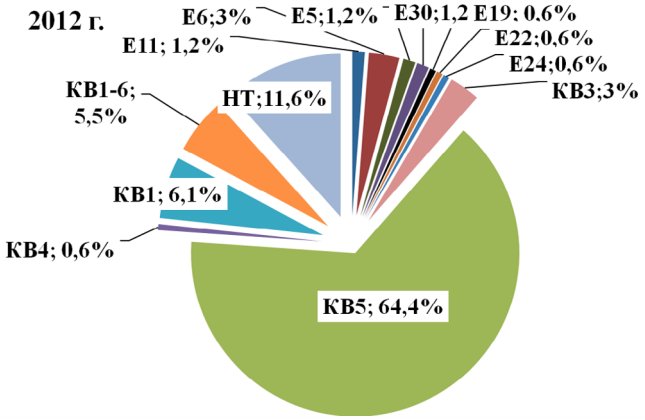


Рисунок 8 — Спектр и типовая структура НПЭВ, выделенных на территории Республики Беларусь в 2012 г.

Серотипы ЕСНО 19, 22, 24 выделялись только из проб водных объектов (г. Минск), вирусы Coxsackie B 4, ЕСНО 30 (Гомельская область) и ЕСНО 11 (Минская область) — из клинического материала. Серотипы ЕСНО 5, 6 и Coxsackie B 1, 3, 5 были изолированы как из проб сточных вод, так и из проб клинического материала. Отличительной особенностью циркуляции НПЭВ в 2012 г было появление высокопатогенного вируса ЕСНО 30 на территории Гомельской области (таблица 1).

В 2013 г. спектр циркулировавших НПЭВ также был достаточно разнообразным: ЕСНО 6, 9, 11, 16, 30, 33; Coxsackie B 3, 4, 5 и Coxsackie A 9 (рисунок 9). Отличительной особенностью было преобладание представителей серогруппы ЕСНО (73,9% от всех изолятов) с увеличением удельного вклада вирусов ЕСНО 11 (32,5%), ЕСНО 30 (23,9%) и ЕСНО 6 (7,7%). Циркуляция вируса ЕСНО 30 характеризовалась расширеннным распространениеи на территории Витебской, Гомельской, Минской областей и г. Минска (таблица 1).

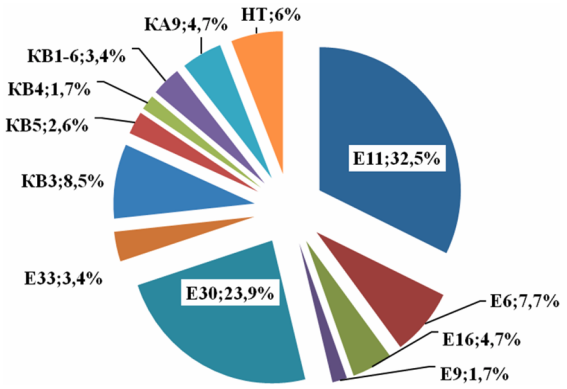


Рисунок 9 — Спектр и типовая структура ЭВ, выделенных на территории Республики Беларусь в 2013 г.

Циркуляция вируса ЕСНО 11, отмеченная в 2012 г. только на территории Минского региона, в 2013 г. продолжилась уже на территории 4 других областей страны: Витебской, Минской, Могилевской и г. Минска (таблица). Только в столичном регионе было зафиксировано появление вируса Coxsackie A 9, циркуляция которого в последний раз отмечалась в 2009 г. и только на территории Витебской области.

Для установления закономерностей, определивших зарегистрированные различия в структуре клинических форм и уровней заболеваемости по административным территориям нашей страны, был проведен молекулярно-эпидемиологический анализ НПЭВ, выделенных в 2012–2013 гг. и принадлежавших к наиболее эпидемически значимым серотипам — ЕСНО 11, ЕСНО 30, ЕСНО 6. Также были проанализированы редкие для республики серотипы Коксаки В3 (CVB3) и Коксаки А9 (CVA9). В анализе использовались нуклеотидные последовательности 41 изолята НПЭВ, выделенных в виде ЦПА или идентифицированных молекулярными методами в пробах клинического материала пациентов и в объектах окружающей среды.

Дендрограмма, построенная по результатам филогенетического анализа фрагмента нуклеотидной последовательности гена VP1 вирусов ЕСНО 11, ЕСНО 30, ЕСНО 6, Коксаки В3, представлена на рисунке 10. Все идентифицированные в 2012–2013 гг. в Беларуси изоляты анализируемых серотипов принадлежали к геновариантам, которые ранее не циркулировали на территории нашей страны.

Таблица — Спектр и количество выделенных НПЭВ по регионам Республики Беларусь в 2012 и 2013 гг.

Год	Источник выделения НПЭВ	Регион (кол-во выделенных изолятов НПЭВ)						
		Витебский	Гомельский	Минский	Брестский	Могилевский	Гродненский	г. Минск
2012	Внешняя среда	Е5 (1)	КВ5 (3) КВ1 (1) н/т* (1)	н/т (2)	Е6 (1)	н/т(1)	н/т (3) КВ1 (1)	КВ3 (2) КВ5 (4) Е6 (1) Е22 (1) Е19 (1) Е24 (1) н/т (4)
	Клинический материал	н/т (2)	КВ4 (1) КВ1 (3) КВ5 (4) $КВ_{1–6}$ (3) Е 30 (2) н/т (2)	Е6 (1) Е5 (1) Е11 (2)	Е6 (1) КВ1 (5) КВ3 (3) КВ5 (91) $КВ_{1–6}$ (3)	КВ5 (3) н/т (1)	$КВ_{1–6}$ (3) н/т (1)	Е 6 (1) КВ5 (1) н/т (2)

Окончание таблицы 1

2013	Внешняя среда	E11 (1)					н/т (2)	КВ3 (8) КВ5 (1)
	Клинический материал	КВ3 (1) КВ5 (1) E6 (4) E11 (33) E16 (4) E9 (1) E30 (14)	КВ4 (2) КВ3 (1) E 30 (4) КВ5 (1)	E30 (2) E33 (4) E11 (1) E9 (1) н/т (1)	$КВ_{1–6}$ (4) н/т (1)	E6 (1) E11 (2)		E 6 (4) E16 (1) КА9 (5) E30 (8) E11 (1) н/т (3)

Примечание — *н/т — нетипируемые вирусы.

Изоляты ЕСНО 30 2012–2013 гг. объединялись в один монофилетический кластер, в который входили также несколько вирусов, выделенных в других странах мира. Среднее эволюционное расстояние внутри данного кластера составило 0,028±0,007 нуклеотидных замен/сайт, тогда как эволюционное расстояние между вирусами ЕСНО 30, циркулировавшими на территории нашей страны в 2012–2013 гг. и в предшествующие годы (с 1997 по 2009 гг.), было в 5,7–7,4 раз выше (0,162–0,208 нуклеотидных замен/сайт соответственно). Этот факт указывает на то, что связываемая с вирусом ЕСНО 30 заболеваемость ЭВИ в 2012–2013 гг. не была обусловлена ранее циркулировавшими в стране геновариантами вируса ЕСНО 30.

Изоляты ЕСНО 11, идентифицированные в 2013 г., входили в общий монофилетический кластер с вирусами, выделенными в других странах и принадлежавшими к генетической линии D5 согласно классификации С. Оберста [1], тогда как ранее циркулировавшие в нашей стране вирусы ЕСНО 11 (2006 г.) принадлежали к генетической линии D4. Наибольшим сходством с изолятами ЕСНО 11 2013 г. (95,2–98,3%) обладали вирусы, циркулировавшие во Франции в 2010–2012 гг.

Результаты филогенетического анализа изолятов ЕСНО 6 показали, что в отличие от вирусов ЕСНО 30 и ЕСНО 11 их популяция характеризовалась значительной генетической гетерогенностью и включала 3 различные достаточно удаленные друг от друга генетические линии вируса. Все они помимо белорусских изолятов включали вирусы ЕСНО 6, циркулировавшие в других странах и обладавшие 98–99% сходством с исследуемыми (это вирусы, циркулировавшие в 2011 г. во Франции, Финляндии, Китае и Японии).

Результаты филогенетического анализа белорусских изолятов CVB3 показали, что они входили в общий кластер со штаммами CVB3 генотипа V-B [2], циркулировавшего в предшествующие годы на территории стран Юго-Восточной Азии. Они достоверно группировались в составе общего кластера с вирусами, циркулировавшими в различных провинциях Китая в 2008 г. (среднее эволюционное расстояние 0,037±0,009 нуклеотидных замен/сайт). Полученные результаты свидетельствуют о принадлежности капсидного региона генома CVB3 к генотипу, циркуляция которого имеет четкую географическую локализацию (Юго-Восточная Азия).

Результаты филогенетического анализа изолятов CVA9, идентифицированных у пациентов в 2013 г. (рисунок 11), свидетельствовали о том, что они принадлежали к генетической линии 2, ранее обнаруживаемой преимущественно на территории Китая [3]. Внутри данной линии среди белорусских изолятов CVA9 наблюдалось определенное генетическое разнообразие, и они относились к 2-м различным генетическим вариантам. Так, один из белорусский изоляов CVA9 (№ 11933) группировался вместе с изолятами геноварианта, циркуляция которого наблюдалась в Китае с 2006 по 2009 гг. Интересно отметить, что все исследованные в Китае изоляты данного геноварианта были выделены от детей с симптомами острой респираторной инфекции [4]. Вторая часть белорусских изолятов CVA9 (№№ 11939, 11942, 11943) принадлежали к другой генетической группе в составе 2-й генетической линии вируса и группировалась вместе с геновариантом вируса CVA9, вызвавшем вспышку в Китае в 2005 г. [3] и в Канаде в 2010 г. [5]. К этой же генетической группе принадлежали вирусы, идентифицированные на территории России (г. Чита, 2010 г.).

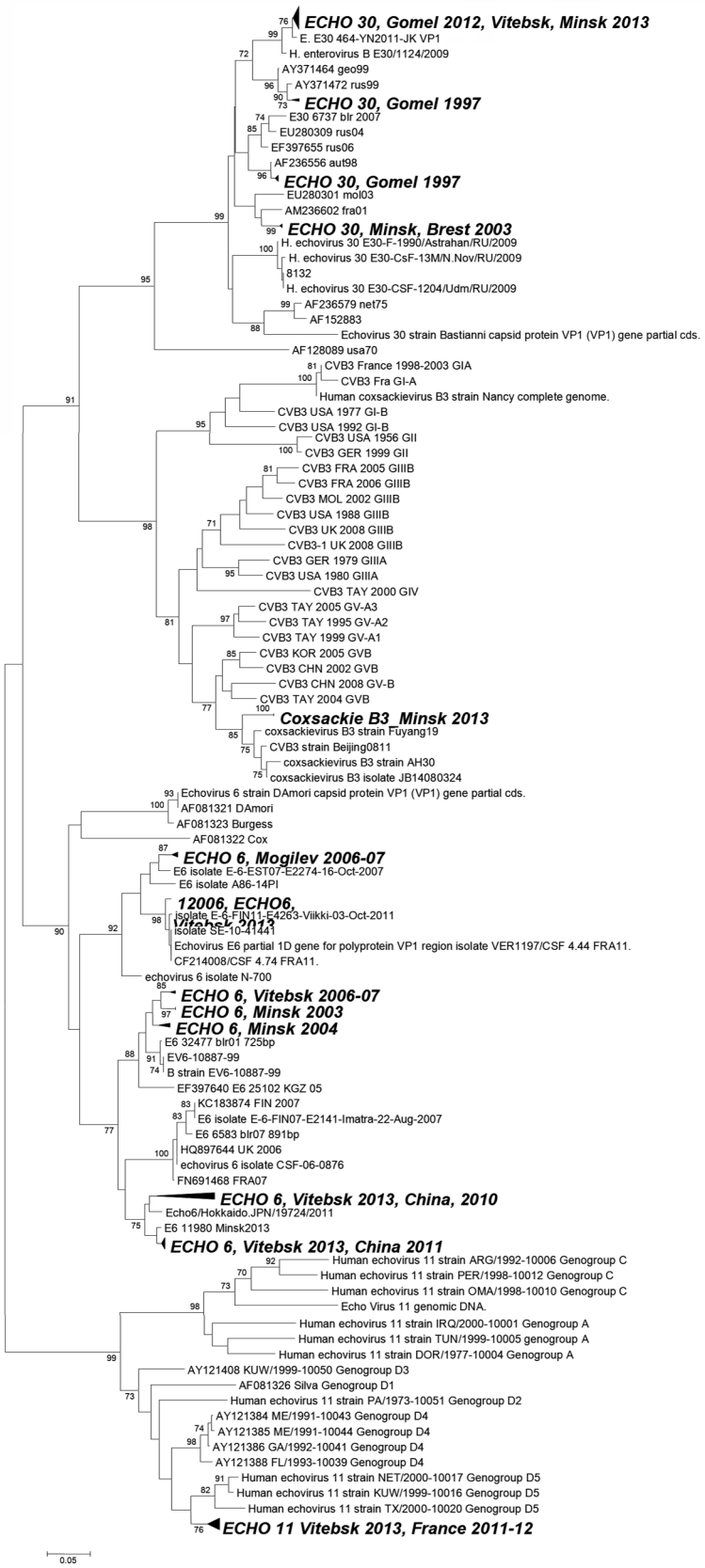


Рисунок 10 — Филогенетическая реконструкция по результатам анализа фрагмента нуклеотидной последовательности гена VP1 изолятов ECHO 11, ECHO 30, ECHO 6 и Коксаки B3, идентифицированных у пациентов с ЭВИ в Беларуси в 1997–2013 гг. Жирным курсивом обозначены группы изолятов, идентифицированных в 2012–2013 гг.

Для установления геновариантов, имеющих общую эволюционную историю, и тех, которые разошлись вследствие рекомбинации, был проведен дополнительный филогенетический анализ фрагмента генома, кодирующего неструктурные белки НПЭВ. Выбор второго региона генома для анализа был обусловлен тем, что все НПЭВ по этому участку являются рекомбинантами в пределах каждого из 4-х видов — Human Enterovirus A, B, C и D [6]. Рекомбинация происходит в среднем 1 раз в 4 года, в результате чего изоляты, которые являются близкородственными по капсидному региону, приобретают значительные различия по генам неструктурных белков. Согласно полученным данным внутренняя рекомбинация среди белорусских изолятов 2012–2013 гг. отсутствовала. При сравнении их с вирусами, циркулировавшими в других странах мира, было установлено, что изоляты ECHO 30, ECHO 6 и Коксаки B 3 обладали значительной степенью сходства (более 95%) по двум исследованным регионам (VP1 и 3CD) со штаммами, идентифицированными в различное время на территории КНР. Так, белорусские изоляты ECHO 30 обнаруживали 95,8–96,5% сходства нуклеотидной последовательности по гену капсидного белка VP1 и 96,6–96,9% сходства по участку 3CD со штаммом E30SD2010CHN. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые изоляты ECHO 30 принадлежали к тому же геноварианту, что и штамм E30SD2010CHN. Данный генетический вариант вируса ECHO 30 был выделен и охарактеризован в Китае в 2010–2011 гг. во время двух вспышек вирусной пузырчатки (hand-foot-and mouth disease). Причем по опубликованным данным изоляты этого геноварианта вируса ECHO 30 были выделены от пациентов с наиболее тяжелыми формами инфекции, в частности с вирусными энцефалитами [7].

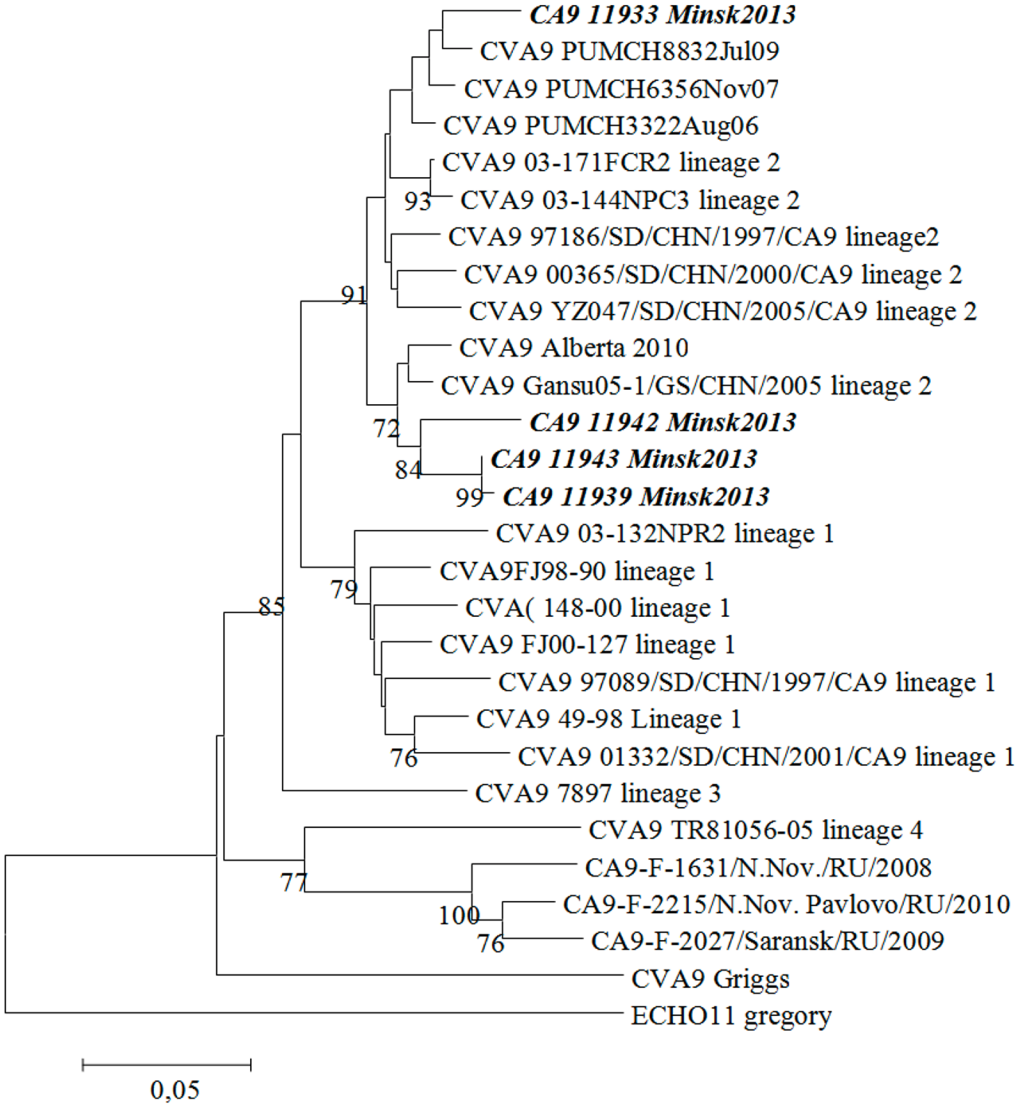


Рисунок 11 — Результаты филогенетической реконструкции на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP1 изолятов CVA9

Сравнительный генетический анализ изолятов ECHO 6 показал, что II и III геногруппы изолятов обладали значительной степенью сходства со штаммом ECHO 6 E6SD11CHN, идентифицированным в 2011 г. в Китае: по региону VP1 они обнаруживали 96,0–97,9% сходства, а по региону 3C3D — 95%. Данный штамм, как и упомянутый выше штамм ECHO 30, был идентифицирован во время крупной вспышки вирусной пузырчатки в Китае в 2011 г., характеризовавшейся чрезвычайной массовостью и тяжестью течения (более 3 млн заболевших, 1414 умерших) [7].

Белорусские изоляты вирусов Коксаки B3, выделенные от пациентов в 2013 г., имели 95,0–95,4% сходства по региону VP1 и 95,7–95,8% — по региону с вирусами CVB3, циркулировавшими в Китае в 2008–2011 гг. и выделенными от пациентов с миокардитом, энцефалитом и тяжелой формой вирусной пузырчатки [8].

Полученные нами данные о принадлежности к единой генетической линии и значительной степени сходства белорусских и китайских вирусов ECHO 30, ECHO 6 и CVB3 не позволяют, однако, сделать вывод о непосредственном их заносе из Китая, т. к. вероятно в этом случае доля генетических различий между изолятами не превышала бы 1–1,5%. Наблюдаемая доля различий в 3–5% свидетельствует о том, что данные геноварианты какое-то время (2–5 лет) циркулировали в человеческой популяции между моментом их первичной идентификации в Китае в 2008–2011 гг. и появлением на территории Беларуси в 2012–2013 гг., что привело к накоплению в их геномах такого количества различий.

Таким образом, по результатам молекулярно-эпидемиологического анализа эпидемически значимых в 2012–2013 гг. НПЭВ установлено, что подъем заболеваемости ЭВИ, зарегистрированный в этот период, был обусловлен появлением на территории нашей страны новых геновариантов серотипов ECHO 30, ECHO 11, ECHO 6, CVB3 и CVA9. Большинство выявленных геновариантов (ECHO 30, ECHO 6 и CVB3) возникло на территории Китая в периоды крупных вспышек и эпидемий и характеризовалось высоковирулентными свойствами. Однако, как указывалось выше, полученные результаты не позволяют достоверно утверждать о непосредственном заносе данных геновариантов с территории КНР, с большей вероятностью они свидетельствуют о постепенном распространении этих геновариантов в течение 2–5 лет через территорию сопредельных стран. Кроме того, в 2013 г. имела место генетическая гетерогенность популяций вирусов ECHO11, ECHO 6 и CVA9, циркулировавших на территории Беларуси. Как показывает анализ, появление различных геновариантов ECHO 11 с большей вероятностью явилась следствием активной циркуляции данного серотипа на территории нашей страны, тогда как отдельные геноварианты ECHO 6 и CVA9 сформировались до 2013 г. на территории других стран мира.

Представленные в настоящей статье данные свидетельствуют о достаточно быстром и интенсивном распространении новых высоковирулентных геновариантов НПЭВ по территориям различных стран в пределах единого эпидемического пространства, что однозначно указывает на необходимость осуществления их регулярного молекулярно-эпидемиологического мониторинга в нашей стране, а также тщательного анализа соответствующей информации о крупных вспышках и обострениях эпидситуации по ЭВИ за ее пределами.

Литература

1. Molecular epidemiology and type-specific detection of echovirus 11 isolates from the Americas, Europe, Africa, Australia, southern Asia and the Middle East / S. Oberste [et al.] // Virus Res. — 2003. — Vol. 91. — P. 241–248.

2. Molecular epidemiology of Coxsackievirus B3. / P.Y. Chu [et al.] // Genet Evol. — 2010. — Vol. 10, № 6. — P. 777–784.

3. An outbreak of aseptic meningitis caused by coxsackievirus A9 in Gansu, the People's Republic of China / A. Cui [et al.] // Virol. J. — 2010. — Vol. 7. — P. 72.

4. Coxsackievirus A21, enterovirus 68, and acute respiratory tract infection, China / Z. Xiang [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 18, № 5. — P. 821–824.

5. Genetic characterization of a Coxsackie A9 virus associated with aseptic meningitis in Alberta, Canada in 2010 / K. Pabbaraju [et al.] // Virology J. — 2013. — Vol. 10. — P. 93.

6. Evidence of recombination among enteroviruses / J. Santti [et al.] // J. Virol. — 1999. — Vol. 73. — P. 8741–8749.

7. Epidemics and Frequent Recombination within Species in Outbreaks of Human Enterovirus B-Associated Hand, Foot and Mouth Disease in Shandong China in 2010 and 2011 / T. Zhang [et al.] // PLoS ONE. — 2013. — Vol. 8, № 6. — e67157.

8. Complete genome sequence of a human coxsackievirus b3 from a child with myocarditis in Beijing, China / J. Du [et al.] // Genome Announc. — 2013. — Vol. 1, № 1. — e00163.

ENTEROVIRAL INFECTION IN THE REPUBLIC OF BELARUS: MORBIDITY STRUCTURE AND ITS MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL PECULIARITIES

Amvrosieva T.V.[1], Paklonskaya N.V.[1], Bogush Z.F.[1], Zueva V.L.[2]

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

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

The article comprises enteroviral morbidity data from the official statistic reports in the Republic of Belarus for the last years and its analysis in dynamics of epidemic process according to spatial distribution, age and clinical forms. Data also includes an information about spectrum of non-polio enteroviruses (NPEV) which circulated in human population and environment as well as the results of molecular epidemiology of five the most epidemically significant for Belarus serotypes (ECHO 11, ECHO 30, ECHO 6, Coxsackievirus B3 and Coxsackievirus A9). Obtained results showed fast and active spread of the new highly virulent NPEV genovariants within the world common epidemic space and an introduction some of epidemically important causative agents, primary identified in China and/or contiguous countries.

Keywords: enteroviral infection, morbidity structure, enteroviruses, molecular epidemiology, genotypes.

Поступила 09.07.2014

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ НАСЕЛЕНИЯ К *COXIELLA BURNETI* В КАРПАТСКОМ РЕГИОНЕ УКРАИНЫ

Виноград Н.А., Скальская Н.И.

Львовский национальный медицинский университет им. Д. Галицкого

Министерства здравоохранения Украины, Львов, Украина

Реферат. Представлены результаты серологических исследований сывороток крови сельских жителей карпатского региона Украины, проведенные с целью изучения уровня популяционного иммунитета населения к *Coxiella burnetii*. Установлено, что количество сероположительных к коксиеллам лиц существенно отличалось в трех ландшафтных зонах, где проводились исследования, и в среднем уровень проэпидемичевания сельского населения составил 7,8±1,4%. Анализ сероположительных случаев показал, что IgG к *C. burnetii* преимущественно обнаруживались у лиц среднего возраста, в большинстве случаев не работающих, а занятых ведением подсобного хозяйства в частном секторе. Эпидемиологические исследования позволили выявить наиболее существенные факторы риска: уборка сена, соломы; заготовка кормов для домашнего скота на зиму, выпас домашнего скота.

Ключевые слова: лихорадка Ку, популяционный иммунитет, факторы риска.

Введение. Лихорадка Ку — типичный зооантропоноз с множественными механизмами передачи, многочисленными и разнообразными по видовому составу компонентами паразитарных систем. Циркуляцию *C. burnetii* в природных и антропургических очагах обеспечивают десятки видов диких и домашних животных, птиц, различные виды клещей, которые являются резервуарами возбудителя. Заболевание имеет планетарное распространение, поражая людей различных возрастных групп и профессий. И хотя с момента открытия возбудителя прошло 77 лет, многие аспекты проблемы, связанной с *C. burnetii*, требуют дальнейшего изучения.

Внедрение молекулярно-генетических технологий выявило уникальность генетического материала коксиелл и, что стало большой неожиданностью для специалистов, существенные отличия их от риккетсий. В результате этого риккетсии были отнесены к классу I *Alphaproteobacteria*, семейству *Rickettsiaceae*, тогда как род *Coxiella* — к классу III *Gammaproteobacteria*, семейству *Coxiellaceae*, где последние по таксономическим признакам оказались рядом с родами *Legionella* и *Pseudomonas*. [1]. Сложная трансформация антигенной структуры *C. burnetii* в динамике заболевания, а соответственно и продукция антител в организме инфицированного человека, вносит существенные отли-

чия в определения острого или хронического случая течения болезни по данным лабораторных исследований, что принципиально отличается от общепризнанных стандартов при иных инфекционных болезнях [2]. Полиморфность клинической картины лихорадки Ку не позволяет без надлежащей верификации каждого подозрительного случая обеспечить эффективную клиническую диагностику и, следовательно, оценить медико-социальное значение этой инфекционной патологии.

Одним из наиболее эффективных подходов к оценке значимости любого инфекционного или паразитарного заболевания является серологический мониторинг населения в целом или среди определенных целевых групп. При сочетании мониторинга с углубленными эпидемиологическими исследованиями можно получить важную информацию о количественных и качественных показателях эпидемического процесса, включая данные о группах и территориях риска. Такой подход к определению актуальных для страны инфекционных и паразитарных заболеваний является основанием для определения национальных приоритетов эпидемиологического надзора, позволяет избежать ошибок при планировании профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Результаты сероэпидемиологического мониторинга населения в разных странах в отношении лихорадки Ку существенно отличаются. В Северо-Западном регионе РФ в 80-90-х гг. прошлого века от 1,5 до 3,3% обследованных доноров имели в сыворотках крови антитела к коксиеллам, в частности в Ульяновской области этот показатель составлял 3,2–4,5% [3].

Исследования в последние годы в ряде европейских стран показали, что уровень серопозитивности населения к коксиеллам во Франции составляет 7,8%, Германии — 7,5%, Италии — 13,6%, Голландии — 2,4%, Северной Ирландии — 12,8%, Испании — 23,1–48,6% [2]. В других странах Средиземноморского региона аналогичные показатели колеблются в пределах от 2,4 до 30% и выше, в частности на юге Италии в группе доноров выявлено 13,6% положительных лиц к коксиеллам. Многолетний мониторинг эндемических по Ку-лихорадке зон Франции показывает увеличение процента сероположительных лиц к C. burnetii от 1% в 1989 г. до 3–4% в 2005–2009 гг. В северных регионах Франции, расположенных ближе к Бельгии, популяционный иммунитет населения значительно ниже (0,5%), тогда как в самой Бельгии он составляет практически 5% [4, 5].

Существенные изменения в иммунной прослойке населения произошли среди населения Голландии после эпидемии лихорадки Ку, имевшей место в 2009–2010 гг., когда было зарегистрировано более 4 тысяч случаев инфицирования. По данным изучения сывороток крови доноров, до начала эпидемического подъема в 2009 г. антитела к *C. burnetii* определялись у 2,4% обследованных лиц, тогда как по его завершению — у 12,2%. [6]. При этом было отмечено существенное возрастание аналогичных показателей и в Дании — до 11% [7].

В США длительное время лихорадка Ку не была включена в систему национального эпиднадзора, т. к. за период наблюдений в 1978–1999 гг. заболевание было выявлено всего в 436 случаях. С 1999 г. была организованна адекватная лабораторная диагностика подозрительных случаев заболеваний среди населения. С 2000 по 2004 гг. показатель возрос на 250%, что обусловило внедрение в стране планомерного сероэпидемиологического мониторинга лихорадки Ку в системе эпиднадзора [4].

По результатам сероэпидемиологических обследований населения ряда регионов Украины в период 2000–2009 гг. наблюдалось существенное снижение количества сероположительных лиц к коксиеллам (до 2,2%) по сравнению с 13,1% сероположительных результатов в 1985–1995 гг. [7]. Так, по данным обследования сывороток крови доноров Ивано-Франковской и Тернопольской областей, удельный вес сероположительных находок составлял 1,39 и 1,07% соответственно, а при обследовании жителей Донбасса — 1,23%. В целом энзоотические по лихорадке Ку территории обнаружены в 19 административных территориях Украины, АР Крым и г. Севастополе, где показана циркуляция возбудителя в 267 населенных пунктах [8]. В 2010 г. впервые подтверждена циркуляция *C. burnetii* в биотических объектах, а в 2011 г. — случаи заболевания людей и на территории Киевской области [9].

К сожалению, в последние годы сероэпидемиологический мониторинг в Украине проводится нерегулярно и на ограниченном количестве административных территорий, что не позволяет оценить реальную эпидемическую ситуацию и многолетнюю динамику в целом по стране. Остается значительное количество административно-территориальных единиц, где отсутствуют данные о циркуляции *C. burnetii* среди населения, в т. ч. регион Карпат со специфической вертикальной зо-

нальностью и организацией быта населения, что и обусловило необходимость проведения наших исследований.

Цель работы — изучение уровня популяционного иммунитета населения к *C. burnetii* в трех различных климатогеографических районах западного региона Украины и эпидемиологических особенностей группы сероположительных лиц, проживающих в горах (район «Г»), на равнинной (район «Р») и предгорной территориях (район «ПГ»).

Материалы и методы. Забор крови из локтевой вены у жителей трех населенных пунктов в сельской местности был проведен с соблюдением принципов биоэтики после получения письменного добровольного информированного согласия каждого из 360 участников исследований. В момент исследования никто из лиц не имел признаков инфекционных заболеваний.

Серологические исследования сывороток крови на наличие IgG к *C. burnetii* проводилось с использованием тест-систем для иммуноферментного анализа (ИФА-анти-Ку, ФГУН НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, РФ). Сбор эпидемиологических данных был выполнен с использованием анкет открытого типа, информация систематизирована и проанализирована в Exel 06 с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение. Исследования в формате госпитального надзора, проведенные нами двумя годами ранее в этом регионе, подтвердили циркуляцию *C. burnetii*, о чем свидетельствовали верифицированные нами местные случаи острой лихорадки Ку [10].

Результаты серологических исследований в разрезе когортных исследований (для изучения популяционного иммунитета) позволили установить наличие сероположительных лиц во всех трех обследованных районах (рисунок).

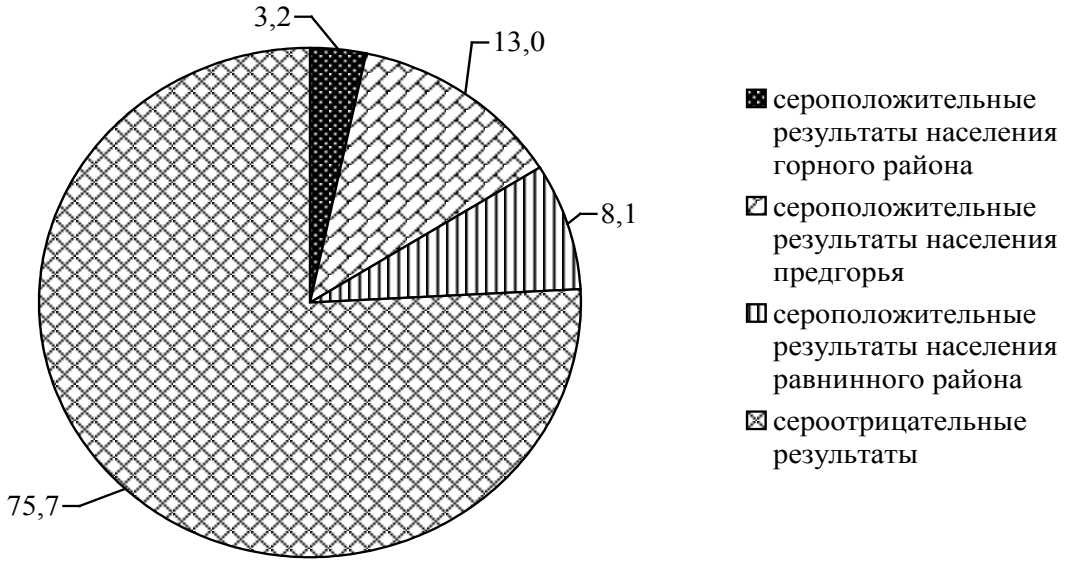


Рисунок — Структура популяционного иммунитета населения к лихорадке Ку исследуемых территорий

Так, антитела класса IgG к *C. burnetii* были обнаружены у 4 (3,2±1,6%) человек в горном районе, у 11 (8,1±2,3%) лиц в равнинном и у 13 (13,0±3,4%) обследованных в предгорном районе. Учитывая столь существенную разницу в показателях проэпидемичевания людей, мы проанализировали анкетные данные для оценки эпидемиологически значимых параметров сероположительных лиц в каждом из обследованных населенных пунктов. Углубленный анализ миграционного анамнеза 28

положительных к коксиеллам лиц показал, что инфицирование, вероятно, произошло по месту постоянного проживания.

В целом в населенном пункте, расположенном в горном районе, было обследовано 125 лиц. Антитела к *C. burnetii* обнаружены у трех взрослых мужчин и одной женщины, их возраст колебался от 27 до 46 лет (в среднем — 40 лет). Никто из них длительное время официально нигде не работал. Основное время они проводили на подворье, принимая участие во всех домашних делах, в т. ч. сезонных сельскохозяйственных работах и по уходу за домашними животными. В одном случае в анамнезе было частое посещение леса с целью сбора ягод в летнее время. Все употребляли в пищу термически необработанные молочные продукты. Никто из этой группы не имел в анамнезе ранее перенесенных заболеваний, которые по клинической манифестации были бы близки к лихорадке Ку.

В районе «Р» было обследовано 135 сывороток клинически здоровых лиц, среди которых было обнаружено 11 сероположительных людей. Анализ анкетных данных показал, что возраст лиц, у которых были обнаружены антитела к коксиеллам, колебался от 32 до 66 лет (в среднем 53 года). В отличие от предыдущей группы среди них преобладали лица женского пола (63,7±15,2%): это были домохозяйки и пенсионерки. Большинство из них занимались уборкой сена, соломы и заготовкой кормов для скота на зиму (54,5±15,7%), а 27,3±14,1% обследованных принимали участие в земледельческих работах. Люди употребляли в пищу молочные продукты, которые в большинстве случаев не подвергались термической обработке.

Обращает внимание на себя тот факт, что только в двух случаях были обнаружены по два сероположительных члена семьи, тогда как у остальных, проживающих на одном подворье людей, антитела к *C. burnetii* выявлены не были. Как и предыдущей группе, никто не указывал на перенесенные ранее инфекционные заболевания, сопровождавшиеся температурной реакцией.

Титрование сывороток крови 100 жителей предгорья позволило обнаружить среди обследованных 13 сероположительных лиц к *C. burnetii.* В распределении по половому признаку отличий в данной группе выявлено не было: женщины — 6 случаев, мужчины — 7 случаев. Антитела к коксиеллам были обнаружены только у взрослого населения, их средний возраст составил 42,3 года. Как и в предыдущих подгруппах, это были преимущественно неработающие лица (69,2±13,3%). Анализ анкетных данных не выявил существенных отличий по характеру ведения приусадебного хозяйства, видам домашних работ: все принимали участие в заготовке для скота на зиму фуража, 84,6±10,4% из них выращивали картошку и овощи. Отличием от предыдущих подгрупп было то, что половина сероположительных лиц постоянно были заняты выпасом домашнего скота. Вторая особенность заключалась в том, что один мужчина за полгода до наших исследований имел в анамнезе перенесенное лихорадочное заболевание, сопровождавшееся трехдневной лихорадкой, насморком и головной болью.

Заключение. Таким образом, карпатский регион является эндемичным по лихорадке Ку, о чем свидетельствует обнаружение сероположительных к *C. burnetii* лиц среди местного населения. Уровни проэпидемичевания населения в различных климатогеографических районах западного региона Украины отличаются, а усредненный показатель достигает 7,8±1,4%. Территориями высокого риска по лихорадке Ку являются предгорный (8,1±2,3%) и равнинный (13,0±3,4%) районы. Для формулирования гипотезы о факторах риска необходимо продолжить углубленные комплексные эпизоотологические, энтомологические, санитарно-ветеринарные исследований. Предварительные данные по изучению факторов риска инфицирования населения не исключают варианты заражения пищевым путем (потребление термически необработанных молочных продуктов), контактным или воздушно-пылевым — при уходе за домашними животными и проведении других сельскохозяйственных работ в частном секторе.

Литература

1. Taxonomic position of the Rickettsiae: Current knowledge / F.S. Gehrke [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. — 2009. — Vol. 15, № 2. — P. 267–268.

2. Risk assessment on Q fever: ECDC technical report / F. Forland [et al.]. — Stockholm, 2010. — 40 p.

3. Нафеев, А.А. Эпидемиологическая ситуация по Ку лихорадке в Ульяновской области / А.А. Нафеев // Актуальные проблемы предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств-участников СНГ: материалы X Межгосударст. НПК государств-участников СНГ, г. Ставрополь, 5–6 окт., 2010. — С. 91–92.

4. Q fever in France, 1985–2009 / D. Frankel [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 17, № 3. — P. 350–356.

5. Q-fever in Woolsorters, Belgium / P. Wattiau [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 17, № 12. — P. 2368–2369.

6. Proximity to goats farms and *Coxiella burnetii* seroprevalence among pregnant women / W. van der Hoek [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 17, № 12. — P. 2360–2362.

7. Епідемічні спалахи Ку-гарячки в Європі на початку XXI століття та актуальні завдання епіднагляду в Україні / З.Г. Кушнір [та ін.] // Актуальні питання епіднагляду за особливо небезпечними інфекціями, санітарна охорона території, біологічна безпека: матеріали НПК, м. Іллічівськ, 8–10 вересня, 2010. — С. 55-57.

8. Поєднані осередки гарячки Ку та інших зоонозів / З.Г. Кушнір [та ін.] // Актуальні проблеми особливо небезпечних інфекцій та біологічної безпеки: матеріали НПК, АР Крим, м. Євпаторія, 18–20 вересня, 2012. — С. 65-68.

9. Комаренко, Н.С. Проблеми клінічної та лабораторної діагностики Ку-гарячки / Н.С. Комаренко, Н.О. Виноград // Питання експериментальної та клінічної медицини. — 2011. — Вип. 15, Т. 2. — С. 50–55.

10. Виноград, Н.А. Эффективность госпитального надзора за коксиеллезом / Н.А. Виноград, Н.И. Скальская // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. – Минск: ГУ РНМБ, 2013. — Вып. 6. — С. 33–36.

SEROPREVALENCE OF POPULATION TO COXIELLA BURNETII IN UKRAINE CARPATIAN REGION

Vynograd N.A., Skalska N.I.

Danylo Halytskiy Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Serological investigation of blood sera from the rural residents in western region of Ukraine with purpose to study of seroprevalence to *Coxiella burnetii* had been conducted. It was shown because rates of seroprevalence human from three investigated landscape areas had been different and ones average amount to 7.8±1.4%. Analyzed data of seropositive cases had been shown that IgG antibodies to *C. burnetii* were found in predominantly middle-aged endogenous, mostly unemployed persons, but involved to subsidiary farming in the private sector. Epidemiological studies had been identified the most significant risk factors as laying of hay and straw; harvesting for livestock stern for the winter, livestock grazing.

Keywords: Q fever, seroprevalence, risk factors.

Поступила 10.06.2014

СЕРОЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК В КИЕВСКОЙ ОБЛАСТИ

Виноград Н.А.[1], Комаренко Н.С.[2]

[1]Львовский национальный медицинский университет им. Д. Галицкого Министерства здравоохранения Украины, Львов;

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

Реферат. Представлены результаты серологических исследований сывороток крови людей с целью установления факта инфицирования их ханта- и найровирусами. Хантавирусы вызывают геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС), а найровирусы — Крымскую-Конго геморрагическую лихорадку (ККГЛ). Исследования проведены согласно общепринятым стандартам мониторинга при госпитальном надзоре (25 пациентов) за геморрагическими лихорадками, а также плановым серологическим обследованиям групп высокого профессионального риска заражения зооантропонозными возбудителями (58 обследованных). У 6 пациентов верифицирована ГЛПС. У троих пациентов выявлены антитела класса IgM и у троих — IgG (4-кратный прирост в парных сыворотках) к хантавирусам, а случаев заболеваний Крымско-Конго геморрагической лихорадкой (ККГЛ) среди обследованных не выявлено. Процент положительных находок к хантавирусам в группе лиц профессионального риска заражения составил 18,1±1,36% (15 человек), а к ККГЛ — 1,2±0,03% (1 из обследованных). Данные эпидемиологического анамнеза позволили оценить все случаи инфицирования как местные. Результаты исследований свидетельствуют об эндемичности территории области по ГЛПС и ККГЛ.

Ключевые слова: геморрагические лихорадки, хантавирусы, ГЛПС, ККГЛ, Киевская область.

Введение. Проблема вирусных геморрагических лихорадок (ГЛ) находится в центре внимания многих специалистов, что способствует прогрессу в изучении клинических, эпидемиологиче-

ских, иммунологических и иных аспектов этих особо опасных инфекций (ООИ). Интенсивные исследования позволили глубоко изучить патогенетические механизмы сложных синдромальных комплексов, возникающих у инфицированных людей, и усовершенствовать методы индикации патогенных биологических агентов (ПБА). Значительным достижением последних лет является установление структур паразитарных систем при многих ГЛ, особенно при геморрагических лихорадках Эбола и Марбурга; картографирование территорий по степени риска с учетом субтипов и генотипов возбудителей ГЛ; открытие новых возбудителей ранее неизвестных геморрагических лихорадок. Не менее важным является углубление знаний об известных ГЛ, что позволяет совершенствовать систему защиты населения от этих биологических угроз [1–3].

Как и другие природно-очаговые заболевания, ГЛ имеют «географическую привязку», формируя стабильные региональные и зональные очаги. В то же время их пространственные характеристики могут существенно модифицироваться вследствие изменения климата на планете и иных антропогенных нагрузок. Высокий эпидемический потенциал и контагиозность, свойственные большинству ГЛ, отсутствие эффективных профилактических и лечебных препаратов и средств для защиты населения, вызывают особенную обеспокоенность. Интенсивные миграционные процессы способствуют многочисленным выносам ПБА далеко за пределы эндемичных территорий, несмотря на адекватные меры биозащиты и биосдерживания во время эпидемических осложнений. По поражающим характеристикам большинство возбудителей ГЛ отвечают требованиям к ПБА для включения их в список потенциальных возбудителей, которые могут быть использованы при биотерроризме или иных нештатных ситуациях [4–6].

Мониторинг территории Украины в течение нескольких десятилетий показал, что актуальными эндемичными для страны являются две вирусные ГЛ: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом и Крымская-Конго геморрагическая лихорадка. Восточный и центральный регионы страны расположены в пределах Восточноевропейского зонального очага ГЛПС, тогда как западные территории — Карпатского-Балканского зонального природного очага этой хантавирусной инфекции. Похожая закономерность наблюдается и при ККГЛ: Крымский полуостров и южные области являются составляющей частью общего природного очага с Турцией, а восточные и часть центральных областей — с Юго-западными регионами РФ. Выявление лишь единичных случаев заболеваний ГЛПС и ККГЛ среди населения прежде всего связано с отсутствием налаженной лабораторной диагностики в учреждениях практического здравоохранения [7]. Паразитарные системы этих ГЛ многокомпонентные по видовому составу основных источников инфекции, а особенностью их для хантавирусов является эволюционно сформированная адаптация каждого из вирусов к узкому спектру видов грызунов [8].

Лабораторная диагностика хантавирусных инфекций должна проводиться с учетом доминирующих серогрупп возбудителей, географическое распространение которых существенно отличается. С учетом патогенности возбудителей ханта- и найровирусных инфекций проводить изоляцию этих ПБА с диагностической целью нецелесообразно. Требуют усовершенствования и тест-системы для ПЛР, особенно для хантавирусов, поэтому серологический метод является основным при верификации диагнозов и сероэпидемиологическом мониторинге [9].

Что касается Киевской области, то она не была включена в программы мониторинга и оставалась необследованной в отношении циркуляции ханта- и найровирусов. Проведенные нами ранее исследования показали, что климатические характеристики, видовой состав членистоногих и млекопитающих в различных ландшафтных зонах области способствует функционированию природных очагов целого ряда вирусных и бактериальных трансмиссивных ООИ. Исходя из видового состава грызунов и эволюционной связи их видов с определенными хантавирусами [10], мы предположили, что на территории Киевской области могут циркулировать еще и другие возбудители, в частности ханта- и найровирусы, поражая людей, а отсутствие настороженности и возможности верификации ГЛПС и ККГЛ не позволяет проводить надлежащую дифференциальную диагностику и своевременно выявлять зараженных.

Цель работы — установление факта наличия или отсутствия сероположительных лиц среди лихорадящих пациентов и групп высокого профессионального риска заражения к ханта- и найровирусам, эпидемиологический анализ положительных случаев для установления места и обстоятельств их инфицирования.

Материалы и методы. Исследования проведены с соблюдением правил биологической безопасности, предусматривающих мероприятия по недопущению инфицирования персонала и распространения ПБА в окружающей среде. Забор крови проведен с соблюдением принципов биоэтики после получения добровольного информированного согласия людей, вовлеченных в исследования. Параллельно была собрана клинико-эпидемиологическая информация с использованием анкет открытого типа. Обследованию подлежали лица с диагнозами, не исключающими инфицирования ГЛ, а также лица из групп профессионального риска инфицирования возбудителями зооантропонозов.

Исследование сывороток крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с целью выявления иммуноглобулинов классов IgM и IgG к хантавирусам с использованием тест-систем «ВектоХанта-IgM», «ВектоХанта-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, РФ) и вирусу ККГЛ с использованием тест-систем для ИФА «ВектоКрым-КГЛ – IgM»; «ВектоКрым-КГЛ – IgG» (производства ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, РФ).

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием стандартной методики определения доверительного интервала и критерия Стьюдента. Расчеты проведены с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе были проведены исследования сывороток крови 25 пациентов, находившихся на стационарном лечении по поводу лихорадящих заболеваний неясной этиологии, преимущественно, с тяжелым клиническим течением болезни. Были выставлены первичные диагнозы «Лептоспироз», «Острый менингит», «Менингоэнцефалит», «Лихорадка неясного генеза». Проведено одномоментно титрование парных сывороток с целью обнаружения IgM и IgG к четырем хантавирусам (Пуумала, Хантаан, Сеул и Добрава), а также к вирусу Крымской-Конго геморрагической лихорадки.

У шести человек по данным наших исследований верифицирована ГЛПС. Антитела класса IgM были обнаружены в сыворотках крови трех пациентов, а у троих диагноз был подтвержден по 4-кратному приросту специфических иммуноглобулинов класса IgG в парных сыворотках крови. Диагноз ККГЛ по данным серологических исследований ни в одном случае не был подтвержден.

В группе лиц с ГЛПС были только взрослые, преимущественно мужского пола (5), средний возраст которых составил 37,8 года (22–63 года). Трое из них поступили на стационарное лечение с первичным клиническим диагнозом «Лептоспироз», у двоих была лихорадка неясной этиологии, у одного клинически был поставлен диагноз «Острый менингоэнцефалит». У всех пациентов заболевание манифестировало в дебюте гипертермией до 40°С, ознобом, головной, суставной и мышечной болью. В динамике болезни у двоих присоединились менингиальные симптомы, а у одного — сыпь по телу. Один случай ГЛПС завершился летально: 63-летний пациент был госпитализирован в тяжелом состоянии с диагнозом «Лептоспироз» и умер на третьи сутки, обстоятельства инфицирования не установлены. Лептоспироз в этом случае лабораторно не был подтвержден, а в сыворотке крови выявлены антитела к хантавирусам — IgG в высоких титрах (ОПкрит. — 11,12).

По данным эпиданамнеза, у всех пациентов инфицирование хантавирусами произошло на территории населенных пунктов по месту постоянного проживания при проведении сельскохозяйственных работ (3), уборке погреба (2), а в одном случае — при укусе крысой. При этом четверо из них проживали в зоне Полесья, а двое — Лесостепи.

Результаты обследования 58 лиц, относящихся к группе повышенного риска профессионального инфицирования (животноводы, ветеринарные врачи, зоотехники, дояры и др.) позволили выявить 15 сероположительных лиц к хантавирусам, а в одном случае у доярки были обнаружены антитела класса IgG к возбудителю ККГЛ.

Особо следует отметить факт, что к хантавирусам были обнаружены антитела обоих классов. Так, у 4 обследованных в сыворотках крови были иммуноглобулины класса IgM, у девяти — IgG, а у 2 — IgM и IgG одновременно.

Анализ распределения по профессионально-бытовым группам сероположительных по хантавирусам лиц показал, что 3 трое из них (20,0±3,53%) были работниками мясоперерабатывающих цехов, 4 — животноводы (26,67±5,13%), 2 — доярки (9,52±1,33%); 2 — работники подсобного хозяйства (9,52±1,33%); 1 — зоотехник (6,67±1,21%); 1 — ветеринарный врач (6,67±1,21%); 1 — работница, принимающая отелы (6,67±1,21%); 1 — работник норковой фермы (6,67±1,21%). Обследованы 9 женщин и 6 мужчин; средний возраст сероположительных к хантавирусам лиц составил 43,1 года

(20–64 года). Не выявлено различий среди этой группы по месту проживания в разрезе ландшафтных зон: 7 человек проживали на Полесье, а 8 — в зоне Лесостепи.

В общей сложности неблагополучных по ГЛ в Киевской области по результатам сероэпидемиологического мониторинга выявлено 9 административных территорий с 13 населенными пунктами (48,2%). При этом в зоне Полесья обнаружено 3 эндемичных района с 5 населенными пунктами, неблагополучных по ГЛПС, тогда как в зоне Лесостепи — 6 административных территорий с 8 населенными пунктами. Результаты мониторинга в группах госпитального надзора и высокого профессионального риска инфицирования не совпали в пространственных территориальных характеристиках.

Таким образом, нами впервые изучены уровни серопозитивности населения Киевской области к возбудителям ГЛПС и ККГЛ в разрезе стандартов госпитального надзора и контроля групп высокого профессионального риска заражения и сероэпидемиологически установлена циркуляция среди населения ханта- и найровирусов. Учитывая медицинское значение проблемы ГЛ, в перспективе планируется продолжить исследования для определения эпизоото-эпидемического состояния территории Киевской области.

Выводы:

1. Впервые сероэпидемиологически установлена циркуляция возбудителей ГЛПС и ККГЛ среди населения Киевской области, что свидетельствует об эндемичности территории по ханта- и найровирусам.

2. С учетом данных эпидемиологического анамнеза сероположительных лиц можно предположить о существовании природных или антропургических очагов во всех ландшафтных зонах области.

3. Необходимо продолжить комплексные эпизоото-эпидемиологические и лабораторные исследования для определения количественных и качественных характеристик эндемичных ГЛ в Киевской области.

Литература

1. Global trends in emerging infectious diseases / K.L. Jones [et al.] // Nature. — 2008. — Vol. 451. — P. 990–993.
2. Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever–associated arenavirus from Southern Africa / T. Briese [et al.] // PLoS Pathog. — 2009. — Vol. 5, № 5: e1000455. doi:10.1371/journal.ppat.1000455.
3. The pathogenesis of nephropathia epidemica: new knowledge and unanswered questions / J. Mustonen [et al.] // Antiviral. Res. — 2013. — Vol. 100, № 3. — P. 589–604.
4. Leblebicioglu, H. Crimean-Congo haemorrhagic fever in Eurasia / H. Leblebicioglu // Int. J. Antimicrob. Agents. — 2010. — Vol. 36, suppl. 1. — P. 43–46.
5. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases / F. Keesing [et al.] // Nature. — 2010. — Vol. 468. — P. 647–652.
6. CDC. Emergency preparedness and response: Bioterrorism Agents / Diseases [Electronic resource]. — Mode of access: http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp. — Date of access: 16.06.2014.
7. Епідемічна ситуація щодо особливо небезпечних інфекційних хвороб та заходи профілактики, проблеми, перспективи / Л.С. Некрасова [та інш.] // Актуальні проблеми особливо небезпечних інфекцій та біологічної безпеки: матеріали наук.-практич. конф., 18–20 вересня 2012 р. — Євпаторія. — 2012. — С. 2–7.
8. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в России — проблема XXI века / Е.А. Ткаченко [и др.] // Вестн. РАЕН. — 2012. — № 1. — С. 48–54.
9. Медицинская вирусология: руководство / Ред. Д.К. Львов. — М.: ООО «Мед. информ. агентство», 2008. — 656 с.
10. Комаренко, Н.С. Дрібні ссавці — резервуари трансмісивних особливо небезпечних інфекцій на Київщині / Н.С. Комаренко, Н.О. Виноград // Проблеми та еволюція епідемічного процесу і паразитарних систем провідних інфекцій сучасності: XV з'їзд мікробіологів, епідеміологів та паразитологів України, 23–25 листопада 2011 р. — Харків, 2011. — С. 23.

SEROEPIDEMIOLOGICAL MONITORING OF HEMORRHAGIC FEVERS IN KIEV REGION

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

[1]Danylo Halytskiy Lviv National Medical University, Lviv;

[2]Kyiv Regional Laboratory Center of State Sanitary & Epidemiological Service of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The results of serological tests of human blood serum with the aim of establishing the fact of their exposure to Hantaviruses and Nairoviruses is presented. Studies conducted according standards of moni-

toring at hospital syndromes' surveillance to hemorrhagic fevers, as well as planned serosurveys to occupational groups at high risk of contracting to zooanthroponozes' pathogens. Six patients verified hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) at detecting three patients with IgM antibodies and three — IgG (4-fold increase in paired sera) to Hantavirus, whereas cases of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) have been not identified. Percentage of positive findings to Hantavirus in the group of occupational exposure risk was 18.1±1.36%, and to CCHF — 1.21±0.03%. Epidemiological history allowed evaluating all cases of infection at the place of exposure as a local. Research results indicate that the region is endemic for HFRS and CCHF.

Keywords: hemorrhagic fevers, Hantaviruses, HFRS, CCHF, Kiev region.

Поступила 17.06.2014

О ПРОВОДИМОМ МОНИТОРИНГЕ И ЭПИДСКРИНИНГЕ ЗА РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ НА ТЕРРИТОРИИ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ

Гиндюк Н.Т., Садовникова Г.В., Глебко Л.В., Рудая Л.Н.

Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Брест, Беларусь

Реферат. В статье приведены данные мониторинга и эпидскрининга за распространением ВИЧ-инфекции на территории Брестской области. Отражен характер развития эпидпроцесса, особенности его изменения с учетом временного фактора. Дана характеристика эпидскрининга, результативность выявления ВИЧ-инфекции по причинам обследования (коды). Определены характерные особенности развития эпидпроцесса, что в свою очередь позволят осуществлять контроль над распространением ВИЧ-инфекции на территории области и принимать профилактические меры, направленные на предупреждение распространения заболеваемости.

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

Мониторинг и эпидскрининг за распространением ВИЧ-инфекции на территории Брестской области проводится более 25 лет. В 1988 г. с момента выявления первых случаев ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь начали функционировать первые три диагностические лаборатории при областной и двух городских станциях переливания крови. В настоящее время в области функционирует 8 диагностических лабораторий, в т. ч. 1 при государственном учреждении «Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» (ГУ «БОЦГЭиОЗ»), 4 — в учреждениях службы переливания крови, 3 — при центральных районных больницах [1].

В конце 80-х — начале 90-х гг. прошлого столетия на первых этапах проведения мониторинга и эпидскрининга было организовано широкомасштабное лабораторное обследование населения: на ВИЧ обследовались практически почти все пациенты, обращающиеся за медицинской помощью в организации здравоохранения. Интенсивный показатель обследований населения находился в пределах 216,0–265,0 на 1000 населения [1]. Однако результативность этой работы была низкой, выявлялись единичные случаи заболевания, большей частью у прибывших из других государств. В начальный период, когда еще не произошло накопления возбудителя в популяции населения области, широкомасштабные обследования населения были признаны необоснованными в силу их низкой результативности и высокой стоимости.

Начиная с 1993 г. отмечалось сокращение объема эпидскрининга на выявление ВИЧ до 120,0–110,0 исследований на 1000 населения. Лабораторные исследования на ВИЧ-инфекцию стали проводится более дифференцировано с учетом эпидемиологической значимости контингентов, наличием клинико-диагностических показаний. Изменилась структура лабораторных исследований: увеличилось число обследований по клиническим показаниям (код 113), на анонимно-доверительной основе (код 114). Выявляемость ВИЧ-инфекции была невысокой и составляла в 1996–1997 гг. 1,7–3,2%.

В 1997–1998 гг. и начале 2000 гг. по инициативе проекта Глобального фонда ПРООН практиковалось проведение так называемого дозорного эпиднадзора, направленного на изучение инфицированности ВИЧ среди отдельных категорий населения на анонимной основе (призывники, работ-

ники гостиниц, водители международных перевозок) [2] и среди групп повышенной уязвимости (потребители инъекционных наркотиков — ПИН, женщины секс-бизнеса — ЖСБ, мужчины, имеющие секс с мужчинами — МСМ). В ходе реализации программы ПРООН в течение 2006–2009 гг. была проведена работа по консультированию и лабораторному обследованию групп повышенной уязвимости — ЖСБ и МСМ. Всего было обследовано и проконсультировано 279 представителей МСМ и 177 ЖСБ, выявлен 1 случай ВИЧ-инфекции в группе ЖСБ [2]. Таким образом, результаты проведенной работы показали невысокую выявляемость ВИЧ-инфекции среди групп, обозначенных как «группы повышенной уязвимости».

Эпидемиологическая ситуация по распространению ВИЧ-инфекции кардинально изменилась в 1998 г., когда с помощью правоохранительных органов в течение года был выявлен 71 случай ВИЧ-инфекции у ПИН в г. Пинске. В целом по области выявляемость ВИЧ-инфекции составляла 24,5%.

В последующие годы отмечался стабильный прирост новых случаев ВИЧ-инфекции в основном среди ПИН в Пинском регионе, а также в других административных территориях области.

С 1998 г. с учетом изменения эпидситуации, участившимися случаями рождения ВИЧ-экспонированных детей, реальными рисками вертикальной трансмиссии ВИЧ-инфекции было введено обязательное тестирование на ВИЧ всех беременных с проведением дотестового и послетестового врачебного консультированиях [1].

С начала 2000-х гг. эпидпроцесс по распространению ВИЧ-инфекции на территории области стал развиваться, распространяясь среди различных категорий населения, в т. ч. социально благополучных слоев.

Мониторинг за эпидситуацией по ВИЧ-инфекции осуществлялся путем проведения скрининга населения на ВИЧ. Отмечается ежегодное возрастание количества проводимых скрининговых исследований. За 2013 г. обследовано на ВИЧ 158334 человек, что на 2,1% больше, чем в предыдущем (в 2010 г. — 122250, 2011 г. — 139314, 2012 г. — 155021 человек).

Структура обследований на ВИЧ-инфекцию за 2013 г. выглядит следующим образом: доноры — 26,5% (в 2012 г. — 26,2%), беременные — 26,6% (в 2012 г. — 27,0%), добровольное обследование — 28,1% (в 2012 г. — 27,1%), венбольные — 3,6% (в 2012 г. — 4,5%), по клиническим показаниям — 8,2% (в 2012 г. — 7,9%), лица из мест лишения свободы — 2,0% (в 2012 г. — 2,0%), наркоманы — 0,9% (в 2012 г. — 0,8%), анонимные обследования — 1,0% (в 2012 г. — 1,1%), реципиенты — 2,4% (в 2012 г. — 2,4%).

Наиболее результативными кодами по выявляемости ВИЧ-инфекции по результатам работы за 1-е полугодие 2014 г. являются: код 113 — 27,9% (клинические показания), код 100 — 20,1% (добровольное обследование), код 115 — 10,4% (половой контакт с ВИЧ-инфицированным — эпидпоказания), код 102 — 10,4% (внутривенное введение наркотических веществ), код 109 — 11,7% (беременные).

В условиях нарастания распространения ВИЧ-инфекции качество проводимого мониторинга и эпидскрининга приобретает особую актуальность, т. к. способствует выявляемости источников ВИЧ-инфекции, что очень важно, учитывая длительный асимптомный период при данной инфекции. Это в свою очередь способствует проведению адекватных противоэпидемических мероприятий.

По итогам работы за 2013 г. в области интенсивный показатель распространенности ВИЧ-инфекцией составил 70,1 случаяевна 100 тыс. населения. Выше среднеобластного показатель распространенности в г. Пинске — 417,5 случаев на 100 тыс. населения. По районам данный показатель был следующим: в Пинском районе — 117,3 случаев; в Лунинецком — 91,4; в Барановичском — 82,1 и в Ивановском — 76,0. Больше всего случаев ВИЧ-инфекции приходится на г. Пинск — 559 случаев, или 45,3% соответственно: г. Брест — 185, или 15,0%; г. Барановичи — 98, или 7,9%; Лунинецкий район — 65, или 5,3%.

За 6 месяцев 2014 г. выявлено 83 случая ВИЧ-инфекции, или 6,0 на 100000 (6 месяцев 2013 г. — 70, или 5,0 на 100 тыс. населения, рост 18,6%).

На 01.07.2014 кумулятивное число ВИЧ-инфицированных в Брестской области (за весь период статистического учета с 1989 г. по 01.07.2014) составило 1317 случаев, или 74,7 на 100 тыс. населения.

Распределение случаев по годам: с 1987 по 1996 гг. — 6, 1997 г. — 7, 1998 г. — 71, 1999 г. — 43, 2000 г. — 30, 2001 г. — 16, 2002 г. — 55, 2003 г. — 51, 2004 г. — 81, 2005 г. — 68, 2006 г. — 88, 2007 г. — 107, 2008 г. — 70, 2009 г. — 78, 2010 г. — 91, 2011 г. — 98, 2012 г. — 120, 2013 г. — 154.

В эпидемический процесс вовлечены все административные территории области. Наибольшее число выявленных ВИЧ-инфицированных в г. Пинске — 591 случай, или 44,9% от всех случаев (435,0 на 100 тыс. населения) соответственно: г. Брест — 195, или 14,8% (59,3 на 100 тыс. населения); г. Барановичи — 103, или 7,8% (59,2 на 100 тыс. населения); Лунинецкий район — 73, или 5,5% (104,6 на 100 тысяч населения). На эти 4 административные территории приходится 73,0% всех зарегистрированных случаев.

Основной путь передачи ВИЧ-инфекции — парентеральный, реализующийся при инъекционном введении наркотиков: всего выявлено 678 случаев (51,5%). На гетеросексуальные контакты за все годы наблюдения приходится 614 человек (46,6%). С 2008 г. наблюдается тенденция роста передачи ВИЧ при сексуальных контактах.

Большинство ВИЧ-инфицированных — это молодые люди в возрасте от 15 до 29 лет — 661 человек (50,2%). Общее количество случаев ВИЧ-инфекции в этой возрастной группе в 2011 г. составило 32 случая (30,7%), в 2012 г. — 47 (39,2%), в 2013 г. — 56 (36,4%), 6 мес. 2014 г. — 20 (24,1%).

Заболеваемость ВИЧ-инфекцией в возрастной группе 15–19 лет составляет 50 человек (3,9%), в т. ч. в 2010 г. — 3 случая (3,3%), соответственно в 2011 г. — 0 случаев, в 2012 г. — 3 (2,5%), в 2013 г. — 3 (1,9%), 6 мес. 2014 — 1 (1,2%).

Характерными особенностями развития эпидемического процесса по распространению ВИЧ-инфекции в настоящее время являются:

- тенденция ежегодного возрастания числа случаев заражений, связанных с гетеросексуальными контактами: 2011 г. — 60,2%, 2012 г. — 64,2%, 2013 г. — 75, 3%, 6 мес. 2014 г. — 72,3%.;
- распространение ВИЧ-инфекции среди различных групп населения, в т. ч. социально благополучных. Прослеживается тенденция снижения выявляемости ВИЧ-инфекции среди ПИН: 2011 г. — 38,8%, 2012 г. — 35%, 2013 г. — 22,1%, 6 мес. 2014 г. — 24,1%;
- возрастание числа ВИЧ-инфицированных в старших возрастных группах: за 6 мес. 2014 г. число ВИЧ-инфицированных в возрастных группах составило: старше 30 лет — 62случая (74,7%), в т. ч. старше 40 лет — 11случаев (13,2%), 45–49 лет — 10 случаев (12,0%), 60 лет и старше — 4 случая(4,8%);
- высокая выявляемость ВИЧ-инфекции у беременных, в т. ч. у женщин, не знавших о том, что они являются ВИЧ-инфицированными, и впервые узнавших об инфицированности при постановке на учет по беременности (в прошедшем 2013 г. удельный вес впервые выявленных среди взятых на учет ВИЧ-позитивных беременных составил 50,0%; из 52 беременных у 26 ВИЧ-инфекция была выявлена впервые), в 1-м полугодии 2014 г. выявлено 13 беременных, из них впервые о своем ВИЧ-статусе узнали 5 женщин (38,4%);
- увеличение числа детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей. Всего в области родилось 155 детей от ВИЧ-инфицированных матерей, в т. ч. в 2005 г. — 8, в 2006 г. — 18, в 2007 г. — 8, в 2008 г. — 14, в 2009 г. — 2, в 2010 г. — 9, в 2011 г. — 20, в 2012 г. — 15, в 2013 г. — 27, 6 мес. 2014 г. — 15. Диагноз «ВИЧ-инфекция» установлен 14 детям, в т. ч. в 2013 г. — 3 (1,9%), за 6 мес. 2014 — 1 (1,2%);
- увеличение числа летальных исходов среди ВИЧ-инфицированных лиц. По состоянию на 01.07.2014 среди ВИЧ-инфицированных умерло 279 человек, из которых 202 (72,4%) были ПИН, в т. ч. по годам: 2010 г. — 29 человек, соответственно в 2011 г. — 30, в 2012 г. — 28, в 2013 г. — 41, 6 мес. 2014 г. — 21. Диагноз «СПИД» установлен 205 ВИЧ-инфицированным, из которых 116 человек (56,6%) умерли.

Заключение. Мониторинг и эпидскрининг за распространением ВИЧ-инфекции на территории Брестской области позволяет анализировать эпидемическую ситуацию, выявить характерные особенности развития эпидемического процесса, наиболее уязвимые контингенты. На основании полученных результатов есть возможность осуществлять контроль развития эпидемического процесса и своевременно определять меры, направленные на предупреждение распространения инфекции, проводить целенаправленную информационно-образовательную работу среди населения области.

Литература

1. Об участии Брестского областного центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья в реализации проекта ПРООН «Профилактика и лечение ВИЧ/СПИД в Республике Беларусь» / О.В. Арнаутов [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск, 2009. — Вып. 2. — С. 38–40.

2. Рудая, Л.Н. О проводимом эпидемиологическом скрининге на ВИЧ-инфицирование в Брестской области / Л.Н. Рудая, С.А. Завада, Ж.И. Тхоревская // Вирусные гепатиты и ВИЧ-инфекция: эпидемиология, диагностика, профилактика, лечение: тез. докл. 2-й междунар. конф. — Минск, 1999. — С. 74–75.

ON THE ONGOING MONITORING AND PICSRIDING THE SPREAD OF HIV-INFECTION IN THE TERRITORY OF BREST REGION

Ginduk N.T., Sadovnikova G.V., Glebko L.V., Rudaya L.N.
Brest Regional Centre for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Brest, Belarus

The data of monitoring and epidemiological screening for HIV infection in the territory of the Brest region are presented. The nature of epidemic process, especially the changes taking into account the time factor is reflected. Characteristic of carried out epidemiological screening, efficiency detection of HIV infection for reasons of testing (codes) is presented. The characteristic features of the development of epidemic process are determined, which in turn will help to control the spread of HIV infection in the region and to prevent the disease spread.

Keywords: HIV infection, monitoring, epidemiological screening, control, prophylaxis, Brest region, Belarus.

Поступила 30.07.2014

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИ, ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ РОТАВИРУСОВ И ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К ВОЗБУДИТЕЛЮ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Гудков В.Г.[1], Виринская А.С.[1], Бискина Н.М.[2], Новацкая Ю.В.[1], Наройчик Л.К.[2], Пашкович В.В.[2], Якубович А.Е.[1], Боган И.Н.[2], Клюйко Н.Л.[3], Зайцева Л.В.[3]
[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;
[2]Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск;
[3]Городская детская инфекционная клиническая больница, Минск, Беларусь

Реферат. Проведен эпидемиологический анализ заболеваемости ротавирусной инфекцией в Республике Беларусь за 2003–2013 гг. Эпидемический процесс носит относительно интенсивный характер с тенденцией к росту со среднегодовым темпом прироста 7,8%, уровень заболеваемости колебался от 20,7 случаев на 100 тыс. населения в 2003 г. до 54,6 — в 2011 г. Изучена генотипическая структура популяции ротавирусов. Доминирующими являлись вирусы с типовой формулой G3P[8] и G4P[8]. Антитела к возбудителю у доноров крови присутствовали более чем в 80% случаев.

Ключевые слова: ротавирусная инфекция, эпидемический процесс, генотипическая структура, популяционный иммунитет, эпидемиологический надзор.

Введение. Согласно данным официальной медицинской статистики, за последние 11 лет (2003–2013 гг.) уровень заболеваемости острыми кишечными инфекциями (ОКИ) в Республике Беларусь колебался от 103,72 случаев на 100 тыс. населения в 2007 г. до 141,61 в 2003 г. С 2008 г. отмечается тенденция к росту заболеваемости с ежегодным темпом прироста 2,4%. В 2013 г. показатель суммарной заболеваемости ОКИ составлял 122,58 случая на 100 тыс. населения республики. На этом фоне в 2013 г. по сравнению с 2003 г. отмечался существенный рост (с 42,3 до 82,4%, $p<0,05$) доли ОКИ установленной этиологии. Это, по-видимому, объясняется улучшением качества лабораторной диагностики и этиологической расшифровки ОКИ вирусной этиологии, а также снижением уровня заболеваемости ОКИ неустановленной этиологии с ежегодным темпом –3,59%. Удельный вес ОКИ, вызванных вирусными агентами (рота-, норо-, энтеровирусы), составил 52% всех случаев ОКИ с установленной этиологией [1]. Приведенные данные в целом свидетельствуют о значительной роли вирусных инфекций в группе ОКИ.

Ротавирусная инфекция (РВИ) занимает ведущее место в структуре группы ОКИ, что обусловлено высокой контагиозностью и устойчивостью возбудителя, огромным количеством экскретируемого лицами вируса, двойным механизмом заражения, естественной восприимчивостью населения и не-

стойким иммунитетом, повторными случаями заболевания и слабым влиянием уровня экономического и санитарно-гигиенического благополучия населения на интенсивность эпидемического процесса [2].

Цель работы — получение данных о характере эпидемического процесса ротавирусной инфекции, генотипической структуре ротавирусов и популяционном иммунитете к возбудителю.

Материалы и методы. При проведении эпидемиологического анализа заболеваемости использовались статистические и аналитические данные компьютерных многоуровневых автоматизированных программ Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья: «Эпидемиологический мониторинг» (АИС «Кодировочные талоны к карте эпидобследования, форма 357/у); «Учет и анализ инфекционной и паразитарной заболеваемости», ведомственной отчетной формы «Сведения о противоэпидемических мероприятиях».

Генотипирование ротавирусов по G-P-типам осуществлялось в научно-инновационной лаборатории РНПЦ эпидемиологии и микробиологии с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) согласно описанной методике [3]. Материалом для исследования служил копроматериал от пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом РВИ, госпитализированных в Детскую инфекционную клиническую больницу г. Минска. В течение 3 лет (2011–2013 гг.) ежегодно исследовалось от 105 до 144 ротавируссодержащих проб с примерно одинаковым количеством в течение каждого месяца. Всего было исследовано 374 изолята ротавирусов.

Популяционный иммунитет к ротавирусам изучался в научно-инновационной лаборатории РНПЦ эпидемиологии и микробиологии путем определения суммарных (общих) антител к возбудителю в сыворотке крови обследуемых лиц методом иммуноферментного анализа в соответствии с описанной методикой [3]. Материалом для исследования служили образцы сывороток крови доноров 3 возрастных групп (24–34, 35–44 и 45–55 лет) из всех регионов республики, в количестве от 180 до 185 образцов из каждого региона.

Результаты и их обсуждение. Эпидемиологический надзор за РВИ, как известно, наиболее эффективно осуществлять путем сочетания популяционного и дозорного эпидемиологического надзора, при этом учет и эпидемиологический анализ заболеваемости, изучение популяционного иммунитета проводится в подсистеме популяционного эпидемиологического надзора, а генотипирование популяции возбудителя целесообразно осуществлять в подсистеме дозорного эпидемиологического надзора [2, 3].

Данные популяционного эпидемиологического надзора о многолетней динамике заболеваемости РВИ в РБ с 2003 по 2013 гг. приводятся на рисунке 1.

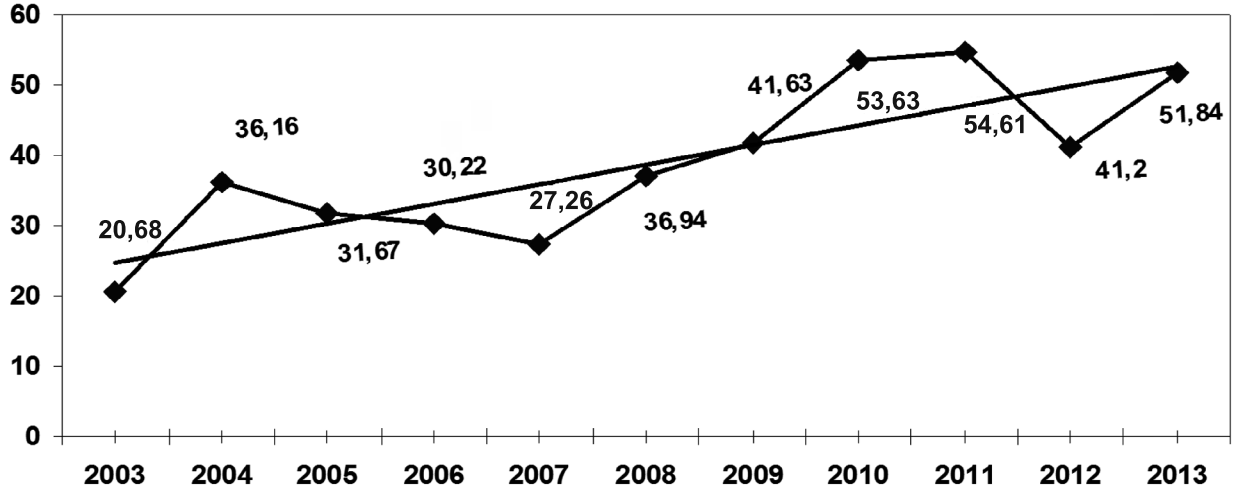


Рисунок 1 — Многолетняя динамика и прямолинейная тенденция заболеваемости РВИ в Республике Беларусь за 2003–2013 гг. (на 100 тыс. населения)

Как следует из рисунка 1, показатель заболеваемости населения в указанный период колебался от 20,7 случаев на 100 тыс. населения в 2003 г. до 54,6 – в 2011 г., эпидемический процесс РВИ имел тенденцию к росту со среднегодовым темпом прироста 7,8%.

На этом рисунке также обозначены два полных эпидемических цикла эпидемического процесса с фазами подъема и спада заболеваемости (с 2004 по 2007 гг. и с 2008 по 2012 гг.). В 2003 г. в фазе спада заболеваемости закончился предыдущий цикл, а в 2013 г. фазой подъема заболеваемости начался очередной эпидемический цикл. Такие относительно короткие эпидемические циклы характерны, как известно, для инфекций, неуправляемых средствами вакцинопрофилактики.

Значимым критерием эпидемиологической оценки эпидемического процесса может служить введенное относительно недавно понятие «базового потенциала» эпидемического процесса. Базовый потенциал эпидемического процесса можно определить как совокупность факторов (условий), обусловливающую минимальную среднегодовую интенсивность эпидемического процесса в эпидемическом цикле, т. е. в фазе спада заболеваемости [4].

Появление дополнительных, стимулирующих эпидемический процесс временно действующих факторов, вызывает циклические подъемы заболеваемости, которая после восстановления баланса в процессе взаимодействия обеих (макро- и микро-) популяций возвращается к базовому уровню. В случае же длительного воздействия стимулирующих эпидемический процесс или угнетающих его факторов базовый потенциал и отражающий его уровень минимальной среднегодовой заболеваемости изменяются, характеризуя наступление нового сбалансированного периода взаимодействия популяций. Поскольку базовый потенциал эпидемического процесса изменяется в динамике, как и сам этот процесс, его динамическая граница может быть достаточно адекватно отражена линией регрессии, рассчитанной по значениям уровней минимальной заболеваемости в фазах ее спада. Отклонение от этой линии (с учетом доверительных границ) значений минимальной заболеваемости свидетельствует о наступлении нового периода эпидемического процесса с измененным в ту или иную сторону базовым потенциалом [4]. Таким образом, в основе этого подхода к периодизации эпидемического процесса лежит признак его однородности по уровню базового потенциала, а по существу — активности основных составляющих эпидемического процесса в совокупности. С этой точки зрения период эпидемического процесса можно определить как один или несколько последовательных эпидемических циклов с одинаковым (существенно не отличающимся) базовым потенциалом [5]. Разработанный на модели вирусного гепатита А указанный подход, по-видимому, является универсальным и, с нашей точки зрения, может быть вполне адекватно использован для анализа эпидемического процесса РВИ.

Анализируя характер эпидемического процесса РВИ с позиций оценки его базового потенциала можно заключить, что в течение 2003–2013 гг. минимальные среднегодовые уровни заболеваемости в фазе спада заболеваемости эпидемических циклов отмечались трижды: 20,7 случаев на 100 тыс. населения в 2003 г., 27,3 — в 2007 г. и 41,2 случая — в 2012 г. Следует также отметить, что уровни базового потенциала этих эпидемических циклов последовательно возрастали, что свидетельствует о наличии в республике постоянно действующих условий, обеспечивающих не только поддержание базового потенциала на достигнутом уровне, но и его рост. О потенциале роста интенсивности эпидемического процесса РВИ и необходимости активизации противоэпидемических мероприятий свидетельствуют и возрастающие в каждом последующем цикле показатели заболеваемости в фазе ее подъема.

Определенное представление о распространенности РВИ в республике дают и результаты изучения иммунитета к возбудителю этой инфекции у доноров крови обоего пола, распределенных на 3 возрастные группы. Результаты этих исследований показаны в таблице.

Таблица — Результаты определения суммарных антител к ротавирусам в сыворотках крови доноров методом иммуноферментного анализа

Возрастная группа (годы)	Наличие суммарных антител к ротавирусам у доноров				Всего исследовано
	Положительный результат		Отрицательный результат		
	Абсолютное значение	%	Абсолютное значение	%	
24–34	359	80,13	89	19,87	448
35–44	329	81,03	77	18,97	406
45–55	361	82,42	77	17,58	438
24–55	1049	81,19	243	18,81	1292

Данные таблицы свидетельствуют о широком распространении серопозитивных лиц среди обследованных возрастных групп населения республики. Уже в возрастной группе доноров 24–34

лет доля серопозитивных лиц превышает 80%, существенно не изменяясь в старших группах. Такая структура популяционного иммунитета, как известно, характерна для инфекций, управляемых с помощью вакцинопрофилактики, или для гиперэндемичных территорий при отсутствии вакцинопрофилактики, что, несомненно, относится к РВИ.

Результаты изучения коллективного иммунитета в других возрастных и социальных группах населения будут представлены позднее.

Данные об удельном весе РВИ в структуре ОКИ установленной этиологии в динамике за 2003–2013 гг. представлены на рисунке 2).

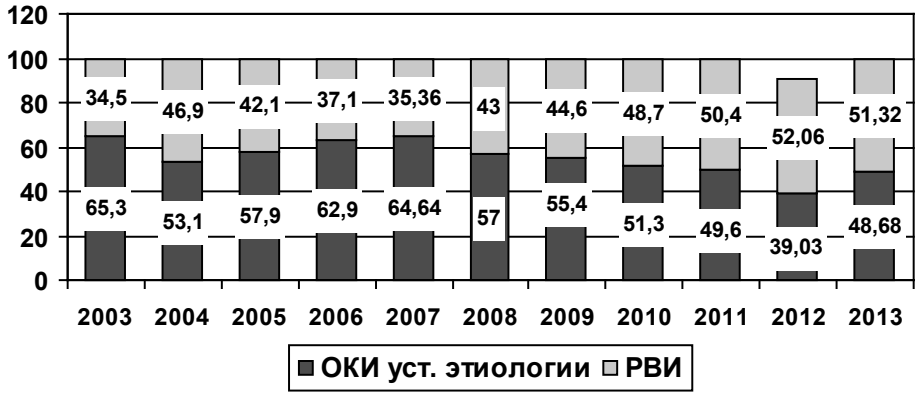


Рисунок 2 — Удельный вес ротавирусной инфекции в структуре ОКИ установленной этиологии в Республике Беларусь за 2003–2013 гг., %

Из приведенных на рисунке 2 данных следует, что доля РВИ в структуре ОКИ установленной этиологии на протяжении 11-летнего периода составляла от 34,5 до 52,06%, не опускаясь ниже 50% в последние 3 года.

Заболеваемость РВИ в республике превышает уровни заболеваемости другими вирусными ОКИ (норо-, адено-, энтеровирусы) вместе взятыми, при этом в 2013 г. удельный вес РВИ составил 88,4% случаев всех ОКИ вирусной этиологии.

На рисунке 3 представлены данные о заболеваемости РВИ в регионах республики в 2012–2013 гг.

Как видно из этого рисунка, уровни заболеваемости в регионах неодинаковы. Наиболее высокие показатели — в г. Минске и Могилевской области, самые низкие — в Минской и Гомельской областях. Удельный вес РВИ в г. Минске и Могилевской области составил 45 и 17,7% всех случаев заболевания в республике.

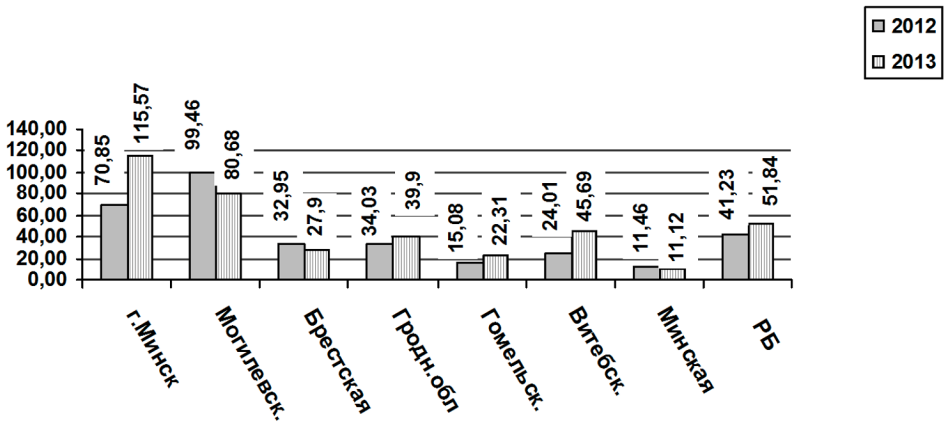


Рисунок 3 — Заболеваемость РВИ в регионах Республики Беларусь за 2012–2013 гг. (на 100 тыс. населения)

Различия уровней регистрируемой заболеваемости на отдельных административных территориях, вероятно, обуславливаются соответствующей организацией лабораторной диагностики и регистрации случаев заболевания.

На рисунке 4 приведены показатели заболеваемости РВИ в республике в 2012-2013 гг. в возрастном разрезе.

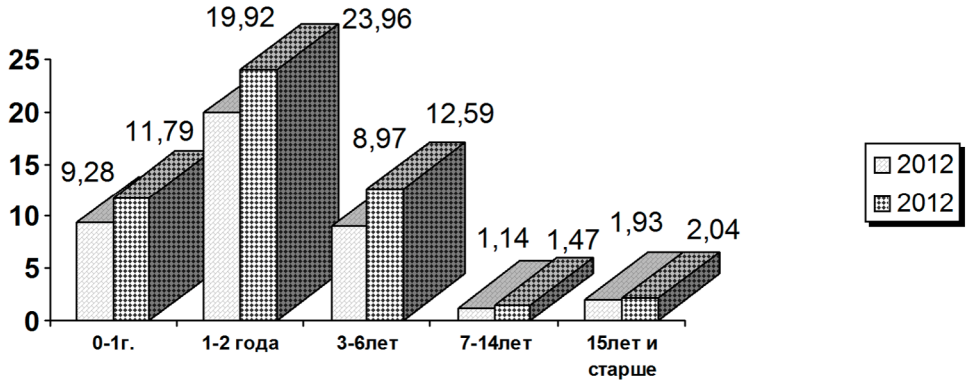


Рисунок 4 — Заболеваемость РВИ в республике за 2012–2013 гг. в разрезе возрастных групп (в стандартизованных показателях на 100 тыс. контингента)

Из приведенных на этом рисунке данных следует, что наиболее уязвимой возрастной группой по заболеваемости РВИ являются дети в возрасте от 0 до 6 лет. Удельный вес этой возрастной группы среди заболевших РВИ лиц в 2013 г. составлял 93,2%.

Максимальные показатели заболеваемости РВИ регистрируются у детей в возрасте от 0 до 2-х лет, минимальные — у детей 7–14 лет и взрослого населения.

В 2012–2013 гг. максимальные показатели заболеваемости РВИ были зарегистрированы у детей в возрасте от 1 года до 2 лет, минимальные — у детей старшей возрастной группы (7–14 лет) и взрослых. Как и в предыдущие годы, в 2012–2013 гг. рост заболеваемости произошел преимущественно за счет активизации эпидемического процесса в возрастных группах детей до 1 года, 1–2 лет и 3–6 лет.

Среди городского населения случаи РВИ регистрируются в 3 раза чаще, чем среди сельского. В 2013 г. по сравнению с 2012 г. показатели заболеваемости среди городского населения республики возросли с 48,09 до 62,10 на 100 тыс. населения, среди сельского населения заболеваемость достоверно не изменилась, составив 19,05 на 100 тыс. населения.

Заболеваемость РВИ носит выраженный сезонный характер. В годовой динамике сезонный подъем заболеваемости РВИ традиционно приходится на декабрь-май, с максимальным уровнем заболеваемости в феврале-марте. Годовая динамика заболеваемости РВИ в 2012–2013 гг. характеризовалась сезонным подъемом в январе-мае с пиком заболеваемости в марте. Степень влияния на заболеваемость сезонных факторов в структуре годовой динамики по сравнению с 2012 г. снизилась с 50,76 до 47,49%. Круглогодичная заболеваемость и сезонный подъем формируются при участии всех возрастных групп населения.

Характер годовой динамики заболеваемости РВИ сельских и городских жителей не имеет заметных различий.

В рамках дозорного эпидемиологического надзора за РВИ в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии осуществлялся молекулярно-эпидемиологический мониторинг за циркулирующей популяцией ротавирусов. В настоящей работе представлены результаты мониторинга за 2011–2013 гг.

В течение 3 лет (2011–2013 гг.) ежегодно исследовалось от 105 до 144 ротавируссодержащих проб от детей, госпитализированных в Минскую детскую инфекционную клиническую больницу с лабораторно подтвержденным диагнозом РВИ. Всего было исследовано 374 ротавируссодержащих пробы, 355 (94,9%) из них по результатам генотипирования отнесено к 5 наиболее распространенным в мире генотипам (G1, G3, G4, G9 в комбинации с [P8], а также G2 с P[4]), 4 (1,07%) — к более редким генотипам (G3P[6], G3P[9], G4P[4]), 10 (2,7%) оказались нетипируемыми, в 5 (1,3%) пробах фекалий присутствовали ротавирусы двух генотипов. Усредненная генотипическая структура изо-

лятов ротавирусов 5 основных G-P генотипов, выделенных в г. Минске в 2011–2013 гг. представлена на рисунке 5.

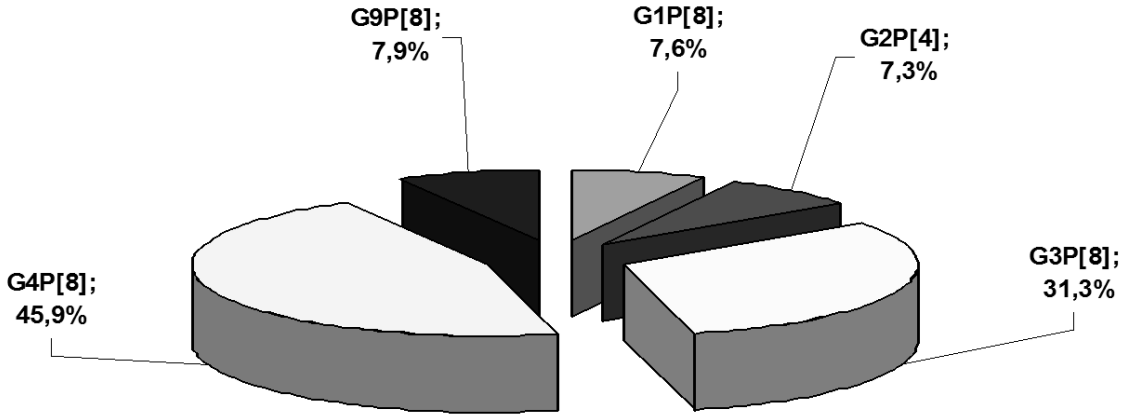


Рисунок 5 — Усредненная генотипическая структура изолятов ротавирусов 5 основных G-P генотипов, выделенных в г. Минске в 2011–2013 гг.

Результаты исследований показали, что удельный вес 5 наиболее распространенных в мире генотипов возбудителя был неодинаковым, как в целом за трехлетний период, так и в отдельные его годы.

В целом за 3-летний период исследований доминирующим в популяции оказался генотип ротавируса с биноминальной формулой G4P[8], его удельный вес составлял 45,9% и существенно превышал значения аналогичного показателя 4 других генотипов. Генотип G3P[8] по своему удельному весу (31,3%) занимал 2-е место и был существенно выше

удельного веса каждого из трех остальных (G1P[8], G2P[4], G9[8]) генотипов возбудителя, не превышавшего 8%.

Генотипическая структура ротавирусов в 2013 г. заметно отличается от структуры изолятов, выделенных в 2011–2012 гг. (рисунок 6).

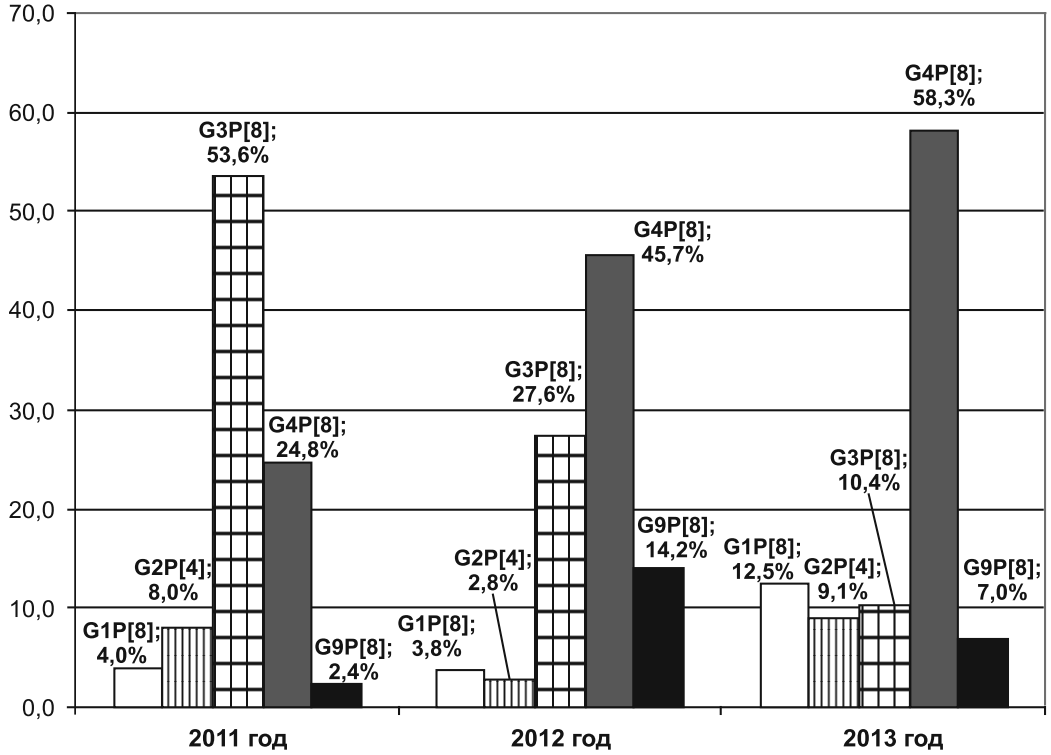


Рисунок 6 — Генотипическая структура изолятов ротавирусов в 2011–2013 гг.: n = 355 (2011 г. — 116, 2012 г. — 99, 2013 г. — 140)

Так, в 2013 г. по сравнению с предыдущим периодом заметно увеличился (до 58,3%) удельный вес ротавирусов с генотипом G4P[8], который снова стал доминирующим, снизился удельный вес ротавирусов с генотипом G3P[8] (до 10,4%). Кроме того, до 12,5% увеличился удельный вес ротавирусов с биноминальной формулой G1P[8]. Считается, что такие изменения типовой структуры популяции ротавирусов являются причиной осложнения эпидемиологической ситуации в отношении РВИ в рассматриваемый период.

На протяжении всего трехлетнего периода абсолютно преобладающим являлся геновариант возбудителя с маркером P[8], его удельный вес в целом за указанный период составлял 90,19%, незначительно отклоняясь от этого значения в отдельные годы.

Доля ротавирусов с генетическими маркерами G3 и G4 в отдельные годы существенно колебалась, однако геноварианты G4 и G3, входящие в состав доминирующих в разные годы генотипов возбудителя, по своему удельному весу в целом за период занимали второе и третье места соответственно, существенно ($P< 0,05$) уступая по этому показателю геноварианту с маркером P[8], входящему в состав обоих доминирующих в указанный период генотипов вируса, и превосходя все его геноварианты с другими маркерами.

Генотипическая структура циркулирующей в г. Минске популяции ротавирусов постоянно изменяется, включая смену доминирующих генотипов возбудителя. На протяжении 2011–2013 гг. доминирующими в популяции являлись ротавирусы с биноминальной формулой генотипа G3P[8] (в 2011 г.) и G4P[8] (в 2012–2013 гг.).

Заключение. Эпидемический процесс РВИ в Республике Беларусь в 2003–2013 гг. сохранял основные закономерности предыдущего периода [6] и продолжил тенденцию к росту. В течение указанных 11 лет отмечена многолетняя цикличность эпидемического процесса и выделены 2 полных эпидемических цикла, различающиеся по величине базового потенциала и соответствующим ему значениям минимальной среднегодовой заболеваемости в фазах спада заболеваемости. Неуклонный рост уровня базового потенциала и уровня заболеваемости в фазах ее подъема на протяжении трех последовательных эпидемических циклов обусловливают потенциал дальнейшего роста интенсивности эпидемического процесса РВИ и необходимость повышения эффективности противоэпидемических мероприятий.

Оценивая в целом эффективность противоэпидемических мероприятий в отношении РВИ можно констатировать, что, несмотря на выраженную интенсивность эпидемического процесса, в республике отсутствуют вспышки инфекции, не зарегистрированы случаи массового внутрибольничного распространения возбудителя. Вместе с тем следует отметить, что характер эпидемического процесса РВИ, полученные ранее данные о значительном бремени РВИ [6], по-видимому, обусловливают целесообразность массового применения средств иммунопрофилактики инфекции.

Изменения генотипической структуры циркулирующей популяции возбудителя в сочетании с другими факторами могут оказывать влияние на интенсивность эпидемического процесса РВИ, их целесообразно учитывать при прогнозировании эпидемиологической ситуации и оценке ожидаемой эффективности иммунобиологических лекарственных средств.

Значимую роль в оценке распространенности инфекции среди различных контингентов населения и эффективности применения иммунобиологических лекарственных средств играет мониторинг популяционного иммунитета населения к возбудителю.

Повсеместное использование разработанной в последние годы в Республике Беларусь передовой системы эпидемиологического надзора за РВИ с подсистемами популяционного и дозорного эпидемиологического надзора, молекулярно-биологического и иммунологического мониторинга [3], обеспеченными отечественными средствами их реализации, наряду с эффективными противоэпидемическими мероприятиями, несомненно, позволят осуществлять эффективный контроль над этой инфекцией.

Литература

1. Эпидемиологическая ситуация по острым кишечным инфекциям, сальмонеллезам и вирусным гепатитам в Республике Беларусь за 2013 год: информ.-аналит. бюл. / Н.М. Бискина [и др.]. — Минск: ГУ РЦГЭиОЗ, 2014. — 34 с.

2. Эпидемиологический надзор за ротавирусной инфекцией в Республике Беларусь / В.Г. Гудков [и др.] // Здравоохранение. — 2011. — № 12. — С. 20–26.

3. Эпидемиологический надзор за ротавирусной инфекцией : инструкция по применению / В.Г. Гудков [и др.]: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 15.12.2011 № 020-1211. — Минск: РНПЦЭМ, 2012. — 39 с.

4. Гудков, В.Г. Актуальные вопросы эпидемиологии вирусного гепатита А и организации эпидемиологического надзора / В.Г. Гудков // Проблемы бактериологии и иммунологии: материалы юбил. науч. конф. (к 80-летию каф. микробиол., вирусол., иммунол. БГМУ). — Минск, 2005. — С. 82–92.

5. Гудков, В.Г. О периодичности и базовом потенциале эпидемического процесса вирусного гепатита А / В.Г. Гудков, А.Г. Мороз // Актуальные проблемы гигиены и эпидемиологии: материалы науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию санитарно-эпидемиологической службы Респ. Беларусь. — Минск, 2006. — С. 400–405.

6. Ротавирусная инфекция в Республике Беларусь: характеристика эпидемического процесса, оценка бремени заболевания и G-P структура популяции возбудителя / В.Г. Гудков [и др.] // Здравоохранение. — 2010. — № 11. — С. 28–33.

CHARACTERISTIC OF ROTAVIRAL INFECTION EPIDEMIC PROCESS, ROTAVIRUS GENOTYPE STRUCTURE, AND POPULATION IMMUNITY IN BELARUS

Gudkov V.G.[1], Virinskaya A.S.[1], Biskina N.M.[2], Novatskaya Yu.V.[1], Naroichik L.K.[2], Pashkovich V.V.[2], Yakubovich A.E.[1], Bogan I.N.[2], Kluiko N.L.[3], Zaitseva L.V.[3]

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

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

[3]Municipal Children Infectious Clinical Hospital, Minsk, Belarus

An epidemiological analysis of the rotaviral infection morbidity in Belarus for the period from 2003 to 2013 has been done. Epidemiological process is relatively intensive with a tendency to increase at an average annual growth rate of 7.8%, the morbidity level ranged from 20.7 cases per 100 thousands of population in 2003 to 54.6 of ones in 2011. Rotavirus population genotype structure has been studied. Viruses with the type formula G3P[8] and G4P[8] were domainant. Antibodies to the agent were revealed in blood by more than 80% donors.

Keywords: rotaviral infection, epidemic process, genotype structure, population immunity, epidemiological surveillance.

Поступила 30.07.2014

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ ВК-ВИРУСОВ

Дедюля К.Л., Землянский В.А., Поклонская Н.В., Богуш З. Ф., Амвросьева Т.В.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. В статье представлены результаты филогенетического анализа ВК-вирусов, идентифицированных у белорусских пациентов в 2014 г. Показана принадлежность исследуемых полиомавирусов к субтипу I, и в частности к субгруппе Ib-2, которая широко распространена на территории Европы.

Ключевые слова: полиомавирус, филогенетический анализ, субтип.

Введение. ВК-вирус — один из представителей рода полиомавирусов, патогенных для человека. Серологические исследования показывают, что более 80% населения во всем мире ВК-серопозитивны [1]. Первичная инфекция протекает бессимптомно, хотя в некоторых случаях может сопровождаться слабыми респираторными проявлениями [1, 2]. Во время первичной инфекции вирус распространяется по организму и остается в латентном состоянии. Основной мишенью персистентной ВК-инфекции являются клетки почек и мочевыводящих путей. У лиц с иммунодефицитом реактивация ВК-вирусной инфекции может приводить к почечной дисфункции в виде полиомавирус-ассоциированной нефропатии (ПВАН) у реципиентов после трансплантации почки или к геморрагическому циститу у реципиентов после трансплантации костного мозга [3, 4].

Основываясь на нуклеотидной вариабельности гена капсидного белка VP1, штаммы ВК-вирусов подразделяются на 4 субтипа (I–IV). По результатам филогенетического анализа, представленного в публикациях авторов из разных стран, можно судить и о географической распространенности того или иного субтипа ВК-вируса. Например, субтип I широко распространен во всех регионах мира, тогда как субтип IV является менее распространенным, а субтипы II и III еще более редки

[5]. При этом субтип I делится на ряд субгрупп (Ia, Ib-1, Ib-2, и Ic). Данные филогенетического анализа изолятов субтипа IV показали его разделение на 6 отдельных субгрупп (IV/a-1, IV/a-2, IV/b-1, IV/b-2, IV/c-1 и IV/c-2) [5].

Следует отметить и различную географическую распространенность субгрупп внутри субтипа I. Так, субгруппа Ia широко распространена в Африке, субгруппа Ib-1 — в Юго-Восточной Азии, в США, Европе, Японии, субгруппа Ib-2 — в Европе и Западной Азии, субгруппа Ic — в Северо-Восточной Азии [6].

Несмотря на активные зарубежные исследования в области молекулярной эпидемиологи ВК-вирусов, данные о субтиповом составе циркулирующих в Республике Беларусь ВК-вирусов отсутствовали до начала настоящих исследований.

Цель работы — генотипирование ВК-вирусов, идентифицированных в клиническом материале белорусских реципиентов почки и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) с клиническими признаками нефропатии.

Материалы и методы. Исследовано 3 образца мочи от 3 пациентов с клинически подтвержденной ВК-вирусной инфекцией, которые были получены из РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я городская клиническая больница» (2 реципиента почки) и РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии (1 реципиент ГСК).

Образцы мочи перед выделением нуклеиновых кислот разводили транспортной средой для проб клинического материала в соотношении 1:1 («Амплисенс», РФ).

Для выделения вирусных нуклеиновых кислот из образцов мочи применяли коммерческий набор «РИБО-сорб» («Амплисенс», РФ) в соответствии с инструкцией производителя.

Для секвенирования участков генома ВК-вирусов использовали 732 нт фрагмент, локализованный в гене VP1, который накапливали с помощью двух пар праймеров: SeqB-7 – SeqB-11 и SeqB-10 – SeqB-13 [6].

Секвенирование участков ДНК проводили методом терминации цепи в термоциклической реакции на ДНК-анализаторе CEQ8000 с использованием коммерческого набора DTCS Quick Start Kit (BECKMAN COULTER). Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в базе данных NCBI с помощью программы BLAST [7]. Для множественного выравнивания полученных нуклеотидных последовательностей и последовательностей из базы данных Entrez использовали алгоритм ClustalW, встроенный в программу MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis), версии 6 [8]. Полученные выравнивания были откорректированы вручную. Определение оптимальной математической модели нуклеотидных замен проводили методом максимального правдоподобия с использованием скорректированного информационного критерия Акаике (AICc). Модель с минимальным значением AICc была выбрана в качестве оптимальной. Для филогенетической реконструкции использовали метод присоединения ближайшего соседа (neighbor-joining, NJ) [8], имплементированный в MEGA 6.0. Достоверность значений генетических расстояний (стандартную ошибку) и топологии филогенетических древ оценивали методом псевдореплик (bootstrap-test). Для оценки достоверности генетических расстояний и топологии каждой дендрограммы анализировали 1000 псевдореплик.

Результаты и их обсуждение. В основе филогенетического анализа человеческих полиомавирусов, и в частности вирусов ВК и JC, лежит секвенирование фрагмента гена, кодирующего капсидный белок VP1 [9]. Секвенирование этого фрагмента, протяженностью 287 п.о., позволяет с высокой достоверностью генотипировать полиомавирусы на генетические субтипы и субгруппы [9]. Для генотипирования ВК-вирусов из клинического материала белорусских пациентов нами использованы две пары праймеров (SeqB-7 – SeqB-11 и SeqB-10 – SeqB-13) [6], позволяющие амплифицировать ген VP1 целиком. Экспериментально определены оптимальные условия амплификации с каждой парой праймеров. Установлено, что оптимальными для всех четырех праймеров были следующие условия: 95° — 20 с, 50° — 45 с, 72° — 10 с, 35 циклов амплификации.

Амплифицированные фрагменты ДНК трех ВК-вирусов секвенированы и отредактированы вручную. Для филогенетического анализа были взяты фрагменты длиной в 732 п.о., включающие в себя вышеупомянутую последовательность в 287 п.о. Полученные регионы проанализированы для определения наилучшего алгоритма генотипирования. Выбор оптимальной модели эволюции проводили с помощью программы MEGA 6.0, в которой рассчитывали значения максимального правдоподобия для 24 математических моделей нуклеотидных замен. При помощи программы были рас-

считаны показатели AICc для сравнения значений максимального правдоподобия для каждой из моделей. Полученные результаты показали, что оптимальной моделью нуклеотидных замен для филогенетической реконструкции на основании нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP1 была 3-параметрическая модель Тамуры. Далее методом NJ была осуществлена филогенетическая реконструкция по исследуемому региону генома. Помимо анализируемых нуклеотидных последовательностей 3 белорусских BK-вирусов в анализ были включены нуклеотидные последовательности 17 штаммов BK-вирусов различных субтипов из Международного генбанка (National Center for Biotechnology Information, NCBI), в т. ч. прототипные штаммы для субтипов I–IV. В качестве внешней группы использовали соответствующие фрагменты генома полиомавируса желтого бабуина.

Полученные результаты показали, что все три исследованных белорусских BK-вируса группировались в общий кластер с прототипным штаммом JL, который относится к субгруппе Ib-2, субтипа I (рисунок).

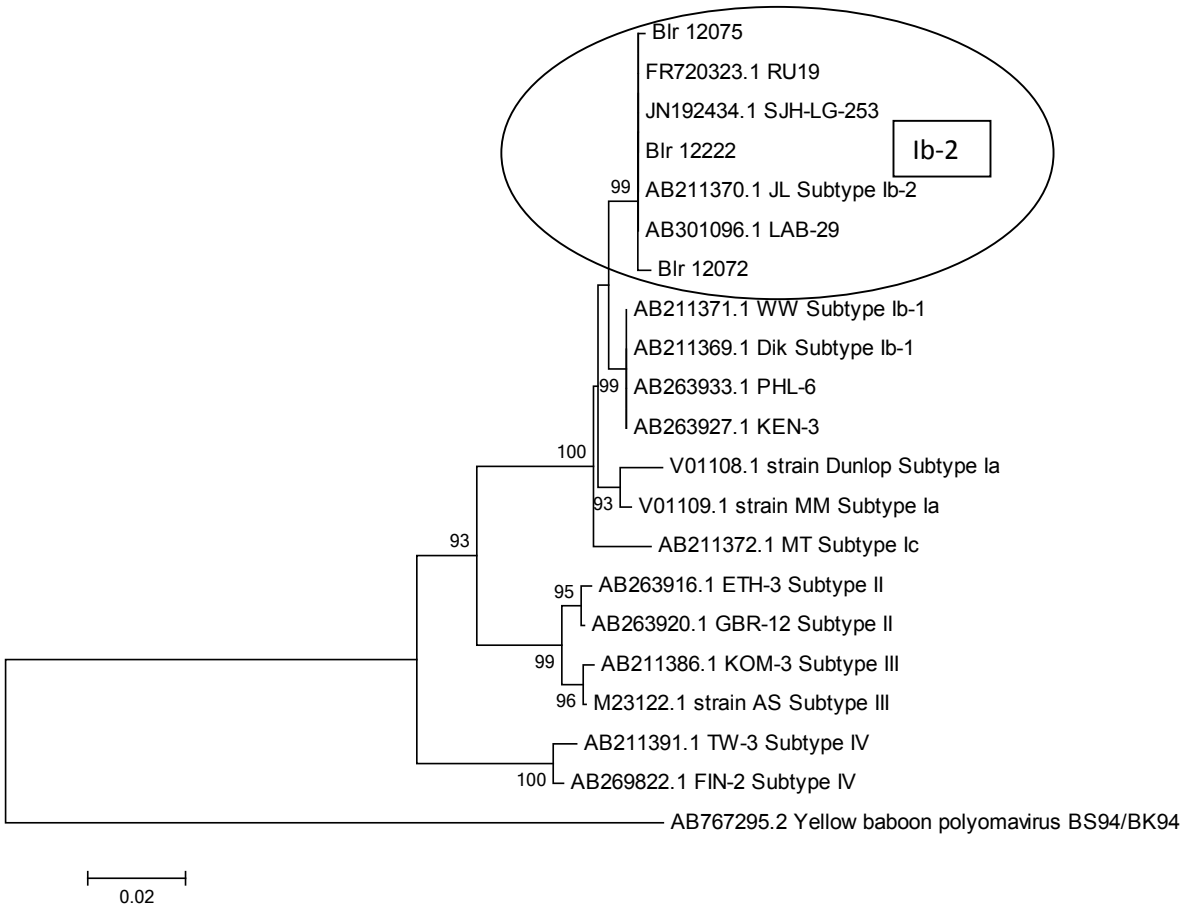


Рисунок — Филогенетическое древо, построенное на основании фрагмента гена VP1 BK-вируса методом NJ. Цифры в узлах древа — значения бутстреп-теста

Значение бутстреп-показателя для кластера, в который вошли исследуемые нуклеотидные последовательности BK-вирусов и прототипный штамм JL, составило 99%, что позволило сделать статистически обоснованный вывод о принадлежности исследуемых нуклеотидных последовательностей к субтипу I, и в частности к субгруппе Ib-2 данного субтипа.

Анализ нуклеотидной последовательности белорусских BK-вирусов при помощи программы BLAST показал, что наиболее близкими к исследуемым полиомавирусам были штаммы, выделенные исследователями из Ирландии (2011 г.), Республики Казахстан (2010 г.) и Японии (2007 г.).

Таким образом, в ходе исследований впервые получены данные, подтверждающие факт активной циркуляции субтипа I BK-вируса на территории Республики Беларусь.

Авторы статьи выражают благодарность к.м.н. Калачику О.В. и Минаковской Н.В. за предоставление клинического материала.

Литература

1. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40 / W.A. Knowles [et al.] // J Med Virol. — 2003. — Vol. 71. — P. 115–123.
2. Hirsch, H.H. Polyomavirus BK / H.H. Hirsch, J. Steiger // Lancet Infect Dis. — 2003. — Vol. 3. — P. 611–623.
3. Reploeg, M.D. BK virus: a clinical review / M.D. Reploeg, G.A. Storch, D.B. Clifford // Clin Infect Dis. — 2001. — Vol. 33. — P. 191–202.
4. Easha, S. Human polyomaviruses: Molecular and clinical epidemiology. / S. Easha, K. Manleyb, M. Gasparovicb // Cell. Mol. Life Sci. — 2006. — Vol. 63. — P. 865–876.
5. Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV)subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race / S. Zhong [et al.] // J. Gen. Virol. — 2009. — Vol. 90. — P. 144–152.
6. Phylogenetic analysis of Polyomavirus BK sequences / P.M. Sharma [et al.] // J. Virol. — 2006. — Vol. 80, № 18. — P. 8869–8879.
7. Basic local alignment search tool / S. Altschul [et al.] // J. Mol. Biol. — 1990. — Vol. 215. — P. 403–410.
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, № 10. — P. 2731–2739.
9. Occurrence of the European subgroup of subtype I BK polyomavirus in Japanese-Americans suggests transmission outside the family / Y. Yogo [et al.] // J. Virology. — 2007. — Vol. 81, № 23. — P. 13254–13258.

GENOTYPING OF BK VIRUSES CIRCULATING IN BELARUS

Dziadziulia K.L., Zemlianski V.A., Paklonskaya N.V., Bogush Z.F., Amvrosieva T.V.

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

The study presents the results of phylogenetic analysis of BK viruses isolated from patients in the Republic of Belarus. These BK viruses belong to subtype I, which is widespread in Europe.

Keywords: polyomavirus, phylogenetic analysis, subtype.

Поступила 15.07.2014

АНАЛИЗ СЛУЧАЕВ ЗАБОЛЕВАНИЯ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ СРЕДИ ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ ЗА ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ СЕЗОНЫ 2012–2013 И 2013–2014 ГГ.

Лапо Т.П., Сивец Н.В., Грибкова Н.В., Шмелева Н.П., Аношко О.Н.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Представлен анализ случаев заболевания респираторно-синцитиальной инфекцией в Республике Беларусь за 2012–2013 и 2013–2014 гг. среди детей, госпитализированных в стационары страны. Для выявления генетического материала респираторно-синцитиального вируса (РС-вируса) использовался метод полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с детекцией в режиме реального времени. За два эпидемических сезона было исследовано 1114 назофарингеальных мазка. РНК РС-вируса была обнаружена в 129 из них. Наибольшее количество положительных образцов получено от детей в возрасте 0–4 года (88% — в 2012–2013 гг. и 91,8% — в 2013–2014 гг. от общего числа положительных образцов).

Ключевые слова: респираторно-синцитиальная инфекция, ОТ-ПЦР, инфекция нижних дыхательных путей.

Введение. Респираторно-синцитиальный вирус является одной из основных причин развития заболеваний нижних дыхательных путей у новорожденных и детей раннего возраста [1].

Впервые РС-вирус выделен в 1956 г. от шимпанзе с симптомами респираторного заболевания и был назван «вирусом насморка обезьян» [2]. В следующем десятилетии вирус получил название респираторно-синцитиального благодаря своему специфическому цитопатическому действию в культуре клеток [3].

Клинически респираторно-синцитиальная инфекция (РС-инфекция) чаще протекает по типу обструктивного бронхита или бронхиолита с признаками дыхательной недостаточности [4].

Исследования, проводимые ранее лабораторией гриппа и гриппоподобных заболеваний РНПЦ ЭМ совместно с УЗ «ГДИКБ», показали, что в последние годы РС-вирус занимает лидирующую по-

зицию в структуре острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) детского населения республики и вносит наибольший вклад в структуру вирусных пневмоний — 46% [5], а в 66,7% случаев служит возбудителем ОРВИ у госпитализированных детей первого года жизни [6]. Группой риска являются как недоношенные дети, так и дети с бронхолегочной дисплазией, хроническими заболеваниями легких, врожденными пороками сердца [7].

Цель работы — анализ случаев заболевания респираторно-синцитиальной инфекцией в Республике Беларусь в эпидемические сезоны 2012–2013 и 2013–2014 гг.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили назофарингеальные мазки, полученные от госпитализированных в дозорные учреждения страны детей в возрасте от 0 до 17 лет с симптомами ОРВИ на протяжении эпидемических сезонов 2012–2013 и 2013–2014 гг. (с 40 по 20-ю календарные недели).

Выявление генетического материала РС-вируса в исследуемых образцах осуществляли методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. В работе использовали диагностический набор «Орви-скрин-FL»(ФБУ НЦНИИ эпидемиологии, Роспотребнадзор, РФ). Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с применением набора «Рибо-сорб», реакцию обратной транскрипции — с набором реагентов «Реверта-L» (производство ФБУ НЦНИИ эпидемиологии, Роспотребнадзор, РФ). Постановку ПЦР проводили на приборе Rotor Gene 6000 (Corbett research, Австралия).

Результаты и их обсуждение. Всего за два рассматриваемых эпидемических сезона было исследовано 1114 образцов (540 — в течение 2012–2013гг. и 574 — в 2013–2014 гг.), полученных от детей всех возрастных групп. Генетический материал РС-вируса был обнаружен в 8,15 и 14,8% случаев от общего количества исследованных образцов за 2012–2013 и 2013–2014 гг. соответственно (таблица).

Вклад в возрастную структуру заболеваемости различных групп детского населения был неравноценным: чаще всего РС-вирус встречался в группе детей от 0 до 4 лет (в 2012–2013 гг. — 88% от общего числа положительных образцов, в 2013–2014 гг. — 91,8%). Нельзя не отметить, что наиболее уязвимы к РС-инфекции были дети первого года жизни (33% и 32,9% от общего числа положительных образцов за каждый период соответственно). Как видно из таблицы, частота выявления вируса в этой группе была самой высокой и составила 14% — в 2012–2013 гг. и 28,3% — в 2013–2014 гг.

Таблица – Частота выявления РС-вируса среди различных возрастных групп детского населения Республики Беларусь

Возрастная группа	2012–2013 гг.		Частота выявления, %	2013–2014 гг.		Частота выявления, %
	Число обследованных	РС		Число обследованных	РС	
До 1 года	100	14	14	99	28	28,3
1–4 года	230	29	12,6	214	43	20,1
5–7 лет	96	0	3,1	125	12	9,6
Старше 7 лет	114	1	0,9	136	2	1,5
Всего	540	44	8,15	574	85	14,8

В течение двух описываемых сезонов наиболее активно вирус циркулировал в зимние месяцы, однако единичные случаи заболеваний встречались также в осенний и весенний периоды (рисунки 1, 2). По сравнению с эпидемическим сезоном 2013–2014 гг., в 2012–2013 гг. активность вируса была ниже, что возможно связано с особенностями циркуляции вируса, которые лучше всего исследовать в многолетней динамике.

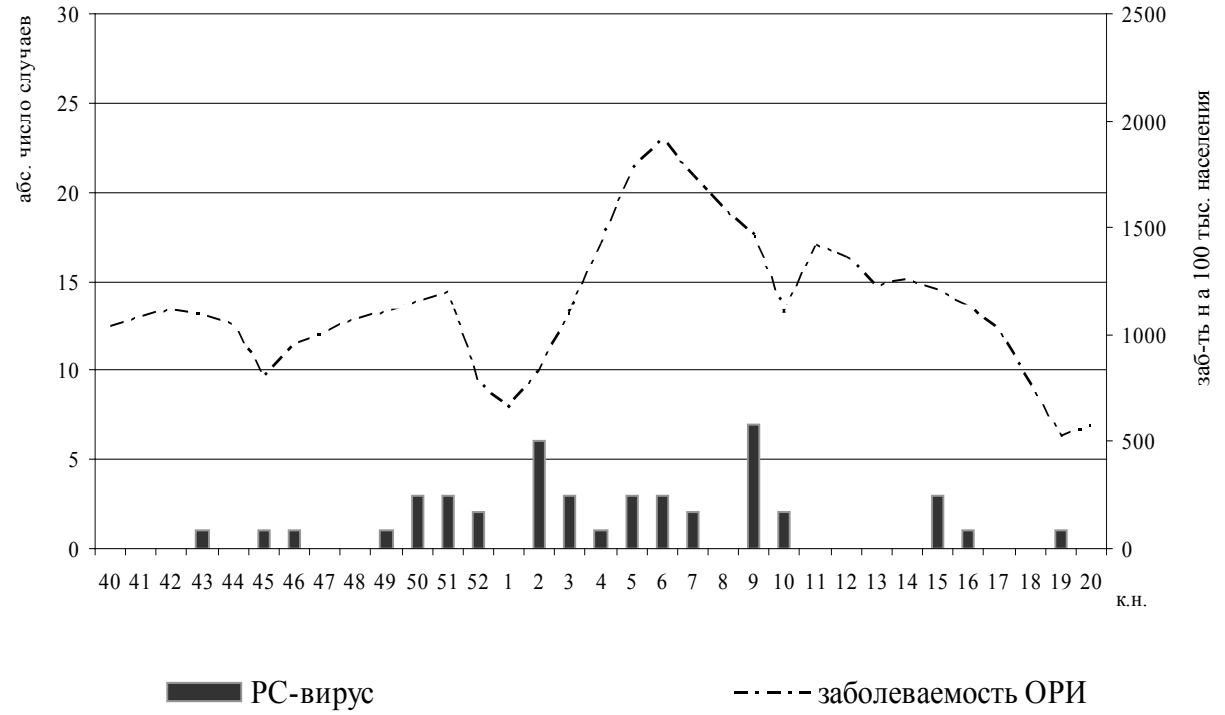


Рисунок 1 — Динамика выявления РС-вируса в эпидемический сезон 2012–2013 гг.

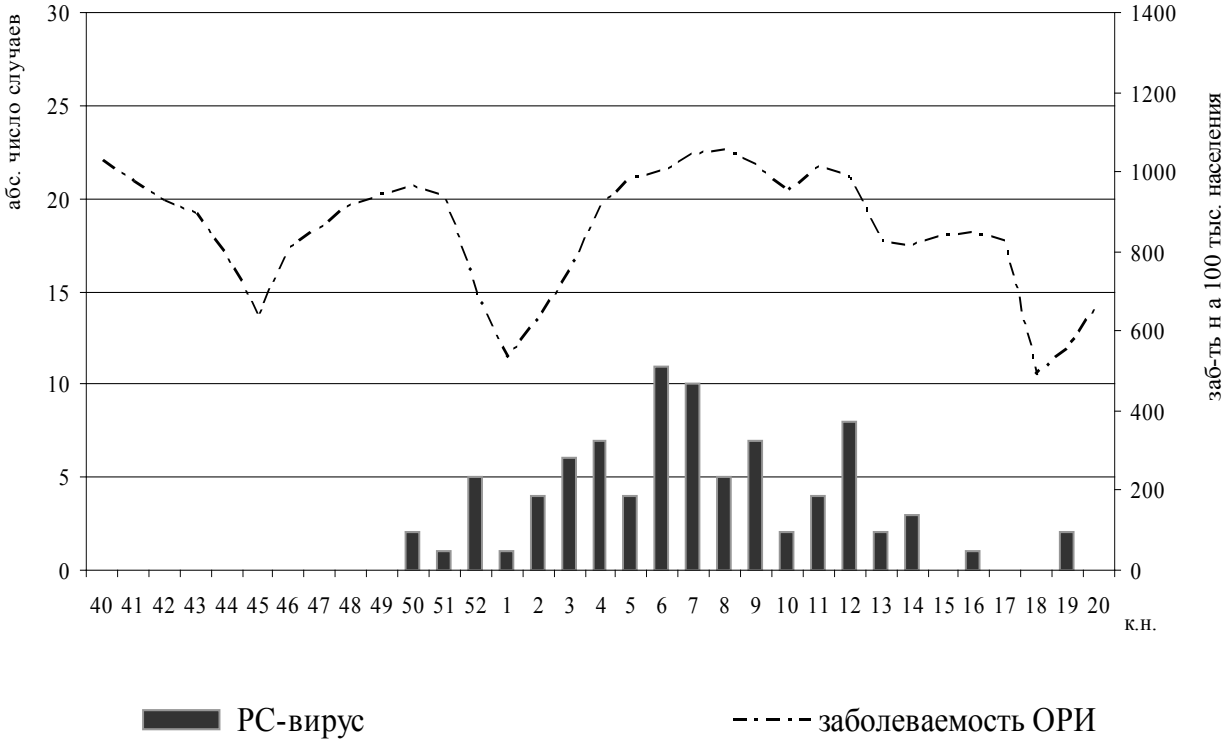


Рисунок 2 — Динамика выявления РС-вируса в эпидемический сезон 2013–2014 гг.

Наибольшее количество положительных образцов в течение двух эпидемических сезонов было выявлено в г. Минске (40,9% от общего числа положительных случаев в 2012–2013 гг., 25,9% — в 2013–2014 гг.), Витебской (29,5% — в 2012–2013 гг., 24,7% — в 2013–2014 гг.) и Гомельской областях (11,4 и 20% соответственно) (рисунок 3).

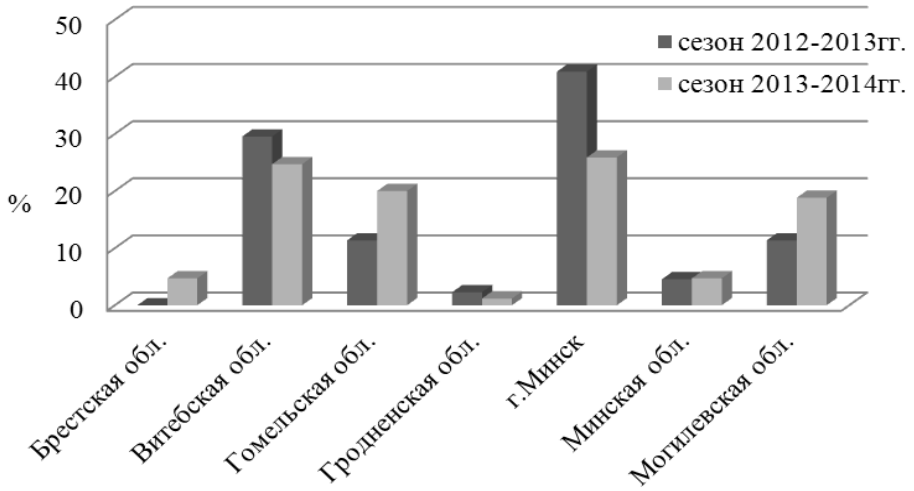


Рисунок 3 — Распределение случаев РС-инфекции на территории Республики Беларусь в эпидемические сезоны 2012–2013 и 2013–2014 гг.

Заключение. В течение данного периода РС-вирус циркулировал на всей территории страны. Частота выявления генетического материала составила 8,15 и 14,8% соответственно. Увеличение практически в 2 раза числа случаев заболевания в эпидемический сезон 2013–2014 гг. дает возможность предположить наличие особенностей циркуляции вируса, для выявления которых необходимы дальнейшие длительные исследования. Заболевания РС-инфекцией встречаются преимущественно в зимний период. Больше всего действию возбудителя подвержены дети от 0 до 4 лет.

Продолжение дальнейших мониторинговых исследований позволит установить особенности циркуляции вируса на территории Республики Беларусь, а также уточнить группы и факторы риска.

Литература

1. Hall, C.B. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus / C.B. Hall // N. Engl. J. Med. — 2001. — P. 1917–1928.
2. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza / J.A. Morris [et al.] // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1956. — P. 544–594.
3. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA) / R. Chanok [et al.] // Am. J.Hyg. — 1957. — P. 281–290.
4. Современные клинические особенности РС-инфекции у детей / Т.В. Лобанова [и др.] // Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики у детей: материалы VIII Конгр. детских инфекционистов России, Москва, 16–18 дек. 2009 г. / М., 2009. — С. 76–77.
5. Сергиенко, Е.Н. Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция у детей / Е.Н. Сергиенко, И.Г. Германенко // Мед. журн. — 2010. — № 2. — С. 22–27.
6. Грипп и респираторно-синцитиальная инфекция у детей в эпидемический сезон 2009–2010 гг. в Республике Беларусь / Е.Н. Сергиенко [и др.] // Мед. панорама. — 2011. — № 2. — С. 3–7.
7. Аденовирусная и респираторно-синцитиальная инфекции: клинико-иммунологическая характеристика / Ю.А. Климова [и др.] // Актуальные вопросы инфекционной патологии: материалы Междунар. Евро-Азиатского конгр. по инфекционным болезням, Витебск, 5–6 июня 2008 г. / Ред. В.М. Семенов. — Витебск, 2008. — С. 92–93.

ANALYSIS OF CASES OF RESPIROTARY-CYNCYTIAL INFECTION AMONG CHILDREN IN BELARUS DURING EPIDEMIC SEASONS 2012–2013 & 2013–2014

Lapo T.P., Sivets N.V., Shmialiova N.P., Anoshka O.N.

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

Respiratory syncytial virus (RSV) is the major cause of lower respiratory tract infection in infants and young children**.** During two epidemic seasons RSV was identified by RT-PCR in 129 of 1114 specimens (12%) obtained from hospitalized children from 7 regions of Belarus. The rate of RSV among children under 4 years was 13% in 2012–2013 and 24.9% in 2013–2014.

Keywords: respiratory syncytial virus, RT-PCR, lower respiratory tract infection.

Поступила 09.07.2014

ОБРАЗ И КАЧЕСТВО ЖИЗНИ ЛИЦ ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА И ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Мамчиц Л.П.

Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Реферат. Острые респираторные инфекции (ОРИ) и грипп являются наиболее распространенной патологией населения и одной из важнейших проблем здравоохранения во всех странах мира. В эпидемический процесс ОРИ и гриппа вовлекаются все возрастные группы населения. Изучены условия, образ жизни и качество жизни лиц пожилого и старческого возраста, часто болеющих и ни разу не болевших ОРИ в течение жизни. Доля пожилых людей, ни разу не болевших ОРИ в течение года, составила 16,7%. Учет эпидемической значимости пола, возраста, образа жизни, отношения к профилактике заболеваемости ОРИ позволяет адаптировать профилактические мероприятия к конкретным группам населения.

Ключевые слова: острые респираторные инфекции, заболеваемость, лица пожилого и старческого возраста, образ жизни, качество жизни.

Введение. Острые респираторные инфекции и грипп являются наиболее распространенной патологией населения и одной из важнейших проблем мирового здравоохранения [1, 2]. По данным ВОЗ, во всем мире на ОРИ приходится 8,2% общих потерь трудоспособности и смертности. По отношению к сумме ущерба от наиболее распространенных инфекционных болезней потери от ОРИ и гриппа составляют 80% [3]. Заболеваемость ОРИ и гриппом характеризуется очень высокой социальной значимостью. По данным зарубежных авторов, одной из трех главных причин смерти у людей в мире являлись инфекционные болезни, а в числе семи наиболее важных из них названы ОРИ и грипп [4].

Значительный социально-экономический ущерб обусловлен не столько эпидемиями гриппа, вызывающими огромный общественный и научный резонанс, сколько высокой заболеваемостью всем комплексом ОРИ в течение года.

В эпидемический процесс ОРИ и гриппа вовлекаются все возрастные группы населения. Результаты изучения распространенности ОРИ у лиц старше 60 лет показали, что в среднем в год на каждого из них приходится 1,2 случая заболевания [5].

Известно, что часть людей редко болеет ОРИ. Около 10% взрослых вообще не болеют гриппом и ОРИ. Современные исследования показали, что это в значительной мере зависит от соотношения антигенов главного комплекса гистосовместимости, определяющих общий генетический статус организма. Вопрос о том, какими конкретными механизмами обусловливается эта зависимость, пока изучен недостаточно [2].

Среди не болевших ОРИ лиц 22,7±5,7% считали, что имеют хорошее здоровье от природы; 28,3±6,4% использовали специальные меры профилактики [7]. Ни разу не болевшие гриппом и ОРИ лица чаще используют закаливающие мероприятия в качестве профилактического средства в период эпидемии гриппа, чем часто болеющие (соответственно 11,3±4,3 и 3,1±1,5%, $p<0,1$). В группе ни разу не болевших мужчины достоверно чаще регулярно занимаются спортом, чем женщины (24,1±4,6 и 4,2±2,2%, $p<0,05$).

Одним из методов получения информации в эпидемиологических исследованиях является стандартизованный опрос населения, основу которого составляют предварительно разработанные вопросники или анкеты. Социологические исследования дают дополнительную более углубленную информацию, широко применяемую в здравоохранении при изучении состояния здоровья населения [6].

Цель работы — изучение условий, образа и качества жизни лиц пожилого и старческого возраста, часто болеющих и ни разу не болевших ОРИ в течение жизни.

Материалы и методы. Проведено социологическое исследование по изучению образа и качества жизни лиц пожилого и старческого возраста, проживающих в Гомельском регионе. В исследовании приняло участие 120 человек в возрасте 60 лет и старше, из них 67 респондентов (55,8%) составили лица пожилого возраста (60–74 года), 45 (37,5%) — старческого возраста (75–89 лет), 8 человек (6,7%) — 90 лет и старше. После разъяснения целей и задач исследования опросник SF-36 и

специальная анкета заполнялись респондентом самостоятельно или проводилось интервьюирование специально обученным человеком.

Исследование проводилось в 2 этапа. На первом этапе с помощью специально разработанной анкеты изучалась информация об условиях и образе жизни опрошенных. Анкета состояла из нескольких блоков и включала демографические характеристики (пол, возраст, занятость, образование, семейный статус), а также вопросы, дающие информацию об условиях жизни и частоте обращаемости за медицинской помощью, о состоянии здоровья, заболеваемости инфекционными болезнями, наличии хронической патологии. На втором этапе изучалось качество жизни лиц старше 60 лет с помощью «SF-36 Health Status Survey». SF-36 относится к неспецифическим опросникам для оценки качества жизни (КЖ), он широко распространен в США и других странах мира. Все 36 пунктов опросника сгруппированы в восемь шкал: 1) физическое функционирование (ФФ); 2) ролевое физическое функционирование (РФФ); 3) боль (Б); 4) общее здоровье (ОЗ); 5) жизнеспособность (Ж); 6) социальное функционирование (СФ); 7) эмоциональное функционирование (ЭФ); 8) психическое здоровье (ПЗ). Все шкалы опросника объединены в 2 суммарных измерения — физический компонент здоровья (ФК, 1–4 шкалы) и психический (ПК, 5–8 шкалы). Результаты представлены в виде оценок в баллах в пределах от 0 до 100 [9].

Сравнение средних величин в группах, различающихся по полу, возрасту, образованию и другим параметрам, осуществляли методами непараметрической статистики, т. к. при использовании номинальных данных распределение в сравниваемых группах не было нормальным. Для сравнения несвязанных выборок использовали тест Манна–Уитни. Различие между средними значениями считали достоверным при $p<0,05$.

Для оценки распространенности ОРИ в различных группах респондентов рассчитывали показатель частоты случаев (ПЧС), используя формулу:

$$ПЧС = \frac{А}{Б} \times 100\%,$$

где *А* — число пациентов (если в течение года респондент болел ОРИ не один, а 2–3 раза и более, то он учитывался как один пациент);

Б — число респондентов определенной группы.

Результаты и их обсуждение. Предыдущие исследования в нашей стране показали, что доля лиц, не болеющих ОРИ ни разу в течение года, находится на уровне 11,1% от всего населения [7, 8]. Среди мужчин гораздо чаще, чем среди женщин, встречаются лица, ни разу не болеющие ОРИ в течение года (18,1±2,3 и 6,1±1,3%; $p<0,05$). Суммарно ОРИ были выявлены у 93,9±1,3% женщин и 81,9±2,3% мужчин ($p<0,05$).

Удельный вес лиц, ни разу не болевших в течение года ОРИ, в различных возрастных группах колебался в пределах от 8,98 до 19,0% [8].

Среди лиц, не болеющих ОРИ, наиболее высокий удельный вес здоровых выявлен у лиц со средним образованием, а самый низкий — у лиц с высшим образованием (соответственно 14,8±2,9 и 8,5±2,0%; $p<0,05$). Достоверно меньшее число не болеющих ОРИ в группе лиц с высшим образованием, в сравнении с группой со средним образованием, в определенной мере связано с превалированием в первой группе женщин (составляют 57,2% от общей численности группы), которые чаще болеют ОРИ.

Когда человек встречается с новым и непонятным, непривычным для себя явлением, у него, возможно, появляется чувство страха. Часто болеющие ОРИ чаще опасаются заболеть, чем неболевшие (соответственно 28,4±3,8 и 9,4±2,2%, $p<0,01$). Женщины более чем в 2 раза чаще мужчин опасаются заболеть гриппом (соответственно 30,6±2,9 и 11,1±1,9%, $p<0,01$). В зависимости от рода занятий чаще опасаются заболеть пенсионеры (50%).

При изучении заболеваемости ОРИ среди людей пожилого и старческого возраста установлено, что доля лиц, ни разу не болевших ОРИ в течение жизни, составила 16,7%. В этой группе было больше мужчин, чем женщин (24,4 и 12,0 соответственно). В группе лиц, часто болеющих ОРИ, удельный вес женщин выше (37,3 и 24,4% соответственно, таблица 1).

Таблица 1 — Распределение респондентов, болеющих и не болеющих ОРИ в зависимости от пола

Лица пожилого и старческого возраста	Болеющие ОРИ				Неболевшие ОРИ		Всего, n = 120	
	Группа I (болеющие ОРИ 1 раз в год, n = 60)		Группа II (часто болеющие ОРИ, n = 40)		Группа III (n = 20)			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Мужчины	23	51,2	11	24,4	11	24,4	45	100,0
Женщины	38	50,7	28	37,3	9	12,0	75	100,0
Всего	61	50,8	39	32,5	20	16,7	120	100,0

Известно, что до 50% всех заболеваний связано с образом жизни. Одним из наиболее значимых факторов, влияющих на состояние здоровья человека, является питание. Недостаток в пище белков и витаминов часто сопровождается подавлением функций иммунной системы, что влияет на повышение восприимчивости к возбудителям ОРИ. Результаты опроса показали, что только 16,7% респондентов имеют разнообразное питание с необходимым набором продуктов, обеспечивающих сбалансированность рациона. Строго придерживаются режима питания 16,7% респондента, не всегда соблюдают — 61,7%, не соблюдают — 21,6%. Среди лиц пожилого и старческого возраста, ни разу не болевших ОРИ, удельный вес несоблюдающих режим и рациональность питания, меньше, чем в группе часто болеющих лиц (15,0 и 23,1% соответственно, таблица 2).

Таблица 2 — Распределение респондентов в зависимости от характера питания

Респонденты	Болеющие ОРИ				Неболевшие ОРИ		Всего, n = 120	
	группа I (болеющие ОРИ 1 раз в год, n = 60)		Группа II (часто болеющие ОРИ, n = 40)		группа III (n = 20)			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Соблюдают режим питания	13	65,0	3	15,0	4	20,0	20	100,0
Нерегулярно соблюдают	34	45,9	27	36,5	13	17,6	74	100,0
Не соблюдают режим питания	14	53,8	9	34,6	3	11,5	26	100,0
Всего	61	50,8	39	32,5	20	16,7	120	100,0

У лиц пожилого и старческого возраста пищевой статус контролируется, в первую очередь, по индексу массы тела (ИМТ), клиническим проявлениям микронутриентной недостаточности и другим показателям. Результаты исследования показали, что 43,3% респондентов пожилого и старческого возраста имеют избыточный пищевой статус (ИМТ 25,1–30,0), 35,0% — страдают ожирением (ИМТ более 30,0). Среди лиц, не болевших ОРИ, статистически значимо меньший удельный вес людей с избыточной массой тела (35,8 и 53,8% соответственно), чем в группе часто болеющих ОРИ (таблица 3).

Таблица 3 — Распределение респондентов, болеющих и не болеющих ОРИ с учетом ИМТ

Респонденты	Болеющие ОРИ				Неболеющие ОРИ		Всего, n = 120	
	группа I (болеющие ОРИ 1 раз в год, n = 60)		Группа II (часто болеющие ОРИ, n = 40)		группа III (n = 20)			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ИМТ = 18–25	17	65,3	4	15,4	5	19,2	26	100,0
ИМТ = 25,1–30	24	46,1	21	40,4	7	13,5	52	100,0
ИМТ >30	20	47,6	14	33,3	8	19,4	42	100,0
Всего	61	50,8	39	32,5	20	16,7	120	100,0

Формирование иммунитета к возбудителям острых респираторных инфекций происходит практически в течение всей жизни человека. В защитных реакциях организма участвуют анатомические и физиологические защитные приспособления различной природы, факторы, регулирующие неспецифическую резистентность, и факторы специфического иммунитета. Интересно отметить тот факт, что в группе лиц, ни разу не болевших ОРИ, 60,0% указали на то, что не имели в анамнезе перенесенных инфекционных заболеваний, включая и детские инфекции, в группе часто болеющих не имели инфекционную патологию 5,1% опрошенных (таблица 4).

Таблица 4 — Распределение респондентов, болеющих и не болеющих ОРИ с учетом перенесенных инфекций

Респонденты	Болеющие ОРИ				Не болеющие ОРИ		Всего, n = 120	
	группа I (болеющие ОРИ 1 раз в год, n = 60)		Группа II (часто болеющие ОРИ, n = 40)		группа III (n = 20)			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Имели в анамнезе инфекции	53	54,1	37	37,7	8	8,2	98	100,0
Не имели в анамнезе инфекции	8	36,4	2	9,1	12	54,5	22	100,0
Всего	61	50,8	39	32,5	20	16,7	120	100,0

Изучение качества жизни является общепринятым в международной практике высокоинформативным, чувствительным и экономичным методом оценки состояния здоровья как населения в целом, так и отдельных социальных групп. Метод позволяет дать количественную оценку физического, психологического и социального функционирования организма человека. Показатели качества жизни выше по всем шкалам опросника у лиц пожилого и старческого возраста, ни разу не болевших ОРИ, чем показатели качества жизни у часто болеющих ОРИ. Статистически значимы эти различия по шкалам физического функционирования ФФ (61,7 и 48,6 соответственно) и общего здоровья ОЗ (51,3 и 41,7 соответственно). По сравнению с часто болеющими ОРИ также значимы различия и по шкале жизнестойкости Ж (76,1 и 66,0 соответственно, рисунок).

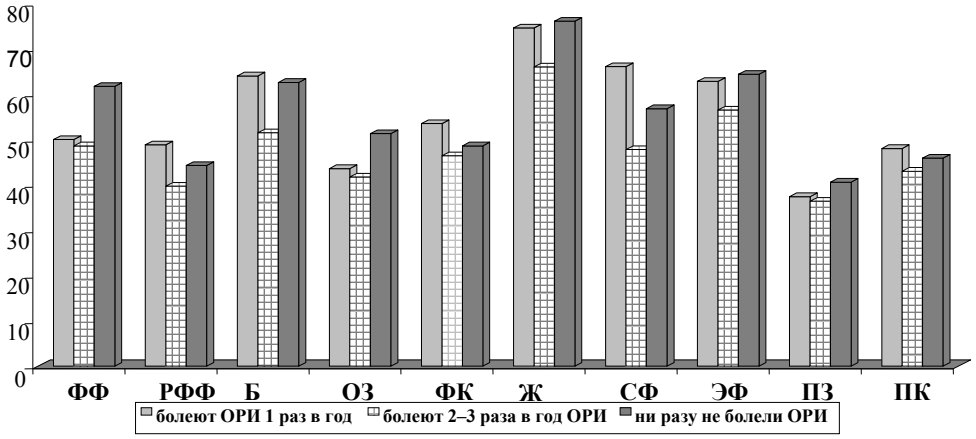


Рисунок — Показатели качества жизни лиц, болеющих и не болевших ОРИ

Заключение. В профилактической работе следует учитывать, что среди лиц пожилого и старческого возраста выявляются те, кто ни разу в течение года не болел ОРИ, а также часто болеющие этими заболеваниями. Данные группы населения представляют особый интерес и заслуживают проведения дальнейшей работы по установлению наиболее типичных характеристик, которые позволяют представителям одной группы избегать заболевания ОРИ, а другой — часто болеть ими. Учет эпидемической значимости пола, возраста, профессии, образа жизни, отношения к профилактике заболеваемости ОРИ позволяет адаптировать профилактические мероприятия к конкретным группам населения.

Литература

1. Инфекционная заболеваемость на территории Беларуси в конце XIX, в XX веке и проблемы борьбы с инфекционной патологией в XXI столетии / Л.П. Титов [и др.] // Роль антропогенных и природных патогенов в формировании инфекционных и неинфекционных болезней человека. Медико-экологические аспекты: материалы Междунар. конф., Минск, 8–9 окт. 2002 г. / НИИ эпидемиологии и микробиологии; редкол. Л.П. Титов [и др.]. — Минск: НЕССИ, 2002. — С. 3–25.
2. Карпухин, Г.И. Диагностика, профилактика и лечение острых респираторных заболеваний / Г.И. Карпухин, О.Г. Карпухина. — СПб.: Гиппократ, 2000. — 179 с.
3. Шаханина, И.Л. Грипп и острые респираторные заболевания — приоритетная социально-экономическая проблема здравоохранения / И.Л. Шаханина // Вакцинопрофилактика гриппа: информ. сб. — 2-е изд., доп. — М., 1998. — С. 10–17.
4. To assess the incidence of acute respiratory infections and bacterial colonization in children attending a daycare center / E. Nandi-Lozano [et al.] // Salud Publica Mex. — 2002. — Vol. 44, № 3. — P. 201–206.
5. McCaig, L.F. National Hospital Ambulatory Medical Care Survey 1996 emergency department summary / L.F. McCaig, B.J. Stussman // Adv. Data. — 1997. — Vol. 17, № 293. — P. 1–20.
6. Сибурика, Г.А. Современное состояние социологических исследований в медицине и здравоохранении: Обзорная информация / Г.А. Сибурика // Медицина и здравоохранение. — Вып. 2. — М.: НПО «Союзмединформ», 1990. — 78 с.
7. Мамчиц, Л.П. Острые респираторные заболевания по данным анкетирования / Л.П. Мамчиц, Г.Н. Чистенко // Мед. новости. — 1999. — № 7. — С. 48–50.
8. Мамчиц, Л.П. Острые респираторные заболевания по данным стандартизованного опроса населения Гомеля / Л.П. Мамчиц, Г.Н. Чистенко // Инфекция и иммунитет: материалы Респуб. науч.-практ. конф. — Минск, 1999. — С. 103–110.
9. SF-36 Health Survey: manual and interpretation guide / J.E. Ware [et al.]. — Boston: New England Medical Center, 1993.

LIFESTYLE OF ELDERS AND ACUTE RESPIRATIONAL INFECTIONS MORBIDITY

Mamchits L.P.

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Acute respirational infections (ARD) and influenza are the most common pathology in population and one of the most important problems of health organizations around the world. The epidemiological process of ARD and influenza overwhelms all age groups of population. This study regards the circumstances and lifestyle of seniors who frequently suffer from respirational infectious diseases. The share of seniors who have never suffered from ARD in year — 16.7%. The epidemiological significance of gender, age, profession, lifestyle, acquiring of methods of profilaxicy allows us to adaptate adequate preventive procedures regarding specific population groups.

Keywords: acute respirational diseases, morbidity, senors and elders, lifestyle, life quality.

Поступила 09.07.2014

СИКВЕНС-ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ВИРУЛЕНТНЫХ ГЕНОВ ШТАММОВ *BORDETELLA PERTUSSIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В БЕЛАРУСИ

Мартынов В.С., Колодкина В.Л.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Коклюш является воздушно-капельной инфекцией, управляемой средствами специфической вакцинопрофилактики. Однако, несмотря на 50-летнюю массовую иммунизацию детского населения, коклюш до сих пор остается одной из причин младенческой смерти во всем мире и продолжает быть проблемой здравоохранения даже в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками. Проведен молекулярно-генетический анализ структуры генов *ptxA, ptxC,* кодирующих S1 субъединицу А-комплекса и S3 субъединицу В-комплекса коклюшного токсина (КТ), гена *prn*, кодирующего пертактин, гена *tcfA*, кодирующего фактор колонизации трахеи, *B. pertussis*, выделенных от пациентов с коклюшем. На основании идентификации аллельного профиля и определения сиквенс-типа каждого штамма все штаммы *B. pertussis* относились к сиквенс-типу MLST-5, которому соответствовал *ptxA*(1), *ptxC*(2), *tcfA*(2) аллельный профиль в соответствии с международным протоколом. Проведено сопоставление структуры *prn* гена, кодирующего пертактин, и сиквенс-типа циркулирующих штаммов. За исключением одного все штаммы *B. pertussis* имели одинаковую

структуру гена пертактина — *prn2* аллель. Таким образом, в нашей стране в популяции штаммов *B. pertussis*, циркулирующих в 2009–2013 гг., доминируют штаммы MLST-5, несущие *prn2* аллель гена пертактина. Штаммы *B. pertussis* MLST-5, преимущественно ассоциирующие с *prn2* аллелью гена пертактина, представляют новый преуспевающий клон, который успешно циркулирует во многих странах, несмотря на интенсивную вакцинацию против коклюша.

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

Введение. В нашей стране специфическая массовая иммунизация детского населения АКДС-вакциной, введенная в широкую практику в 1958–1960 гг., привела к резкому снижению заболеваемости, летальности и уменьшению тяжести течения коклюша. Однако, несмотря на очевидные успехи проводимой массовой иммунизации детского населения и высокий уровень охвата профилактическими прививками, до настоящего времени сохраняются подъемы и спады заболеваемости как за счет непривитых, так и привитых лиц. Увеличилась заболеваемость детей школьного возраста. Регистрируется высокая заболеваемость детей раннего возраста с тяжелым течением заболевания [1].

Детальный анализ штаммов *B. pertussis,* циркулирующих в ряде стран Европы, показал, что рост заболеваемости коклюшем в этих странах в 90-е гг. ассоциировал с широким распространением и доминированием в популяции штаммов *B. pertussis,* относящихся к сиквенс-типам MLST-4 или MLST-5 [2].

Цель работы — идентификация сиквенс-типов изолятов *B. pertussis,* ассоциированных со случаями коклюша, регистрируемыми в Республике Беларусь в 2009–2013 гг.

Материалы и методы. Проведен молекулярно-генетический анализ структуры четырех генов (*ptxA, ptxC,*, гена *prn*, гена *tcfA*) у 15 образцов ДНК *B. pertussis* (10 — изолированных из штаммов и 5 — непосредственно из носоглоточных мазков).

Амплификацию генов в ПЦР проводили в соответствии с рекомендациями Mooi F. et al. (1998, 2000) и Packard E.R. et. al. (2004) с модификацией реакционной смеси [3–5].

Секвенирование нуклеиновых кислот проводили на обеих цепях ДНК с использованием тех же праймеров, что и для амплификации.

Результаты и их обсуждение. При секвенировании гена *ptxA*, кодирующего А-комплекс коклюшного токсина (КТ), обнаружены 2 варианта последовательности нуклеотидов. Один вариант, согласно GenBank, соответствовал аллелю гена *ptxA* — *ptxA1* (AJ245366). Второй вариант отсутствовал в GenBank, но согласно Mooi F.R. (2010), соответствовал аллелю гена *ptxA* — *ptxA3.* Среди анализируемых ДНК *B. pertussis* 94,1% штаммов несли *ptxA1* аллель гена.

Секвенирование фрагмента гена *ptxC*, кодирующего S3 субъединицу В-комплекса КТ, показало, что все штаммы *B. pertussis* имели один вариант последовательности нуклеотидов, который соответствовал в базе данных генотипов EMBL/GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez) *ptxC2* аллелю гена.

По структуре гена *prn,* кодирующего пертактин, анализируемые ДНК соответствовали одному из двух выявленных аллелей — *prn1* (AJ011091)*, prn2* (AJ011092), согласно EMBL/GenBank. Аллель гена *prn2* отличалась от *prn1* аллели количеством и разным сочетанием двух видов повторов длиной из пяти аминокислот (GGAVP и GGFGP) в первом регионе гена. Большинство анализируемых штаммов 94,1% имели *prn2* аллель гена.

При секвенировании гена *tcfA,* кодирующего фактор колонизации трахеи, (между основаниями 578–1032 в соответствии с U16754) выявлен один вариант последовательности нуклеотидов, который соответствовал в базе данных генотипов EMBL/GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez) *tcfA2* аллелю гена.

На основании результатов секвенирования генов проведена идентификация аллельного профиля и определение сиквенс-типа (MLST) каждого штамма. На основании антигенной изменчивости трех генов (*ptxA, ptxC, tcfA*) в мире идентифицировано 11 сиквенс-типов *B. pertussis* [3]. У всех штаммов *B. pertussis*, за исключением одного, идентифицированы аллели, формирующие один сиквенс-тип — MLST-5, которому соответствовал *ptxA*(1), *ptxC*(2)*, tcfA*(2) аллельный профиль. Сиквенс-тип одного штамма не имел аналога в международной номенклатуре, аллельный профиль которого соответствовал *ptxA*(3), *ptxC*(2)*, tcfA*(2).

Таким образом, в нашей стране, так же как и в ряде стран Европы, доминировали штаммы MLST-5. Предполагается, что штаммы сиквенс-типов MLST-4 и MLST-5 представляют новые преуспевающие клоны *B. pertussis,* которые успешно циркулируют в популяции, несмотря на интенсивную вакцинацию против коклюша [2].

Проведено также сопоставление структуры *prn* гена, кодирующего пертактин, и сиквенс-типа циркулирующих штаммов. Пертактин относится к генетически контролируемой системе адгезинов, принимает участие в прикреплении микробов к чувствительным клеткам и инвазии их в клетки хозяина, включая реснитчатый эпителий и альвеолярные макрофаги. Согласно данным van Loo et al. (2002) [6], выявлена ассоциация MLST с аллелями гена *prn.* Штаммы MLST-4 ассоциировали с аллелем гена *prn3*, штаммы MLST-2 — с аллелем *prn1*, штаммы MLST-3 — с аллелями *prn1-5*, но наиболее часто (67%) ассоциировали с *prn2*, а штаммы MLST-5 ассоциировали с аллелями *prn1–3*, но наиболее часто (92%) ассоциировали с *prn2*.

Практически все штаммы MLST-5, выявленные в Беларуси, имели одинаковую структуру этого гена — *prn2* аллель, за исключением одного штамма, несущего *prn1* аллель.

Заключение. В нашей стране в последние годы, так же как в России, США и ряде стран Европы, в популяции циркулирующих штаммов доминируют штаммы с одинаковой антигенной структурой по 4 генам.

Возможно, сохраняющаяся регистрация случаев коклюша в нашей стране, несмотря на высокий охват иммунизацией, связана с доминированием в популяции штаммов *B. pertussis* MLST-5, несущих *prn2* аллель гена пертактина.

Литература

1. Колодкина, В.Л. Эпидемиологическая ситуация по коклюшу в Беларуси в 2012 году / В.Л. Колодкина, В.С. Мартынов // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова — Минск, 2013. — Вып. 6. — С. 54–56.

2. van Loo, I.H.M. Changes in the Dutch *Bordetella pertussis* population in the first 20 years after the introduction of whole-cell vaccines / I.H.M van Loo, F.R. Mooi // Microbiology. — 2002. — Vol. 148. — P. 2011–2018.

3. Sequence variation and conservation in virulence related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK / E.R. Packard [et al.] // J. Med. Microbiol. — 2004. — Vol. 53. — P. 355–365.

4. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* Virulence Factors P.69/Pertactin and Pertussis Toxin in The Netherlands: Temporal Trends and Evidence for Vaccine-Driven Evolution / F.R. Mooi [et al.] // Infect. Immun. — 1998. — Vol. 66, № 2. — P. 670–675.

5. Epidemiological Typing of *Bordetella pertussis* Isolates: Recommendations for a Standard Methodology / F.R. Mooi [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 2000. — Vol. 19. — P. 174–181.

6. Mooi, F.R. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen / F.R. Mooi // J. Infect Genet Evol. — 2010. — Vol. 10. — P. 36–49.

SEQUENCE VARIATION IN VIRULENCE-RELATED GENES OF *BORDETELLA PERTUSSIS* STRAINS CIRCULATING IN BELARUS

Martinov V.S., Kolodkina V.L.

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

Wooping cough or pertussis is an infection of the human respiratory tract and the vaccine-preventable disease. Despite more than 50 years of vaccination, pertussis has remained one of the causes of infant death worldwide and a considerable health problem in many developed countries with highly vaccinated populations.

We performed molecular-genetic analysis of gene structure *ptxA*, *ptxC*, encoding S1 subunit A complex and S3 subunit B complex of pertussis toxin, *prn* gene, encoding pertactin and *tcfA* gene, encoding tracheal colonization factor of *B. pertussis* strains, isolated from patients. The isolates were assigned multilocus sequence types (MLSTs) according to a previously described scheme for *B. pertussis* based on three of these genes (*ptxS1, ptxS3, tcfA*). All Belarus strains, isolated in 2009–2013, were identified as MLST-5. For MLSTs linkage with *prn* alleles was determined. MLST-5 was linked with *prn* 2 most frequently (92%).

Strains of MLST-5, mainly associated with prn2 gene allele, represent newly emerged successful clone that successfully circulated in many countries, despite intensive vaccination against pertussis. The identification of higly successful clones may shed light on the question of how *B. pertussis* is able to maintain itself in vaccinated populations.

Keywords: *Bordetella pertussis*, sequencing, gene.

Поступила 17.07.2014

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ В ПРОФИЛАКТИКЕ ИНФЕКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

Миронов А.Ю.

ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

Реферат. Микробиологический мониторинг в эпидемическом надзоре за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП), позволяет получать новые научные данные по микробиологии и эпидемиологии ИСМП, разработать комплекс мер, позволяющих при внедрении в практику здравоохранения проводить своевременную оценку эпидемической ситуации в стационаре; вести прогнозирование ИСМП в конкретном стационаре; снизить заболеваемость и смертность от ИСМП до уровня «бэкграунда» каждого стационара; проводить оценку эффективности санитарно-гигиенических и противоэпидемических мероприятий при возникновении вспышек ИСМП или неблагоприятной эпидемической ситуации.

Ключевые слова: инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, микробиологический мониторинг, Россия.

Проблема инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), глубока, многогранна, затрагивает различные сферы здравоохранения, требует для решения усилий специалистов различного профиля — врачей-эпидемиологов, микробиологов, клинических фармакологов, хирургов, терапевтов, анестезиологов-реаниматологов, акушеров, педиатров, гинекологов, неонатологов, медицинских сестер, организаторов здравоохранения и многих других. Общие междисциплинарные подходы к профилактике инфекций в организациях, осуществляющих медицинскую деятельность, лежат в основе «Национальной концепции профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» [1].

Стратегической задачей здравоохранения является обеспечение качества медицинской помощи и создание безопасной среды пребывания для пациентов и персонала в организациях, осуществляющих медицинскую деятельность. ИСМП являются важнейшей составляющей этой проблемы в силу широкого распространения, негативных последствий для здоровья пациентов, персонала, экономики государства.

Общим критерием для отнесения случаев инфекций к ИСМП является непосредственная связь их возникновения с оказанием медицинской помощи (лечением, диагностическими исследованиями, иммунизацией и др.). К ИСМП относят случаи инфекции, не только присоединяющиеся к основному заболеванию у госпитализированных пациентов, но и связанные с оказанием любых видов медицинской помощи (в амбулаторно-поликлинических, образовательных, санаторно-оздоровительных учреждениях, учреждениях социальной защиты населения, при оказании скорой медицинской помощи, помощи на дому и т. д.), а также случаи инфицирования медицинских работников в результате их профессиональной деятельности.

Термин «инфекция, связанная с оказанием медицинской помощи» (healthcare-associated infections), являясь более точным, в настоящее время используется в публикациях ВОЗ, нормативных документах большинства стран мира, научной литературе.

Актуальность проблемы ИСМП обусловлена тем, что они:

- поражают 5–10% госпитализированных пациентов;
- занимают 10-е место в ряду причин смертности населения;
- в Российской Федерации ежегодно регистрируется 30 тыс. случаев (истинное число 2–2,5 млн);
- развиваются у иммунокомпрометированных пациентов (новорожденные, пожилые люди, пациенты с тяжелым течением основной патологии, подвергающиеся агрессивным и инвазивным медицинским манипуляциям, трансплантации органов и т. п.);
- увеличивают в 2–3 раза продолжительность нахождения пациентов в стационаре;
- задерживают выписку пациентов в среднем на 10 дней;
- в 3–4 раза увеличивают стоимость лечения;
- в 5–7 раз увеличивают риск летального исхода;
- существенно снижают качество жизни пациента;

➢ ведут к потере репутации учреждения здравоохранения;

➢ наносят огромный экономический ущерб (10–15 млрд руб. в год).

Интенсивное развитие высокотехнологичных, инвазивных методов диагностики и лечения в сочетании с широким распространением микроорганизмов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, определяет необходимость непрерывного совершенствования систем надзора и контроля за ИСМП.

Эпидемиологический надзор за ИСМП предусматривает осуществление микробиологического мониторинга за патогенами ИСМП и определение спектра устойчивости патогенов к антимикробным средствам (антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам и др.) для разработки рациональной стратегии и тактики их применения.

Аппаратно-программное обеспечение системы эпидемиологического надзора за ИСМП включает:

➢ создание и ведение баз данных о случаях заболеваний и неблагоприятных исходах при ИСМП у пациентов и медицинского персонала;

➢ создание и ведение баз данных о патогенах ИСМП, факторах их патогенности, чувствительности к антимикробным препаратам;

➢ создание и ведение баз данных о состоянии санитарно-гигиенических и микробиологических параметров внешней среды организации здравоохранения.

Совершенствование аппаратно-программного обеспечения системы эпидемиологического надзора за ИСМП предусматривает разработку и внедрение аппаратно-программных комплексов автоматизированного рабочего места врача-эпидемиолога организации здравоохранения, врача-бактериолога организации здравоохранения, клинического фармаколога.

Одним из ведущих направлений профилактики ИСМП является их своевременная лабораторная диагностика с изучением биологических свойств патогенов инфекционно-воспалительного процесса, возникающего у пациентов и медицинского персонала. Лабораторная диагностика ИСМП составляет основу микробиологического обеспечения системы эпидемиологического надзора за инфекциями в учреждениях здравоохранения.

Микробиологический мониторинг (microbiological monitoring) — комплексное динамическое наблюдение за патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, выделенными от пациентов, персонала и объектов больничной среды медицинского учреждения, их свойствами и особенностями циркуляции.

Микробиологический мониторинг патогенов ИСМП включает:

➢ непрерывное микробиологическое обеспечение системы эпидемиологического надзора за ИСМП;

➢ этиологическую расшифровку ИСМП у пациентов, внутривидовую идентификацию патогенов;

➢ исследование объектов больничной среды;

➢ определение чувствительности клинических изолятов к антимикробным препаратам;

➢ создание и ведение баз данных о патогенах ИСМП;

➢ эффективный контроль качества микробиологических исследований в организациях здравоохранения;

➢ статистический анализ результатов исследований.

Цель микробиологического мониторинга — получение данных о структуре госпитальных штаммов, выявление среди них эпидемически значимых, расшифровка механизмов появления, формирования, циркуляции эпидемических штаммов в стационаре. Последнее обстоятельство позволяет прогнозировать эпидемически неблагоприятную обстановку и при проведении заблаговременных противоэпидемических мероприятий дает возможность предотвращать вспышки ИСМП.

Микробиологический мониторинг позволяет получать новые научные данные, касающиеся выяснения возможностей существования и циркуляции в госпитальной среде некультивируемых форм патогенов. При выявлении некультивируемых форм патогенов возможно установление их роли в структуре ИСМП, а также как возможных резервуаров эпидемических штаммов.

Первым элементом системы локального микробиологического мониторинга является идентификация выделенных культур до вида в соответствии с современной таксономией микроорганизмов.

Вторым элементом системы локального микробиологического мониторинга является корректное определение чувствительности к антибиотикам выделенных культур микроорганизмов.

Одним из требований, предъявляемых к современной микробиологической службе стационара, является обеспечение возможности хранения и доступности для анализа данных микробиологических исследований за достаточно длинный промежуток времени (обеспечение локального микробиологического мониторинга). Это невозможно осуществить без наличия специализированных компьютерных программ. Данные программы являются вместе с современными системами для идентификации бактерий и корректными методами определения чувствительности к антибиотикам изолированных патогенов третьим элементом системы локального микробиологического мониторинга, являющейся в практическом плане автоматизированным рабочим местом врача-бактериолога.

Данные о видовом составе и антибиотикорезистентности выделяемых при ИСМП клинических штаммов, многолетней динамике их изменения могут быть использованы для оптимизации фармакоэкономических показателей, при составлении маршрутных карт, новых протоколов и стандартов оказания медицинской помощи в многопрофильном стационаре и проведения противоэпидемических мероприятий в целом.

Отечественная система микробиологического мониторинга (СММ) «Микроб», а также «Микроб-2» и «Микроб-автомат» являются единственной сертифицированной Министерством здравоохранения РФ компьютерной программой микробиологического мониторинга.

Экспертная система СММ «Микроб» производит интерпретацию и коррекцию результатов исследования антибиотикочувствительности *in vitro* на основании сведений о природной устойчивости или чувствительности отдельных микроорганизмов или их групп, а также сведений о корреляции данных по чувствительности, полученных *in vitro*, клинической эффективности антибактериальных препаратов. Встроенный внутрилабораторный контроль качества обеспечивает получение достоверных результатов идентификации и определения антибиотикочувствительности. Сформированная пользователем база данных позволяет мониторировать микробный пейзаж и уровень антибиотикорезистентности, проводить статистический и эпидемиологический анализ.

Статистический отчет включает статистическую обработку количества выполненных исследований, обследованных пациентов, исследованных образцов, положительных посевов, выделенных возбудителей, монокультур и ассоциаций.

Эпидемиологический анализ включает спектр возбудителей с исключением одинаковых микроорганизмов, выделенных от одного пациента при повторных исследованиях, чувствительность возбудителей к антибактериальным препаратам (АБП) с исключением одинаковых по чувствительности одних и тех же микроорганизмов, выделенных от одного пациента при повторных исследованиях, активность АБП, госпитальные штаммы по признаку «полирезистентности».

Специфика микробиологических исследований определяет три основных направления деятельности лаборатории клинической микробиологии в стационаре:

- исследование клинического материала от лиц с признаками заболевания микробной этиологии и проведение санитарно-бактериологических исследований окружающей среды в стационаре;
- оценка эпидемиологической ситуации в отделениях стационара на основе анализа результатов бактериологических исследований клинического материала от больных за определенный период времени, а также по данным, полученным при санитарно-бактериологических исследованиях отделений за тот же период времени;
- участие в разработке тактики использования химиотерапевтических препаратов на основании данных мониторинга патогенов ИСМП, выделяемых в стационаре, и динамики их чувствительности к антибактериальным препаратам.

С позиций госпитальной эпидемиологии часто имеет значение не столько клиническая выраженность осложнений микробной этиологии у данного конкретного пациента, сколько клинически значимые биологические свойства штамма-возбудителя: множественная лекарственная устойчивость у штаммов грамотрицательных бактерий, устойчивость к метициллину/оксациллину у стафилококков, устойчивость к ванкомицину энтерококков. Важнейшим признаком эпидемиологического неблагополучия в данном конкретном учреждении здравоохранения является длительность циркуляции в нем подобных штаммов бактерий и грибов, что может спровоцировать вспышку ИСМП.

Бактериологические исследования в стационаре должны проводиться у всех пациентов с признаками заболевания микробной этиологии.

Важным исходным условием корректности проводимых бактериологических исследований является наличие современного лабораторного оборудования, стандартизированных материалов, утвержденных стандартов на исследования. Этапы микробиологического исследования того или иного клинического материала включают взятие, транспортировку, посев клинического материала на соответствующие питательные среды; создание необходимых условий инкубации посевов; идентификацию выделенных культур до вида в соответствии с современной таксономией микроорганизмов; стандартное типирование выделенных штаммов микроорганизмов и хранение наиболее значимых из них; корректное определение чувствительности к антибиотикам изолированных патогенов; быструю выдачу стандартизованных ответов; хранение и доступность для анализа данных микробиологических исследований за достаточно длинный промежуток времени.

Минимальный набор расходных материалов для микробиологических исследований в учреждениях здравоохранения включает средства для взятия и транспортировки клинических проб; набор простых и сложных коммерческих питательных сред; миниатюризированные ручные тест-системы либо автоматические или полуавтоматические бактериологические анализаторы для идентификации микроорганизмов; стандартизованные диски или панели для определения чувствительности выделенных микроорганизмов к антибиотикам.

Так, в лаборатории МГОБ № 62 автоматизацию микробиологических исследований обеспечивают три программы: компьютерная программа, прилагаемая к тест-системам для биохимической идентификации, «BBL Crystal» (Бектон Диккинсон, США), компьютерная программа анализатора «OSIRIS» (Био-Рад, США) и система микробиологического мониторинга «МИКРОБ» (Россия). В рамках «Автоматизированного рабочего места врача-микробиолога» бактериологической лаборатории объединены вместе три экспертные программы. Результаты идентификации микроорганизмов и определения их антибиотикочувствительности переносятся в компьютерную базу данных «МИКРОБ».

Сформированный бланк анализа (выделен один или несколько микроорганизмов, с соответствующей для каждого из них антибиотикограммой) проходит многократную автоматическую экспертную оценку:

- экспертная система «BBL Crystal» обеспечивает получение достоверных результатов идентификации микроорганизмов;
- экспертная система «OSIRIS» производит интерпретацию результатов исследования антибиотикочувствительности, полученных *in vitro*, исходя из заложенных в нее данных о природной устойчивости отдельных микроорганизмов или их групп, о распространении среди них приобретенной и ассоциированной резистентности к антибиотикам, а также сведений о клинической эффективности антибактериальных препаратов;
- экспертная система «МИКРОБ» формирует базу данных с вторичным контролем вносимых в нее результатов микробиологического исследования.

Бактериологическая лаборатория перешла от «научного» подхода в исследованиях (выделение различных микроорганизмов и детальное изучение их биологических свойств) к «практическому» — исследования по строгим показаниям, ориентированным на индикацию проблемных патогенов. Это позволило, во-первых, сократить сроки выдачи ответа с 4–5-ти сут до 1–3-х сут; во-вторых, проводить микробиологический мониторинг за циркуляцией патогенов ИСМП, их антибиотикорезистентностью; в-третьих, совместно с госпитальным врачом-эпидемиологом разрабатывать необходимые санитарно-эпидемиологические мероприятия по предотвращению вспышек ИСМП.

Служба госпитального врача-эпидемиолога, служба клинического врача-фармаколога, микробиологическая лаборатория образуют систему инфекционного контроля, адаптированную к условиям специализированного стационара. Внедрение системы мероприятий по инфекционному контролю снижает уровень инфекционных послеоперационных осложнений, сокращает среднюю продолжительность пребывания в стационаре, экономит бюджетные средства.

Микробиологический мониторинг в эпидемическом надзоре за ИСМП позволяет получать новые научные данные по микробиологии и эпидемиологии ИСМП, разработать комплекс мер, позволяющих при внедрении в практику здравоохранения:

➢ проводить своевременную оценку эпидемической ситуации в стационаре;

➢ вести прогнозирование ИСМП в конкретном стационаре;

➢ снизить заболеваемость и смертность от ИСМП до уровня «бэкграунда» каждого стационара;

➢ проводить оценку эффективности санитарно-гигиенических и противоэпидемических мероприятий при возникновении вспышек ИСМП или неблагоприятной эпидемической ситуации.

Следует отметить, что основными задачами государственной политики при осуществлении мониторинга биологических рисков являются [2]:

а) комплексный анализ ситуации, выявление новых биологических угроз и прогнозирование их возможных последствий;

б) внедрение и применение согласованной на глобальном уровне международной классификации биологических агентов по уровню биологической опасности;

в) разработка современных методов индикации биологических агентов в объектах окружающей среды и биологических средах.

Литература

1. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и информационный материал по ее положениям / В.И. Покровский [и др.]. — Н. Новгород: Изд-во «Ремедиум Приволжье», 2012. — 84 с.

2. Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу: утв. Президентом Российской Федерации 01.11.2013 № Пр-2573 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_154162/. — Дата доступа: 20.08.2014.

MICROBIOLOGICAL MONITORING IN PREVENTING OF HEALTHCARE-ASSOCIATED INFECTIONS

Mironov A.Yu

Moscow G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology & Microbiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia

Microbiological monitoring in the epidemiological surveillance of healthcare-associated infections(HAI) provides new scientific data on HAI microbiology and epidemiology, to develop a set of measures to enable implementation in public health practice: a timely assessment of the epidemic situation in the hospital; HAI prediction in a hospital; reduce morbidity and mortality caused by HAI to each hospital's facilities; to assess the effectiveness of sanitary and anti-epidemic measures in the event of HAI outbreaks or unfavorable epidemic situation.

Keywords: healthcare-associated infections, microbiological monitoring, Russia.

Поступила 29.08.2014

ГЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПЕЙЗАЖ РОТАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2014 Г. В Г. МИНСКЕ, ГОМЕЛЬСКОЙ И МОГИЛЕВСКОЙ ОБЛАСТЯХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Полякова Н.В.[1], Семейко Г.В.[2], Самойлович Е.О.[2], Клюйко Н.Л.[3], Думова С.А.[4], Лосева Е.М.[5], Канашкова Т.А.[1]

[1]Белорусский государственный медицинский университет, Минск;

[2]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;

[3]Городская детская инфекционная клиническая больница, Минск;

[4]Центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья Гомельской области, Гомель;

[5]Центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья Могилевской области, Могилев, Беларусь

Реферат. С помощью полугнездовой мультиплексной ОТ-ПЦР проведено генотипирование 45 ротавирусов, выявленных в пробах стула детей с ОГЭ в эпидемический сезон (январь–март) 2014 г. в трех регионах Республики Беларусь. Полученные данные свидетельствуют о том, что в этот пери-

од генотипический пейзаж ротавирусов, циркулирующих в г. Минске, Могилевской и Гомельской областях, был представлен 4 генетическими G-P вариантами ротавируса: G4P[8] (71±6,7%), G2P[4] (20±5%), G1P[8] (4,4±3%), G9P[8] (4,4±3%) и дополнен смесью G-генотипов (G4+G1) в сочетании с P[8] (2,2±1,4%). Доминирующим генотипом в г. Минске и Могилевской области являлся генотип G4P[8], составивший 73,3±9 и 93,3±6,5% соответственно. В Гомельской области генотипы G4P[8] и G2P[4] внесли одинаковый вклад (по 46,6±12,8%) в этиологию ротавирусных гастроэнтеритов у детей.

Ключевые слова: ротавирус, генотипы, полугнездовая мультиплексная ОТ-ПЦР.

Введение. Ротавирусы являются наиболее распространенной причиной тяжелого гастроэнтерита у детей младшего возраста во всем мире [1].

По данным обзора исследований ВОЗ в области ротавирусов, 20–70% всех случаев госпитализации и 20% случаев диарей с летальным исходом вследствие значительной дегидратации связаны с этой инфекцией [2]. Основная часть (82%) летальных исходов приходится на развивающиеся страны Юго-Восточной Азии, Африки и Латинской Америки, однако и в развитых странах мира, где доля ротавирусных поражений в летальности относительно невелика, экономическая нагрузка, обусловленная высокой заболеваемостью и нередкой госпитализацией, существенна [3].

Ротавирусы принадлежат к роду *Rotavirus*, который по наличию группоспецифического антигена VP6 разделен на семь групп, обозначаемых буквами латинского алфавита от A до G [4]. Инфицирование человека происходит ротавирусами групп A, B и C, однако наибольший интерес в клинической вирусологии вызывают ротавирусы группы A. Зрелый вирион ротавируса лишен липополисахаридной оболочки, имеет сферическую форму и состоит из ядра, включающего в себя геном, представленный одиннадцатью сегментами двуцепочечной РНК и окруженный тремя концентрическими слоями белковых оболочек [4].

Этиологическая диагностика ротавирусной инфекции возможна только на основании результатов лабораторных исследований. Идентификация серотипа, основанная на антигенной специфичности его поверхностных структурных белков VP4 (P-тип) и VP7 (G-тип), является достаточно трудоемкой задачей и требует соответствующих реагентов (моноклональных антител), поэтому в настоящее время при характеристике вируса принято определять его генотип. Наиболее распространенным методом генотипирования ротавирусов является полугнездовая мультиплексная ОТ-ПЦР.

Так как белок VP7 является гликопротеином, то определяемые им серо-/генотипы обозначаются как G-тип. При этом количество G-серотипов коррелирует с количеством G-генотипов, т. к. праймеры, используемые для генотипирования, расположены в области детерминант, определяющих серотип белка VP7 [4]. Белок VP4 является протеазочувствительным и определяемые им серо- и генотипы обозначаются как P-тип. В связи с существованием различий между генетически и серологически определяемыми P-типами в номенклатуре ротавирусов принято результат P-генотипирования заключать в квадратные скобки [5] (Gentsch J.R. et al., 1996). Поскольку гены, кодирующие два связанных с нейтрализацией протеина, VP7(G) и VP4(P), расщепляются независимо, современная классификация ротавирусов учитывает характеристику обоих этих генов, согласно которой генотип обозначают [P]G.

Гены, кодирующие белки VP4 и VP7, подвергаются независимому перераспределению, что увеличивает многообразие природных штаммов ротавирусов за счет существования различных G[P]-комбинаций. В настоящее время идентифицировано 27 G- и 35 P-генотипов ротавирусов [5].

Теоретически при произвольной комбинации G- и P-типов может образоваться огромное количество различных вариантов ротавирусов, однако реально выявляемое число G/P-комбинаций оказывается значительно меньшим и составляет не более 70 [5]. До последнего времени генотипы G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] и G9P[8] было принято относить к так называемым «common» генотипам, т. к. они считались часто встречающимися [6]. Однако существуют географические различия в распространенности ротавирусов различных генотипов даже в рамках одной страны, и частота их встречаемости изменяется со временем [7]. Опубликованы данные о находках новых, эпидемически значимых вариантов ротавирусов и большом числе нетипируемых штаммов [5].

Ротавирусная инфекция регистрируется на всех континентах на протяжении всего года. Однако в странах с умеренным климатом, к которым относится Республика Беларусь, заболеваемость ротавирусным гастроэнтеритом повышается в холодное время года, захватывая период с декабря по март включительно [8].

Согласно данным официальной регистрации, в Республике Беларусь ежегодно выявляется 3–5 тыс. заболевших ротавирусной инфекцией (2008 г. — 3553, 2009 г. — 4013, 2010 г. — 5113, 2011 г. — 5206, 2012 г. — 3901). Подавляющее большинство заболевших (до 80%) — это дети в возрасте 0–2 года [9, 10]. Практически все зарегистрированные случаи ротавирусной инфекции потребовали госпитализации, что и определяет высокую социально-экономическую значимость данной инфекции для нашей страны.

В последние годы в Республике Беларусь были изучались вопросы генотипирования ротавирусов, циркулировавших в г. Минске [10], однако информация о том, какими генотипами ротавирусов обусловлена заболеваемость в регионах страны, практически отсутствует.

Цель работы — сравнительный анализ генотипов ротавирусов, вызвавших острый гастроэнтерит у детей в январе–марте 2014 г. в трех регионах Республики Беларусь: г. Минске, Гомельской и Могилевской областях.

Материалы и методы. Для изучения генетического разнообразия ротавирусов, циркулировавших в январе–марте 2014 г, были отобраны 45 образцов стула от детей с лабораторно подтвержденным диагнозом ротавирусного гастроэнтерита: по 15 образцов из г. Минска, Гомельской и Могилевской областей.

Диагностику ротавирусной инфекции осуществляли на основании детекции антигена ротавируса в образцах стула с использованием отечественной иммуноферментной тест-системы «РОТА-АГ» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Выделение РНК ротавирусов из предварительно приготовленной 10%-й суспензии стула выполняли с использованием автоматической системы для выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах MagMAX Express (Applied Biosystems, США) с наборами 5X MagMAX-96 Viral Isolation kit (Ambion, США). Генотипирование ротавирусов осуществляли с помощью мультиплексной полугнездовой ОТ-ПЦР. Для амплификации фрагмента гена VP7 с целью последующего G-генотипирования использовали праймеры 9con1L иVP7-R [11]. Для амплификации фрагмента гена VP4 с целью последующего P-генотипирования использовали праймеры con3 и con2 [11]. ОТ-ПЦР проводили в один раунд с использованием набора QIAGEN OneStep RT-PCR kit, QIAGEN (Германия), содержащего смесь ферментов: обратные транскриптазы Omniscript и Sensiscript и HotStarTaq ДНК полимеразу. Реакцию проводили в следующих условиях: обратная транскрипция — 30 мин при 42°C, денатурация смеси обратных транскриптаз и активация полимеразы — 15 мин при 95°C и 40 циклов амплификации. Каждый цикл включал: денатурацию при 94°C — 30 с, отжиг праймеров при 42°C — 30 с, элонгацию при 72°C — 45 с. Для второго раунда использовали набор специфических праймеров для определения G и P генотипов [12]. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 3%-м агарозном геле с добавлением красителя Gelstar 10000X, Lonza (США) для визуализации ДНК.

Результаты и их обсуждение. Генотипирование 45 ротавирусов, обнаруженных в образцах стула детей, по генам, кодирующим структурные белки VP7 и VP4, позволило идентифицировать как G -, так и P-генотип во всех исследуемых пробах. Они относились к четырем G-типам (G4, G2, G1, G9) и двум P-типам (P[8], P[4]). Среди G-типов наиболее распространенным был генотип G4, обнаруженный в 32 образцах и составивший 71±6,7%. Вторым по частоте выявления оказался генотип G2, идентифицированный в 9 пробах (20±5,9%). Доставерно реже выявлялись генотипы G1 и G9, обнаруженные в 2 (4,4±2,5%) и 1 (2,2±1,4%) пробе соответственно. В одной из проб было обнаружено одновременно два генотипа — G4 и G1. Анализ результатов P-генотипирования ротавирусов выявил циркуляцию вирусов двух генотипов P[8] и P[4]-генотипов. Генотип P[8] выявлялся с большей частотой и был идентифицирован в 36 пробах (80±5,9%), на долю обнаруженного в 9 пробах генотипа P[4] пришлось 20±5,9%.

С учетом характеристики обоих этих генов (G и P) в 2014 г. в г. Минске, Гомельской и Могилевской областях в сезонный подъем ротавирусной инфекции выявлялось четыре генетических варианта ротавируса: G4P[8], G2P[4], G1P[8], G9P[8] и смесь G-генотипов в одой пробе (G4+G1) в сочетании с P[8] (рисунок 1).

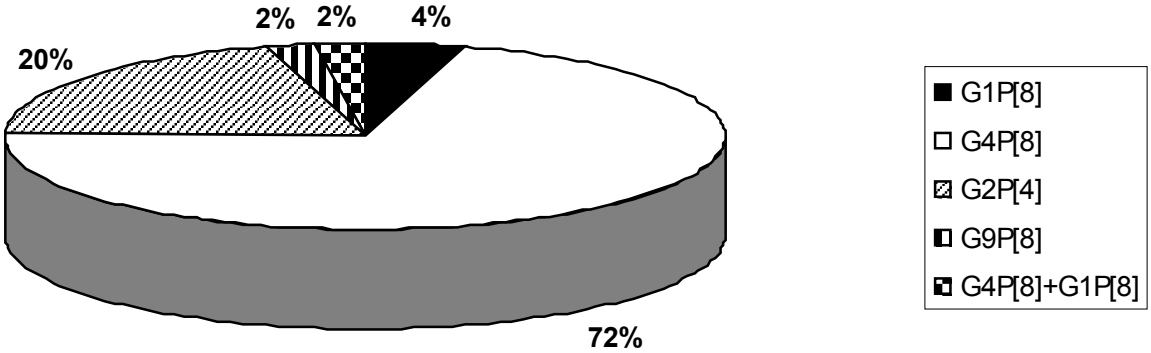


Рисунок 1 — Генотипический пейзаж ротавирусов, циркулировавших в январе–марте 2014 г. в г. Минске, Гомельской и Могилевской областях

Преобладающим во всех трех регионах являлся повсеместно распространенный генотип G4P[8], обнаруженный в 32 пробах из 45 (71±6,7%). Существенный вклад в генотипический пейзаж за анализируемый период времени внес и второй по частоте выявления генотип G2P[4], идентифицированный в 9 образцах (20±5%). Значительно реже регистрируемые генотипы G1P[8] и G9P[8] были обнаружены в 2 (4,4±3%) и 1 пробе (2,2±1,4%) соответственно. В одной из проб была определена смесь двух G-генотипов: G1+G4 в сочетании с генотипом P[8] (2,2±1,4%).

Полученные нами данные согласуются с многолетними исследованиями распространения ротавирусов разных генотипов, согласно которым часто встречающимися и повсеместно распространенными являются генотипы G1, G2 G3, G4, G9 в сочетании с P-генотипами P[4] и P[8] [5].

Сравнительный анализ G[P]-генотипов ротавирусов, циркулировавших в г. Минске и соседних Гомельской и Могилевской областях, показал, что наибольшим генетическим разнообразием выявляемых ротавирусов характеризовался г. Минск, в котором генотипический пейзаж был представлен всеми идентифицируемыми вариантами: G4P[8], G2P[4], G1P[8], G9P[8] и G4 + G1P[8] (рисунок 2). В аналогичный отрезок времени в Гомельской области были выявлены три генотипа ротавируса: G4P[8], G2P[4] и G1P[8]. Наименьшее генетическое разнообразие, представленное генотипами G4P[8] и G2P[4], регистрировалось в Могилевской области.

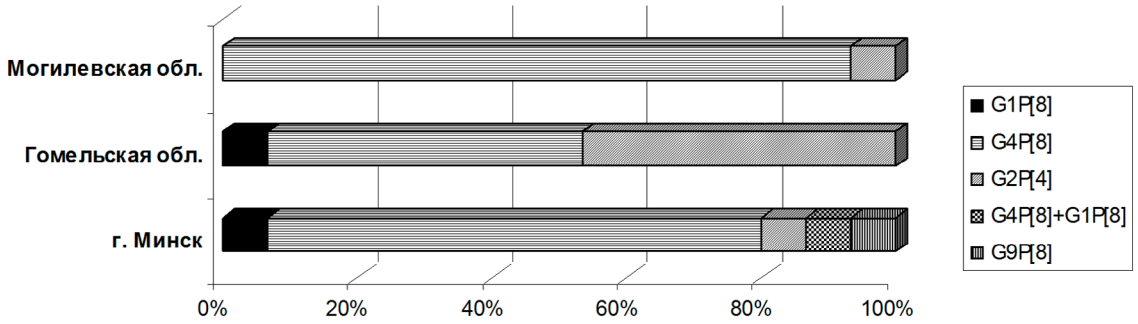


Рисунок 2 — Сравнительная характеристика генотипического пейзажа ротавирусов, выявленных в январе–марте 2014 г. в г. Минске, Гомельской и Могилевской областях

Генотип G4P[8] занимал лидирующие позиции во всех анализируемых регионах Республики Беларусь, обусловив от 93,3±6,5% (14 проб из 15) в Могилевской области до 73,3±9 и 46,6±12,8% в г. Минске и Гомельской области соответственно. Генотип G2P[4] в Гомельской области внес равнозначный вклад с генотипом G4P[8], составив 46,6±12,8% (7 проб из 15), при этом как в г. Минске, так и в Могилевской области он был идентифицирован лишь в одной пробе, составив 6,6±4,6% от зарегистрированных генотипов. Генотипы G1P[8] и G9P[8] также выявлялись редко и были обнаружены только в одной пробе, полученной из г. Минска, обусловив по 6,6±4,6% генотипического разнообразия данного региона. Генотипический пейзаж г. Минска был дополнен смесью генотипов ротавирусов G4 + G1P[8], обнаруженных одновременно в одной пробе (6,6±4,6%). Наши данные о выявлении

нескольких генотипов ротавирусов в одной пробе согласуются с результатами, полученными другими исследователями [14]. Такие микст-инфекции могут вносить вклад в генетическое разнообразие ротавирусов появлением реассортантов, возникающих в результате независимого перераспределения фрагментов РНК, кодирующих белки VP4 и VP7, двух разных вирусов.

Важно было оценить, произошло ли в период сезонного подъема ротавирусной инфекции изменение пейзажа ротавирусов, циркулировавших в г. Минске в 2014 г. в сравнении с предыдущими годами (рисунок 3). Для этого сравнили данные, полученные в 2014 г., с результатами исследований по циркулировавшим в г. Минске генотипам ротавирусов в первые три месяца (январь–март) 2012 г. и 2013 г.

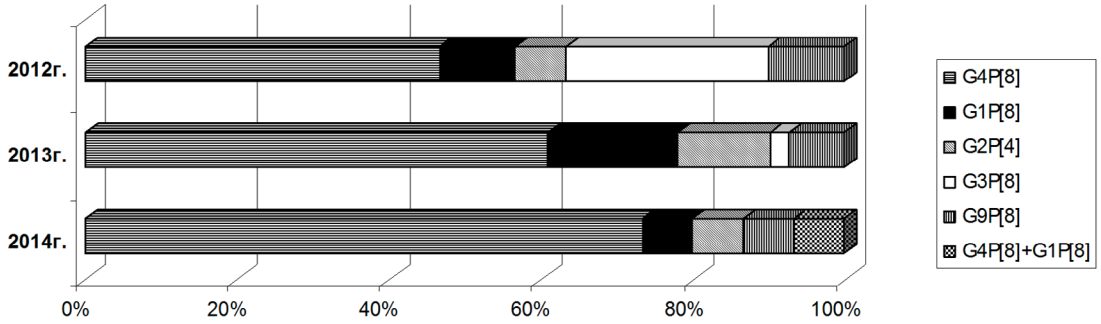


Рисунок 3 — Сравнительная характеристика генотипического пейзажа ротавирусов, выявленных в январе–марте 2012–2014 гг. в г. Минске

Сравнение полученных данных показало, что смена доминирующего в период с января по март 2012–2013 гг. генотипа G4P[8] не произошла и в аналогичный период 2014 г. Более того, доля данного генотипа значительно возросла: с 46,6±9% в 2012 г. до 60,9±7,6% в 2013 г. и 73,3±9% в 2014 г. Противоположная ситуация наблюдалась в отношение генотипа G3P[8], занимавшего второе место по частоте выявления в январе–марте 2012 г. (25,8±8%) и утратившего свои позиции до 2,4±1,3% в 2013 г. В соответствующий период 2014 г. этот генотип не был обнаружен ни в одной из проб. Ротавирусы генотипов G2P[4], G1P[8] и G9P[8] выявлялись на протяжении всех трех лет анализа. Так, генотип G2P[4] составил от 12,1±5% в 2013 г. до равных долей 6,6±4,6% в 2012 г. и 2014 г. Доля генотипа G1P[8] вначале возросла от 10±5% в 2012 г. до 17±5,8% в 2013 г., а затем вновь снизилась до 6,6±4,6% в 2014 г. Генотип G9P[8] в течение трех лет наблюдения выявлялся практически с одинаковой частотой: 10±5% — в 2012 г., 7,3±4% — в 2013 г., 6,6±4,6% — в 2014 г.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что с января по март 2014 г. в трех регионах Республики Беларусь (г. Минске, Гомельской и Могилевской областях) в этиологии острых гастроэнтеритов у детей принимали участие ротавирусы четырех различных генотипов: G4P[8], G2P[4], G1P[8], G9P[8]. Доминирующим генотипом в г. Минске и Могилевской области являлся генотип G4P[8], частота выявления которого составила 93,3±6,5 и 73,3±9% соответственно. В Гомельской области генотипы G4P[8] и G2P[4] внесли равный вклад (по 46,6±12,8%) в этологию острых гастроэнтеритов у детей.

Литература

1. World Health Organization. Global Rotavirus Information and Surveillance Bulletin. — 2013. — Vol. 7. — P. 11.

2. de Zoysa, I. Interventions for the control of diarrhoeal disease among young children: rotavirus and cholera immunization / I. de Zoysa, R.G. Feachem // Bulletin of the World Health Organization. — 1985. — Vol. 63. — P. 569–583.

3. Estes, M.K. Rotaviruses / M.K. Estes, A.Z. Kapikian // Howley Fields Virology. — 5 ed. / Ed. D.M. Knipe, P.M. Howley. — Melbourne: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. — Ch. 52. – P. 1918–1975.

4. Serotype diversity between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs / J.R. Gentsch [et al.] // J. Infect. Dis. — 2005. — Vol. 192, suppl. 1. — P. 146–159.

5. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) / J. Matthijnssens [et al.] // Arch. Virol. — 2011. — Vol. 156. — P. 1397–1413.

6. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network / M. Iturriza-Gomara [et al.] // Epidemiol. Infect. — 2011. — Vol. 139. — P. 895–909.

7. Anticipating rotavirus vaccines: epidemiology and surveillance of rotavirus in South Africa / A.D. Steele [et al.] // Vaccine. — 2003. — Vol. 21, № 5–6. — P. 354–360.

8. Васильев, Б.Я. Острые кишечные заболевания. Ротавирусы и ротавирусная инфекция / Б.Я. Васильев, Р.И. Васильева, Ю.В. Лобзин. — СПб.: Лань, 2000. — 272 с.
9. Ротавирусная инфекция в Беларуси / В.Г. Гудков [и др.] // Здравоохранение. — 2008. — № 11. — С. 8–13.
10. Ротавирусные гастроэнтериты у детей в г. Минске в 2012 г.: распространенность, сезонность, возрастное распределение, генотипический пейзаж возбудителя / Е.О. Самойлович [и др.] // Мед. журн. — 2013. — № 4. — С. 95–98.
11. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction / J.R. Gentsch [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1992. — Vol. 30, № 6. — P. 1365–1373.
12. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens / V. Gouvea [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1990. — Vol. 28. — P. 276–282.
13. Characterisation of rotavirus strains among hospitalised and non-hospitalised children in Guinea-Bissau, 2002 A high frequency of mixed infections / N.M. Nielsen [et al.] // J. Clin. Virol. — 2005. — Vol. 34, № 1. — P. 13–21.

GENOTYPIC LANDSCAPE OF ROTAVIRUSES CIRCULATING IN THE EPIDEMIC SEASON 2014 IN MINSK CITY, GOMEL AND MOGILEV REGIONS

Polyakova N.V.[1], Semeiko G.V.[2], Samoilovich E.O.[2], Klyuyko N.L.[3], Dumova S.A.[4], Loseva E.M.[5], Kanashkova T.A.[1]

[1]Belarusian State Medical University, Minsk;
[2]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk;
[3]Municipal Children's Infectious Clinical Hospital, Minsk;
[4]Gomel Region Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health, Gomel;
[5]Mogilev Region Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health, Mogilev, Belarus

This study describes rotavirus (RVA) genotypes prevalence in January–March 2014 in 3 sites of Belarus (Minsk, Mogilev region, Grodno region). The findings suggest that 4 G-P genetic variants of rotavirus have been circulated in 3 regions of Belarus: G4P[8] (71±6.7%), G2P[4] (20±5%), G1P[8] (4.4±3%), G9P[8] (4.4±3%) and mix of 2 G-genotypes in one sample (G4+G1) in combination with P[8] (2.2±1.4%). Predominant genotype in Minsk and Mogilev region was genotype G4P [8], amounting to 73.3±9% and 93.3±6.5% respectively. In Gomel region genotypes G4P [8] and G2P [4] contributed equally (by 46.6±12.8%) in the etiology of rotavirus gastroenteritis in children.

Keywords: rotavirus, genotypes, multiplex RT-PCR.

Поступила 09.07.2014

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТРОБАКТЕРНОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

Пронько Н.В., Конюк Л.А.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Реферат. Проанализированы клинико-эпидемиологические особенности течения цитробактерной кишечной инфекции у детей. Установлена склонность к заболеванию детей раннего возраста, особенно первых лет жизни. При вспышках острых кишечных инфекций, возникающих в детских коллективах, пациентов необходимо обследовать на условно-патогенную кишечную группу, что позволит оптимизировать не только способы лечения, но и противоэпидемические мероприятия.

Ключевые слова: дети, острые кишечные инфекции, цитробактерная кишечная инфекция.

Введение. Острые кишечные инфекции (ОКИ), несмотря на успехи медицинской науки, остаются актуальной проблемой и имеют широкое распространение [1, 2]. В инфекционной патологии детского возраста все большую значимость приобретает условно-патогенная флора (УПФ): клебсиеллы, протей, синегнойная палочка, цитробактер, энтеробактер и др. [3]. Заболеваемость диареями, вызванными УПФ, постоянно растет. Основными причинами являются: нарушение экологической обстановки, наличие постоянного резервуара УПФ в природе, нерациональное применение антибиотиков, снижение иммунологической резистентности [4, 5]. Этиологическая структура спорадической заболеваемости ОКИ, вызванными УПФ, не является постоянной: в различные периоды времени и в различных регионах она может варьировать [6, 7]. Частота встречаемости гастроэнтери-

тов, вызванных УПФ, степень их выраженности, а также частота регистрации у детей и взрослых по данным разных авторов имеют существенные различия [7, 8]. Установлено, что основной причиной диарей, вызванных УПФ, является протей, распространенность остальных диарей изучена мало, а клиническая картина охарактеризована недостаточно [6]. Внимание к изучению ОКИ цитробактерной этиологии обусловлено тяжестью их протекания, схожестью местных изменений желудочно-кишечного тракта с другими кишечными инфекциями, склонностью к поражению детей ранней возрастной группы [3, 5]. У практического врача кишечные инфекции, вызванные УПФ, могут вызывать затруднения в дифференциально-диагностическом плане, особенно в первые дни болезни [7].

Цель работы — изучение этиологических особенностей, сезонного распределения, клинико-лабораторных особенностей цитробактерной кишечной инфекции у детей.

Материалы и методы. Материалом данного исследования стали 61 пациент в возрасте от 1 мес. до 14 лет с подтвержденной цитробактерной кишечной инфекцией (ЦКИ), находившийся на стационарном лечении в отделении детских кишечных инфекций Гродненской областной инфекционной клинической больницы (ГОИКБ) на протяжении 2008–2012 гг. и выписанных с клиническим выздоровлением. Клинический материал основывался на анализе историй болезни, журналах приемного отделения, направлений для госпитализации в стационар детей с подтвержденной ЦКИ. У всех пациентов диагноз был установлен путем выделения возбудителя *Citrobacter freundii.* Стандартный алгоритм обследования пациентов включал в себя общеклинические и биохимические исследования. Для расшифровки этиологического диагноза проводилось комплексное лабораторное обследование, включающее бактериологическое (посев испражнений на кишечную группу бактерий), ПЦР-диагностика фекалий на наличие РНК вирусов, а также общепринятые клинические лабораторные исследования (клинический анализ крови, мочи и др.). Диагноз ЦКИ устанавливали на основании тщательного изучения анамнеза, совокупности клинико-эпидемиологических и лабораторных данных. Обследование проводилось согласно клиническим протоколам, утвержденным МЗ РБ. Статистическую обработку полученных данных осуществляли по общепринятым критериям вариационной статистики. При сравнении двух независимых групп использовали t-критерий Стьюдента, а трех независимых групп — метод ANOVA. Достоверными считали различия в группах при уровне значимости $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Как показали исследования, за последние годы в этиологической структуре бактериальных ОКИ возрос удельный вес УПФ (стафилококка, протея, клебсиеллы, цитробактера, энтеробактера). Так, если в 2008 г. среди пациентов, госпитализированных в детское отделение ГОИКБ, на долю ОКИ, вызванных УПФ, приходилось до 8,9% от числа бактериологически подтвержденных кишечных инфекций, то в 2012 г. их доля увеличилась до 15,8%.

Удельный вес цитробактерной кишечной инфекции в структуре острых кишечных инфекций, согласно данным литературы, невелик и составляет от 3 до 7% [1, 5]. При анализе структуры расшифрованных ОКИ у детей, вызванных УПФ, по стационару установлено, что ЦКИ составила 17,2% от числа подтвержденных кишечных инфекций, вызванных УПФ. Если в 2008 г. на долю цитробактерной кишечной инфекции у детей, госпитализированных в ГОИКБ, приходилось только 2,1% от числа бактериологически подтвержденных кишечных инфекций, вызванных УПФ, то в 2012 г. их доля увеличилась до 17,2%.

Распределение пациентов по этиологии возбудителей УПФ представлено на рисунке 1.

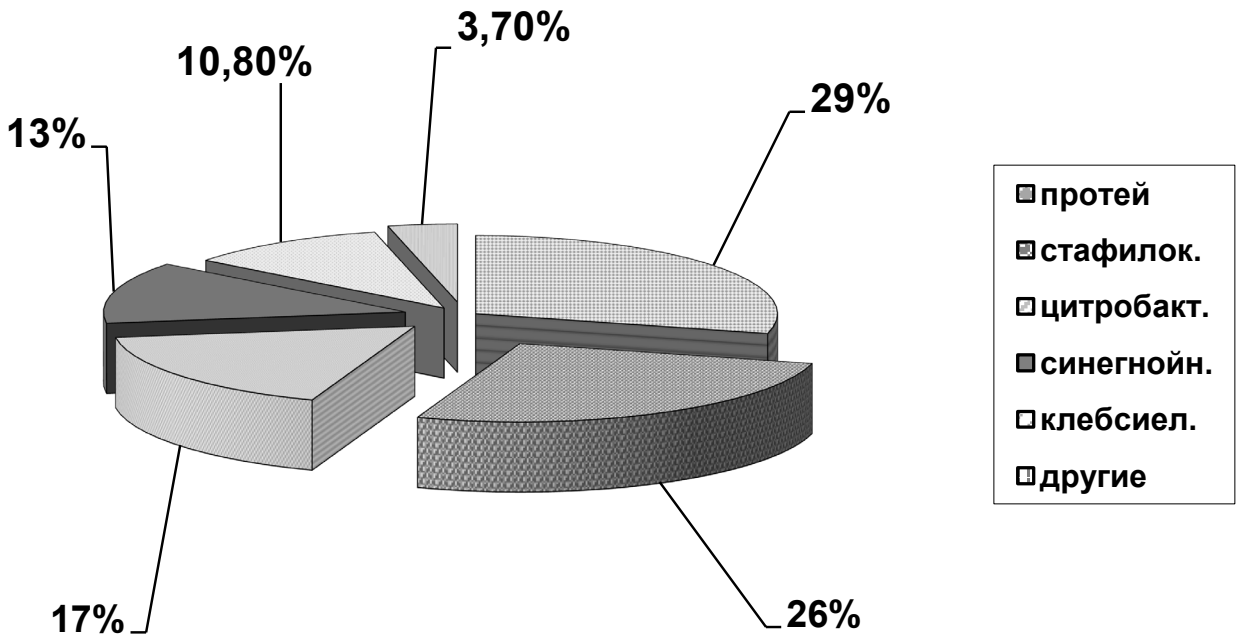


Рисунок 1 — Этиологическая структура ОКИ, вызванных УПФ

Как видно из приведенных данных, в составе ОКИ, вызванных УПФ, наибольшим был удельный вес ОКИ протейной этиологии. Среди детей, перенесших ОКИ, вызванную УПФ, за исследуемый период протеоз выявлен в 29,1% случаев, стафилококковая кишечная инфекция отмечалась в 26,4% случаев, реже регистрировалась клебсиеллезная кишечная инфекция, на долю которой приходилось лишь 10,8% случаев.

Причиной роста удельного веса ОКИ, вызванных УПФ, может быть не только увеличение ежегодного числа заболевших этими инфекциями и реальный рост заболеваемости, но и увеличение числа лабораторно обследованных лиц, главным образом детей в возрасте до 3 лет.

При анализе возрастной структуры пациентов с ЦКИ установлено, что в возрасте от 1 мес. до 1 года было 28 (45,9%) пациентов; от 1 до 3 лет — 24 (39,3%) пациентов; от 4 до 6 лет — 5 (8,2%) пациента. В возрасте от 7 до 14 лет были 4 (6,6%) пациента. Заболеваемость ЦКИ у детей за последние 5 лет имеет тенденцию к росту. Среди пациентов, заболевших данной инфекцией за анализируемый период, удельный вес детей 0–14 лет составил 100%. Максимальное количество случаев зарегистрированно в возрастной группе 0–3 года (85,2%). Доля детей в возрасте старше 7 лет среди пациентов, с установленной ЦКИ, была минимальной и составила всего 6,6%.

Таким образом, наиболее уязвимой является группа детей первых лет жизни, где случаи ЦКИ отмечались более чем в 85%. С меньшей частотой ЦКИ выявлялась в возрастных группах детей старше 3 лет. Увеличение удельного веса выявленных ЦКИ у детей первых лет жизни может быть связано как с улучшением диагностики, так и с реальным ростом заболеваемости.

Распределение пациентов с ЦКИ по полу, степени тяжести и характеру занятости (организованности) представлено в таблице 1.

Таблица 1 — Общая характеристика пациентов с цитробактерной кишечной инфекцией

Показатели	Абсолютное число, n = 61	Процент, M±m,%
Мужской пол	31	50,8±8,4
Женский пол	30	49,2±8,4
Легкая форма	1	1,6±1,6
Среднетяжелая форма	60	98,4±1,6*
Тяжелая форма	–	–

Организованные дети	19	31,1±5,9
Неорганизованные дети	42	68,9±5,9**

Примечания:
1 —*Статистически значимое отличие (p<0,01) при сравнении легкой и среднетяжелой формы заболевания.
2 — **Статистически значимое отличие (p<0,01) при сравнении организованных и неорганизованных детей с ЦКИ.

Как видно из таблицы 1, среди госпитализированных детей с ЦКИ существенных различий по полу не отмечено, преобладала среднетяжелая форма заболевания. Доля детей, посещающих детские дошкольные учреждения, составила 31,1%, не посещающих детские дошкольные учреждения — 68,9%. Вероятно, это связано с тем, что дети первых лет жизни реже посещают детские организованные коллективы и контактируют с окружающими людьми. По нашим данным, совпадающим с данными городского центра гигиены и эпидемиологии, дети, не посещающие детские коллективы, болеют чаще, чем организованные дети. Это соотношение сохраняется в течение всего анализируемого периода. На основании того, что дети до 2 лет находятся в семье и реже контактируют с окружающими людьми, можно предположить, что преимущественное заражение детей раннего возраста происходит в домашних очагах алиментарным путем через продукты питания, а также контактным путем через предметы ухода при недостаточном соблюдении гигиенических правил.

Распределение пациентов с цитробактерной инфекцией по сезонам года представлено на рисунке 2.

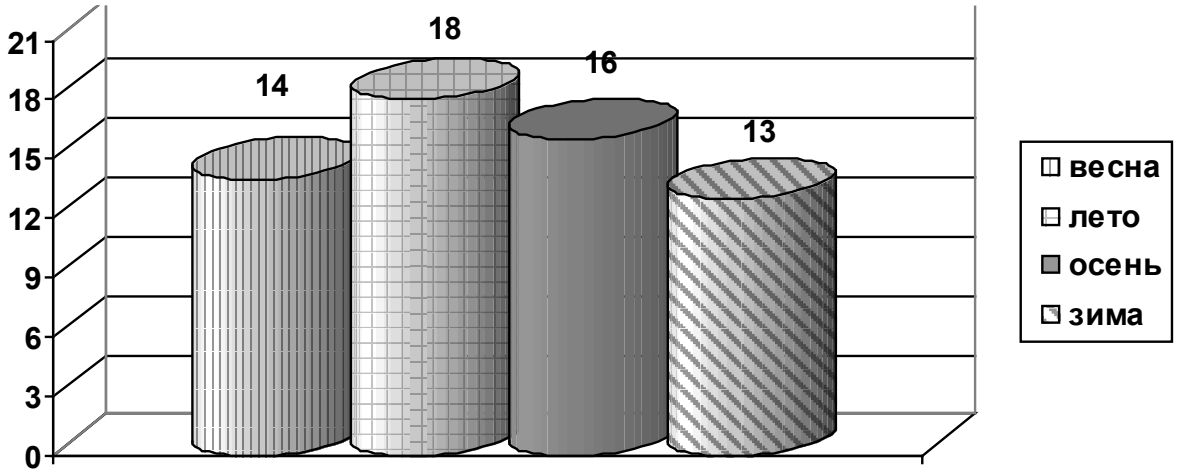


Рисунок 2 — Распределение пациентов с цитробактерной инфекцией по сезонам

При изучении распределения заболевших детей по сезонам года за рассматриваемый период нами не отмечено четкой сезонности в динамике заболеваемости ЦКИ. Случаи заболевания регистрировались равномерно в течение года. Наши данные согласуются с результатами других исследователей, которые также не выявили сезонности у пациентов с ЦКИ [5, 7]. ЦКИ в основном протекала в виде моноинфекции (98,4%), сочетанная инфекция отмечена у 1 пациента (1,6%): наблюдалось сочетанное выделение *Citrobacter freundii* со стафилококками.

Дети поступали в стационар в первые дни от начала заболевания в состоянии средней тяжести или ближе к тяжелому. В большинстве случаев заболевание протекало по типу гастроэнтерита (65,6%), реже — топическим диагнозом был энтероколит (34,4%).

Таблица 2 — Общеклинические показатели у пациентов с цитробактерной инфекцией

Показатели	Абсолютное число, n=61	Проценты, M±m, %
Острое начало	58	95,1±2,8
t нормальная	7	11,5±4,1
t до 38°	19	31,1±5,9
t выше 38°	35	57,4±6,3

Рвота	40	65,6±6,1
Токсикоз с эксикозом	18	29,5±5,8

Как видно из таблицы 2, начало заболевания в 95,1% случаев было острым. ЦКИ начиналась с появления срыгивания, повторной рвоты, повышения температуры тела, метеоризма, изменения характера и кратности стула, болей в животе. При поступлении в стационар у пациентов были выражены жажда, мраморность кожных покровов, отмечалось беспокойство или вялость, тахикардия. Стул был частым, жидким, иногда с примесью слизи, зелени, до 10 раз в сутки. Боль в животе в первые дни болезни была выраженной, локализовалась преимущественно в эпигастральной области. Диарея была ведущим симптомом. Наблюдалась потеря массы тела. Признаки эксикоза были выражены умеренно и кратковременно. Симптомы токсикоза купировались, как правило, к 3–5-му дню. Дисфункция кишечника сохранялась более длительно. Продолжительность диареи составила 6,1±0,8 дня. Температура тела повышалась до 38° у 19 (31,1%) пациентов, продолжительность лихорадочного периода составила 3,9±0,4 дня. В первые 3 дня заболевания поступили 54 пациента (88,5%), в более поздние сроки — 7 (11,5%).

Оценка преморбидного фона показала, что среди госпитализированных с ЦКИ только 17 детей (27,9%) относились к группе практически здоровых. У 44 детей (72,1%) отмечались фоновые заболевания: у 23 детей (37,7%) выявлена анемия, у 12 (19,7%) — экссудативный диатез, у 5 пациентов (8,2%) — рахит, у 4 (6,5%) — белково-энергетическая недостаточность. На искусственном вскармливании находились 37 детей (60,7%).

При лабораторном обследовании пациентов с ЦКИ изменения в периферической крови проявлялись снижением уровня гемоглобина в 63,9% случаев, умеренным лейкоцитозом с нейтрофилезом — в 86,9% случаев; у 13,1% пациентов формула крови и общее количество лейкоцитов периферической крови не менялись. Умеренное ускорение СОЭ отмечалось у 57,4% пациентов. У 37 пациентов (60,7%) отмечались изменения в анализе мочи: умеренная лейкоцитурия, альбуминурия. Повышение содержания мочевины более 5,6 ммоль/л выявлено у 15 наблюдаемых пациентов (24,6%). Изменение в копрограмме определялось у 46 (75,4%) (наличие нейтрального жира, непереваренной клетчатки, зерен крахмала, слизи, лейкоцитов).

Наиболее уязвимыми контингентами являются дети от 0 до 3 лет. Вероятно, это связано с тем, что в ранней возрастной группе у детей отмечается функциональная незрелость иммунной системы, ее несовершенство, а также с тем фактом, что большинство заболевших детей имели сопутствующую патологию и отягощенный преморбидный фон. Одна из основных причин заболеваемости ОКИ у детей первого года жизни — неправильное питание (слишком раннее введение прикорма, не соответствующего возрасту младенца). Другой причиной является контакт с родителями, которые могут быть носителями возбудителей, выделяя их во внешнюю среду без каких-либо клинических проявлений. У детей старшей возрастной группы развитию ОКИ способствует употребление инфицированных пищевых продуктов, а также их неправильное хранение (несоблюдение температурного режима), употребление термически недостаточно обработанных продуктов, немытых овощей и фруктов. Если у взрослого человека в подобном случае срабатывает защитный барьер, препятствующий развитию заболевания, то у детей он еще несовершенен. Все это подчеркивает актуальность бактериологических исследований при сравнительно однообразных симптомах кишечных расстройств различной этиологии.

Выводы:

1. Мониторинг ОКИ, вызванных УПФ, показал, что данная патология не имеет тенденции к снижению и является одной из частых причин инфекционных диарей у детей в Гродненской области. Высокая заболеваемость ЦКИ отмечается у детей первых трех лет жизни. Отсутствие специфической профилактики, легкость инфицирования создали предпосылки для роста заболеваемости.

2. Клинические особенности ЦКИ характеризуются острым началом, лихорадкой, диареей. Заболевание протекает в среднетяжелой форме, характеризуется тенденцией к развитию распространенных форм поражения желудочно-кишечного тракта. Детям в возрасте до 1 года свойственно наличие вододефицитного эксикоза. Отсутствует четко выраженная сезонность цитробактерной кишечной инфекции.

3. ЦКИ чаще встречается у детей с неблагоприятным преморбидным фоном. Наиболее уязвимым контингентом являются дети первых лет жизни, находящиеся на искусственном вскармливании, у которых инфекция протекала тяжелее. Клиническое течение ЦКИ зависит от предрасполагающих факторов: белково-энергетической недостаточности, рахита, анемии.

4. При любых вспышках ОКИ, особенно возникающих в детских организованных коллективах, пациентов необходимо обязательно обследовать на УПФ, включая весь спектр известных возбудителей, что позволит оптимизировать не только способы лечения пациентов, но и противоэпидемические мероприятия.

Литература

1. Учайкин, В.Ф. Решенные и нерешенные проблемы инфекционной патологии у детей / В.Ф. Учайкин // Детские инфекции. — 2003. — № 4. — С. 3–7.

2. Мазанкова, Л.Н. Современные аспекты диагностики и лечения острых кишечных инфекций у детей / Л.Н. Мазанкова, Н.О. Ильина // Рос. вестн. перинатол. и педиатр. — 2007. — № 2. — С. 4–10.

3. Горелов, А.В. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых кишечных инфекций у детей: пособие для врачей / А.В. Горелов, Л.Н. Милютина, Д.В. Усенко. — М., 2006. — 91 с.

4. Dennehy, P.H. Acute diarrheal disease in children: epidemiology, prevention, and treatment / P.H. Dennehy // Infect. Dis. Clin. North Am. — 2005. — Vol. 19, suppl. 3. — P. 585–602.

5. Ефимов, Б.А. Характеристика микроорганизмов, колонизирующих кишечник человека / Б.А. Ефимов, Н.Н. Володин, Л.И. Кафарская // Журн. микробиологии. — 2002. — № 5. — С. 98–104.

6. Бондаренко, В.М. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы / В.М. Бондаренко, Т.В. Мацулевич. — М., 2007. — 300 с.

7. Покровский, В.И. Актуальные вопросы терапии и профилактики в условиях эволюции инфекционных заболеваний / В.И. Покровский, В.В. Малеев // Инфекц. болезни. — 2003. — Т. 1, № 1. — С. 6–8.

EPIDEMIOLOGICAL AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF CITROBACTER INTESTINAL INFECTIONS IN CHILDREN

Pronko N.V., Konyuk L.A.

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

The analysis of clinical and epidemiological features of the flow of intestinal infections produced by *Citrobacter freundii* in children. Found that intestinal infections of *Citrobacter freundii* characterized by a tendency to defeat children of early age. High incidence of Citrobacter infection observed in children of the first years of life. In any outbreaks of the acute intestinal infections arising in children groups, patients should be examined for conditionally pathogenic intestinal group that will allow to optimize not only the methods of treatment of patients, but also anti-epidemic measures.

Keywords: children, acute intestinal infections, Citrobacter intestinal infection.

Поступила 13.06.2014

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА И ПРОФИЛАКТИКА ТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА, ПЕРЕДАВАЕМЫХ КЛЕЩАМИ, В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Рудаков Н.В., Ястребов В.К., Рудакова С.А.

Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, Омск, Россия

Реферат. Проанализирована эпидемиологическая ситуация по клещевым трансмиссивным инфекциям человека в Российской Федерации. Наличие общих переносчиков нескольких патогенов обусловливает широкую распространенность сочетанных природных очагов клещевых инфекций. Обоснован комплексный подход к эпидемиологическому надзору, лабораторной диагностике и профилактике клещевых инфекций с учетом степени риска заражения населения.

Ключевые слова: природно-очаговые инфекции, иксодовые клещи, эпидемиология, профилактика.

Введение. С иксодовыми клещами связано существование и передача человеку возбудителей заболеваний вирусной, бактериальной и протозойной этиологии. Обширные территории Евразии

являются ареалом клещей *Ixodes persulcatus* — основного переносчика вируса клещевого энцефалита (КЭ), патогенных для человека боррелий комплекса иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), риккетсий (*R. tarasevichiae*, *R. helvetica*), анаплазм и эрлихий, бартонелл, бабезий и характеризуются сочетанностью природных очагов трех и более трансмиссивных инфекций. Основные переносчики *R. sibirica* и других патогенных риккетсий — клещи родов *Dermacentor* и *Haemaphysalis* [1–6].

К возбудителям природно-очаговых инфекций трансмиссивной природы, распространенным в России, относятся: флавивирусы млекопитающих, передаваемые клещами (КЭ), буньявирусы (Крымская-Конго геморрагическая лихорадка — ККГЛ), представители порядка *Rickettsiales,* боррелии комплекса ИКБ, возбудители туляремии и протозойных заболеваний.

Цель работы — характеристика динамики заболеваемости населения КЭ, ИКБ, клещевым риккетсиозом (КР) в России, их территориального распространения, критериев эндемичности территорий и степени риска заражения населения и совершенствование на этой основе комплексных подходов к профилактике.

Материалы и методы. В основу работы положен сравнительный анализ многолетних эпидемиологических показателей по КЭ, ИКБ, КР, астраханской пятнистой лихорадке (АПЛ), гранулоцитарному анаплазмозу человека (ГАЧ), моноцитарному эрлихиозу человека (МЭЧ), а также результаты изучения природных очагов.

Результаты и их обсуждение. Успех профилактических мероприятий в отношении трансмиссивных инфекций человека, передаваемых иксодовыми клещами (клещевых инфекций), зависит от того, насколько они адаптированы к эпидеметрическим параметрам очаговой территории и учитывают степень риска заражения населения. В современный период установлено широкое распространение сочетанных природных очагов клещевых инфекций, имеющих общие ареалы и переносчиков возбудителей, что служит причиной выявления нескольких патогенов в одном переносчике и проявления микстпатологии у населения. В частности, КЭ регистрируют на 46 из 92 субъектов РФ, ИКБ — на 72, КР — на 16 территориях. КР наряду с КЭ и ИКБ входит в тройку наиболее распространенных инфекций в РФ, передающихся через присасывание иксодовых клещей.

В территориальной структуре этих инфекций имеются отличия: с запада на восток происходит снижение доли ИКБ с нарастанием доли КЭ; в Уральском федеральном округе в структуре появляется КР, доля которого увеличивается на восток, тогда как вклад КЭ и ИКБ в общую структуру клещевых инфекций снижается. В целом отмечена разнонаправленная динамика заболеваемости этими тремя клещевыми инфекциями в РФ (рисунок).

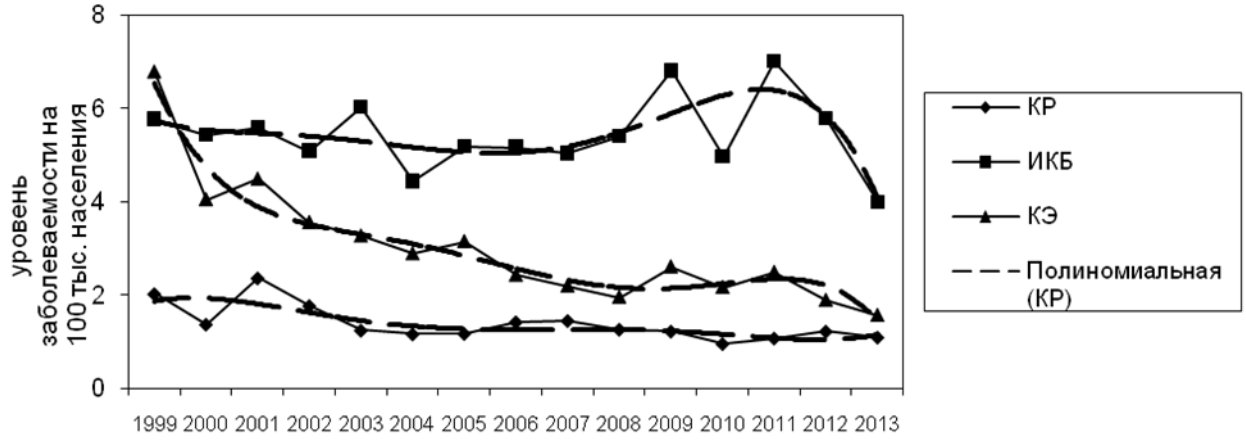


Рисунок — Динамика заболеваемости КЭ, ИКБ, КР в РФ за 1999–2013 гг.

КЭ — одна из наиболее актуальных и широко распространенных природно-очаговых инфекций в РФ. Заболеваемость населения КЭ в РФ в 2013 г. снизилась на 17,9% по сравнению с 2012 г. и составила 1,6 на 100 тыс. населения (2236 случаев против 2716 в 2012 г., показатель 1,9). Городские жители составили в 2013 г. 68,4% заболевших КЭ, в т. ч. дети до 17 лет — 9,3%.

В общей сумме заболеваний КЭ преобладала в 2013 г. доля Сибирского федерального округа: 1295 случаев, или 57,9%; Уральский ФО составил 14,0%; Северо-Западный — 12,9%; Приволжский —

12,1%; Центральный — 1,7%, причем заболевания регистрировались преимущественно в Костромской и Ярославской областях; Дальневосточный — 1,4%; в Южном и Северо-Кавказском регионах КЭ не зарегистрирован. В Сибирском ФО наиболее высокие показатели заболеваемости КЭ отмечались в Красноярском крае (15,4), Томской области (15,0), Республиках Хакасия (12,6), Алтай (10,5), Тыва (10,0). В рамках географической территории Западной Сибири в 2013 г. зарегистрировано 656 заболеваний КЭ, т. е. 29,3%. Это свидетельствует о том, что в настоящее время эпидемиологическое значение Западной Сибири по сравнению с 1948–1960 гг. снизилось, поскольку в те годы этот показатель составлял 45,2%.

В целом в 2013 г. КЭ зарегистрирован в 46 субъектах РФ из 92 (в 1992 г. — в 40), в т. ч. на 19 территориях Сибири и Дальнего Востока, включая Тюменскую область и Ханты-Мансийский АО.

Показатель заболеваемости ИКБ в 2013 г. снизился на 31,2% по сравнению с 2012 г. и составил 3,99 на 100 тыс. населения (5712 случаев против 8288 в 2012 г., показатель 5,8). В общей сумме заболеваний ИКБ в 2013 г. 25,7% приходилось на Центральный ФО; Сибирский составил 24,8%; Уральский — 15,9%; Приволжский — 14,1%; Северо-Западный — 13,7%; Дальневосточный — 3,8%; Южный — 1,4%; Северо-Кавказский — 0,6%. Городские жители составили 80,6% заболевших ИКБ, в т. ч. дети до 17 лет — 9,3%. Нозоареал ИКБ значительно обширнее, чем КЭ.

Количество зарегистрированных в РФ заболеваний ИКБ в последние 5 лет в 2,5–3 раза превышало таковое при КЭ. По показателям заболеваемости ИКБ в Сибирском ФО лидирующее место занимали те же территории, что и при КЭ: Томская область (15,6), Республика Тыва (33,9), Хакасия (14,5), Алтай (11,0); в Уральском ФО — Свердловская область (16,1); в Приволжском — Пермский край (11,6), Кировская область (10,4), Удмуртская Республика (9,0); в Северо-Западном — Волгоградская (17,5) и Калининградская (14,7) области.

Вызываемую *R. sibirica* инфекцию называют клещевой риккетсиоз (КР), или сибирский клещевой тиф (СКТ). Начиная с 1936 г. в РФ зарегистрировано более 70 тыс. случаев СКТ. Переносчики — клещи родов *Dermacentor* и *Haemaphysalis*, очаги распространены в Азиатской части России, Казахстане, Монголии, Китае. Наряду с распространенным патогенным генотипом — *R.sibirica sensu stricto,* в нозоареале КР на Дальнем Востоке РФ и в Китае — в клещах *D. silvarum* выявляют генотип *R.sibirica BJ-90*, возможная патогенность которого для человека показана в последние годы [7–9]. Основная часть заболеваний КР в 2013 г. традиционно регистрировалась в Сибирском ФО и составила 82,8%, в т. ч. 35,2% в Алтайском крае; на Дальневосточный ФО приходилось 17,1%. Сельские жители составили в 2013 г. 64,0%, из них дети до 17 лет — 31,5%.

В прошлом преобладал моноказуальный подход: один возбудитель (*Rickettsia sibirica*) — одна нозологическая форма — сибирский клещевой тиф. Сейчас в России выявлено еще 6 видов патогенных для человека риккетсий, экологически связанных с иксодовыми клещами — *R. conorii subsp. caspiensis, R. heilongjiagensis, R. helvetica, R. aeschlimannii, R. slovaca, R. raoultii* [5].

Наряду с тремя основными клещевыми инфекциями диагностируют гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ), моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ), Крымская-Конго геморрагическую лихорадку, клещевые случаи омской геморрагической лихорадки (ОГЛ) и туляремии (в отдельные годы), микст-формы клещевых инфекций.

В последние годы выявлены новые виды боррелий, роль которых в патологии человека уточняется *(B. spielmanii, B. miyamotoi)*. Основным вектором патогенных боррелий являются клещи *I. persulcatus I. Ricinus*-комплекса, хотя имеются также данные об инфицированности клещей родов *Dermacentor* и *Haemaphysalis* и их возможной роли в циркуляции боррелий и их передаче при присасывании клещей [10]. Основным видом выявляемых в иксодовых клещах бартонелл является *B. henselae*, реже — *B. quintana*; вопрос о заболеваниях людей, связанных с передачей бартонелл при присасывании клещей, не имеет однозначной интерпретации. Выявление целого ряда новых клещевых патогенов требует новых алгоритмов лабораторной верификации диагнозов на весь спектр клещевых инфекций человека с использованием ИФА- и ПЦР-технологий с исследованием снятых с пациентов переносчиков и превентивной терапией инфекций и инвазий в сочетанных очагах.

С 01.01.2013 г. приказом Росстата № 645 от 20.12.2012 г. утверждена статистическая отчетность по форме № 1 дополнительно по Астраханской пятнистой лихорадке (АПЛ), ГАЧ и МЭЧ. По данным 2013 г. выявлена заболеваемость 7 нозологическими формами клещевых инфекций, более половины случаев приходится на ИКБ, на КЭ — 22,1%, на клещевые риккетсиозы — 19,3% (КР —

15,4% и АПЛ — 3,9%). ГАЧ в структуре клещевых инфекций в РФ составила 1,6%, ККГЛ — 0,85%, МЭЧ — 0,2%.

Заболеваемость клещевыми инфекциями носит циклический характер, который, с одной стороны, определяется меняющимся лоймопотенциалом очагов, а с другой — сочетанием социальных и сезонных факторов, ведущих к повышению или снижению риска заражения.

Эндемичная по клещевым инфекциям территория — очаговая территория с наличием устойчиво функционирующих эпидемически активных очагов этой инфекции. Критерии эндемичности территории должны включать среднемноголетние показатели заболеваемости и ее повторяемости. Основные эпидемиологические и эпизоотологические критерии должны быть использованы для отнесения конкретных территорий к одной из трех эпидемиологических зон по степени риска заражения населения — высокого, среднего, низкого [11, 12].

В каждой из эпидемиологических зон рекомендуется определенный комплекс профилактических мероприятий, состав которых может подвергаться частичной корректировке, исходя из учета возможных особенностей территорий. Применительно к КЭ наиболее полный комплекс профилактических мероприятий рекомендуется для очаговых территорий, отнесенных к эпидемиологической зоне высокого риска заражения. Вакцинопрофилактика должна проводиться прежде всего угрожаемым контингентам в каждой из эпидемиологических зон. Противоклещевые обработки путей коммуникации в лесных ландшафтах, в местах размещения летних оздоровительных учреждений и массового отдыха населения, участков, характеризующихся наибольшей частотой заражений населения, должны проводиться с учетом региональных эколого-эпидемиологических особенностей.

Выделяют неспецифическую профилактику (борьба с переносчиками, использование средств индивидуальной защиты), экстренную серопрофилактику (введение в случае присасывания инфицированных клещей противоклещевого иммуноглобулина), специфическую вакцинопрофилактику (использование инактивированной вакцины), превентивную терапию при ИКБ, КР, ГАЧ и МЭЧ (применение антибиотиков) [13]. Несомненно, на заболеваемость КЭ влияет уровень популяционного иммунитета, который повышается при массовой вакцинации населения, а также экстренная серопрофилактика.

Эпидемиологический надзор включает выявление природных очагов, наблюдение за их эпизоотической активностью и риском заражения людей с целью проведения необходимых профилактических мероприятий. В основе эпидемиологического надзора, диагностики и профилактики клещевых инфекций должен быть положен комплексный подход, включающий мониторинг паразитарных систем, слежение за эпидемическим процессом, оптимизацию мер профилактики и прогнозирование тенденций изменений активности природных очагов. При эпидемиологическом надзоре за клещевыми трансмиссивными инфекциями необходимо учитывать сочетанность природных очагов.

Наличие общих переносчиков различных патогенов, зачастую в единой паразитарной системе, обусловливает широкую распространенность сочетанных природных очагов клещевых инфекций в различных вариациях, что следует учитывать при мониторинге очагов, эпидемиологическом надзоре, диагностике и профилактике этих инфекций.

Совместно с ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора разработан проект санитарно-эпидемиологических правил «Профилактика клещевого вирусного энцефалита, клещевых риккетсиозов и боррелиозов». В них заложен комплексный подход к эпидемиологии, лабораторной диагностике и профилактике клещевых трансмиссивных инфекций на территориях с различной степенью риска заражения населения. Основы превентивной терапии КЭ, основанной на экспресс-диагностике, заложены работами Омского НИИ природно-очаговых инфекций совместно с пермскими специалистами в очаге КЭ в г. Перми в 80-е гг. Разработанная тактика профилактики КЭ, основанной на дифференцированном подходе к назначению специфического Ig с учетом оценки индивидуального риска заражения людей по результатам исследования в ИФА присосавшихся переносчиков, рекомендована СП 3.1.3.2352-08 «Профилактика клещевого энцефалита» (п. 7.4.) и используется на эндемичных территориях субъектов РФ [14]. Указанный подход в дальнейшем был распространен и на другие передаваемые иксодовыми клещами инфекции и инвазии.

Выводы:

1. В настоящее время в РФ регистрируют 7 инфекций, передаваемых иксодовыми клещами. ИКБ регистрируют на территориях 72 субъектов РФ, КЭ и ИКБ — на 48, три инфекции (ИКБ, КЭ

и КР) — на 16. Наряду с этим выявлены заболевания ГАЧ, МЭЧ, Крымской-Конго геморрагической лихорадкой.

2. В структуре заболеваемости клещевыми инфекциями в РФ в 2013 г. 56,0% приходилось на ИКБ, 22,1% — на КЭ, 19,3% — на клещевые риккетсиозы (КР и АПЛ).

3. Разработаны эпидемиологические и эпизоотологические критерии эндемичности территорий по клещевым инфекциям, позволяющие осуществлять зонирование территорий по степени риска заражения населения.

4. Обоснован комплексный подход к эпидемиологическому надзору, лабораторной диагностике и профилактике клещевых инфекций с учетом сочетанности природных очагов и степени риска заражения населения.

5. К настоящему времени разработаны достаточно эффективные методы специфической и неспецифической профилактики и лабораторной диагностики клещевых инфекций, которые при правильной тактике применения способны значительно снизить заболеваемость населения.

Литература

1. Коренберг, Э.И. Клещевой энцефалит / Э.И. Коренберг // Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке. — М., 2003. — С. 387–404.

2. Коренберг, Э.И. Иксодовые клещевые боррелиозы / Э.И. Коренберг // Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке. — М., 2003. — С. 376–386.

3. Выявление в России природных очагов бабезиоза и гранулоцитарного эрлихиоза / S.R. Telford [и др.] // Журн. микробиол. — 2002. — № 6. — С. 21–25.

4. Новые данные о выявлении эрлихий и анаплазм в иксодовых клещах в России и Казахстане / С.Н. Шпынов [и др.] // Мед. паразитол. — 2004. — № 2. — С. 10–13.

5. Риккетсии и риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки в Сибири / Н.В. Рудаков [и др.] // Омск: Издательский центр «Омский научный вестник», 2012. – 288 с.

6. Сочетанный природный очаг четырех трансмиссивных природноочаговых инфекций в ареале клещей *Haemaphysalis concinna* в Красноярской крае / Т.Г. Хазова [и др.] // Актуальные аспекты природноочаговых болезней: Материалы межрегиональной, научно-практической конференции. — Омск, 2001. — С. 3–5.

7. Клинико-эпидемиологический анализ результатов выявления антител к различным видам риккетсий у больных с подозрением на клещевую нейроинфекцию в северных районах Омской области / Н.А. Пеньевская [и др.] // Сибирский мед. журн. — 2009. — № 8. — С. 48–53.

8. Апробация иммуноферментного анализа для серологической диагностики инфекций, вызываемых риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки / Н.В. Абрамова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2010. — № 1 (50). — С. 17–22.

9. *Rickettsia sibirica subspecies BJ-90* as a cause of human disease / N. Jia [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2014. — Vol. 369, № 12. — P. 1176–1178.

10. Рудакова, С.А. Молекулярно-генетические аспекты изучения ИКБ в Сибири / С.А. Рудакова // Инфекции, передаваемые клещами в Сибирском регионе. — Новосибирск: Издательство СО РАН, 2011. — С. 216–228.

11. Ястребов, В.К. Оптимизация системы эпидемиологического надзора и профилактики клещевого вирусного энцефалита / В.К. Ястребов, Т.Г. Хазова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2012. — № 1 (62). — С. 19–24.

12. МУ 3.1.1755-03 «Организация эпидемиологического надзора за клещевым риккетсиозом»: Методические указания. — М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. — 20 с.

13. Коренберг, Э.И. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами в лесной зоне, и стратегия их профилактики: изменение приоритетов / Э.И. Коренберг // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2013. — № 5 (72). — С. 7–17.

14. Пеньевская, Н.А. Оценка эффективности этиотропной профилактики инфекций, передающихся иксодовыми клещами: проблемы теории и практики / Н.А. Пеньевская; под ред. Н.В. Рудакова. – Омск: Издательский центр «Омский научный вестник», 2010. — 232 с.

EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS AND PREVENTION OF TRANSMISSIBLE TICK-BORNE INFECTIONS IN RUSSIAN FEDERATION

Rudakov N.V., Yastrebov V.K., Rudakova S.A.

Omsk Research Institute of Natural Foci Infections of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), Omsk, Russia

Analysis of the epidemiology of tick-borne human infections held in the Russian Federation. The presence of common vectors of various pathogens determines the high prevalence combined natural foci of tick-borne infections. Complex approach to surveillance, laboratory diagnosis and prevention of tick-borne infections justified taking into account the degree of risk of infection of the population.

Keywords: natural focal infections, ticks, epidemiology, prevention.

Поступила 10.07.2014

ИЗ ИСТОРИИ ИЗУЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В БЕЛОРУССИИ

Рытик П.Г.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Настоящая работа посвящена ретроспективному обобщению результатов 10-летнего периода изучения ВИЧ-инфекции, проводившегося преимущественно сотрудниками одной лаборатории БелНИИЭМ (в настоящее время — государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»). Работа велась самостоятельно и совместно с сотрудниками других исследовательских учреждений: Института вирусологии РАМН им. Д.И. Ивановского (Москва, РФ), Института физиологической химии Университета г. Майнца (Германия), Центров контроля и профилактики заболеваний (СДС) (Атланта, США), Национального института неврологических заболеваний и параличей (Бетесда, США) и Института тропической медицины (Антверпен, Бельгия). В статью включены результаты наблюдений за развитием эпидемического процесса ВИЧ-инфекции, оценки достоверности лабораторно-диагностических тестов, биологическим свойствам циркулирующих в республике штаммов ВИЧ, конструировании лабораторной модели ВИЧ-инфекции на тканевых культурах и животных, анализу особенностей клинических проявлений СПИДа у человека, поиску новых эффективных лекарственных средств и схем лечения инфекции. Рамки статейного изложения не позволяют детально остановиться на освящении полученных фактов. Они достаточно полно отражены в прилагаемом списке самостоятельных научных публикаций.

Ключевые слова: ВИЧ, СПИД, модель, диагностика, лечение, эпидемиология.

Введение. Пожалуй, редко в истории медицины можно найти примеры такой интенсивной и хорошо организованной противоэпидемической работы, как это имело место при обнаружении первых заболевших СПИДом. В довольно короткий срок был установлен возбудитель болезни, изучена его генетическая структура, было найдено или сконструировано несколько эффективных лекарственных средств, отработана схема их применения на разных стадиях инфекционного процесса, ведется интенсивная исследовательская работа по созданию различных по своей конструкции вакцинных и диагностических препаратов, налажен эпидемиологический контроль. Все это не замедлило благоприятно сказаться на эпидемической ситуации. Тем не менее, ВИЧ-инфекция продолжает оставаться серьезной глобальной проблемой. Прежде всего потому, что летальный исход болезни предупредить пока не удается. Удачно подобранная схема лечения, своевременная замена препаратов помогают лишь существенно продлить и ослабить клиническое проявление инфекции, но не прерывают жизненный цикл самого возбудителя в организме заразившегося. Главной преградой на пути совершенствования лечебно-профилактических мер является сильно выраженная у ВИЧ тропность к человеческому организму. На сегодня установлено, что характерные для человека проявления инфекции могут быть воспроизведены лишь у человекообразных обезьян — шимпанзе. Другие животные, как правило, к ВИЧ не восприимчивы. Лишь в редких, совершенно исключительных случаях, вирус может размножаться и какое-то время сохраняться в их организме, не проявляясь клинически. Этот факт — инертность животного мира к ВИЧ — существенно тормозит изыскательскую работу по оценке качества создаваемых средств лечения и профилактики СПИДа: каждое из них перед апробацией на человеке должно быть тщательно проверено на восприимчивом животном. Моделирование ВИЧ-инфекции на доступных лабораторных животных, оценка возникающих в их организме патологических и морфологических процессов стали приоритетными направлениями научных изысканий последних лет. Достигнутые в этом отношении успехи очевидны, обнадеживающие, хотя пока и не столь демонстративны.

СПИД как самостоятельная нозологическая форма инфекционной болезни был обнаружен и зарегистрирован в США в 1981 г. В 1985 г. после испытания первой диагностической лабораторной тест-системы стало ясно, что эта инфекция носит пандемический характер. Вряд ли можно отыскать другой исторический пример, когда неизвестная ранее форма патологии человека вызвала бы такую бурную реакцию со стороны медицинской общественности во всем мире. Для решения связанных со СПИД проблем были привлечены исследовательские коллективы в США, Франции, Германии, Великобритании и других странах. В СССР, в т. ч. в Беларуси, первые признаки ВИЧ-

инфекции появились в 1986 г. В мае этого года БелНИИЭМ осуществил первый поиск инфицированных (И.Н. Воинов, П.Г. Рытик). С помощью импортных образцов иммуноферментного диагностического теста (ИФА) было обследовано около 200 человек, содержавшихся в местах заключения. Среди них инфекцию не обнаружили. Однако уже в сентябре 1986 г. был выявлен первый инфицированный ВИЧ. Им оказался приехавший на учебу в Минск житель Бурунди. На следующий год ВИЧ-инфекция была диагностирована у коренной жительницы Беларуси, которая за несколько месяцев до этого имела половые контакты с инфицированным иностранцем — жителем одной из африканских стран. В свое время (1990 г.) распоряжением Минздрава на территории республики была создана сеть специальных диагностических лабораторий, в прямые обязанности которых входил поиск ВИЧ-инфицированных в закрепленном регионе. Только за 4 года (1991 г. — ноябрь 1994 г.) было обследовано 158 590 человек и выявлено 42 инфицированных. Всего же к 1995 г. в Беларуси было обнаружено 108 инфицированных (из них 59 — коренные жители, 49 — иностранцы). Интенсивный суммарный показатель инфицированности коренного населения в этот период составил 6 человек на 1 млн жителей (в 1500–1700 раз ниже, чем в некоторых странах Западной Европы и Северной Америки, например, Франции и США).

Серологическая лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции

Основное внимание лаборатории по изучению СПИД в БелНИИЭМ в первые годы своего существования было сосредоточено на серологическом контроле ВИЧ-инфекции в республике [1–23]. При этом преследовались две цели: 1) определить истинный уровень инфицированности местных жителей, т. е. получить представление о реальной напряженности эпидемической ситуации в Беларуси; 2) дать оценку коммерчески доступным диагностическим препаратам, осуществить научные разработки по созданию отечественных тест-систем.

Оценка создавшейся эпидемической ситуации будет представлена позднее, после того, как будут приведены результаты серологического контроля. Что же касается проверки качества (чувствительности и специфичности) диагностических тестов, то первыми подверглись проверке препараты четырех отечественных фирм-производителей: «Антиген», «Вектор», «Пептоскрин», «Эпитоп». Все они выпускали диагностические наборы для иммуноферментного анализа (ИФА). Положительные в ИФА сыворотки крови проверялись нами дополнительно с помощью теста иммуноблоттинга (ИБ). Всего было испытано 28407 сывороток крови, 48 из которых имели явные признаки сероконверсии. Наиболее высокие показатели качества (чувствительность — 99–100%, специфичность — 96%) имели диагностикумы, производимые фирмами «Антиген» и «Эпитоп» [8, 9]. Последующий анализ позволил отдать предпочтение ИФА-препаратам, производимым фирмой «Антиген» [4]. Минздравом была поставлена задача разработать ИБ-тест. В течение сравнительно короткого срока (1,5 года) лабораторией были отработаны оптимальные условия для максимального накопления местного высокорепродуктивного штамма ВИЧ (штамм ВИЧ-lzmb), изучены параметры инактивации вирусного лизата, подобраны условия для электрофорезного разделения вирусоспецифических белков, их переноса и закрепления на нитроцеллюлозной подложке [24, 25]. Результатом этой НИР стало создание отечественной тест-системы «БелВИЧ-1 Блот». Уже в 1999 г. БелНИИЭМ было произведено и реализовано десять первых наборов этого диагностикума.

Как показали наши наблюдения за динамикой сероконверсии у инфицированных лиц, положительная реакция ИФА существенно опережает по срокам развития положительную реакцию ИБ. Было установлено [5, 26, 27], что в ранние сроки инфекции, по крайней мере, на протяжении первых 3 мес. после заражения, последняя нередко (по нашим данным, в 18–20% случаев) дает ложнонеопределенные и даже ложноотрицательные результаты. В таких случаях представляется вполне допустимым, что положительный результат ИБ может базироваться на присутствии в крови обследуемого антител даже к одному (вместо двух регламентированных) из поверхностных вирусоспецифических гликопротеинов (gpl60 или gp120/110 или gp41) и не менее чем к двум внутренним структурным белкам ВИЧ (p17, p24, p31, p55, p66). Наши данные были учтены и регламентированы в инструкции.

Затруднения в интерпретации результатов серологического обследования встречаются не так уж редко. В нашей практике имели место случаи, когда даже использование обоих тестов (ИФА и ИБ) оставляло спорным вопрос о диагнозе. Мы показали, что в таких случаях целесообразно использование тестов, основу которых составляют молекулярно-биологические механизмы взаимоотношения вируса и клетки. Иллюстрацией этому могут послужить следующие результаты [2, 3, 6,

7, 11, 17, 28]. В течение 3 лет велись наблюдения за семейной парой, которая, побывав в длительной зарубежной командировке, оказалась инфицированной ВИЧ. Каждого из супругов периодически обследовали серологически (ИФА, ИБ, реакция непрямой иммуно-флюоресценции) и вирусологически (изоляция вируса, полимеразно-цепная реакция (ПЦР)). Уже в самом начале обследования мы столкнулись с фактом необычного развития сероконверсии. Так, после 3-кратного подтверждения диагноза у обоих супругов с помощью ИФА стали обнаруживаться различия в проявлении реакции ИБ: у мужа (Sm) она постоянно, на протяжении всех 3 лет, выявляла весь спектр диагностически значимых антител к p17, p24, p55/51, p66, gp41, gp120, тогда как у жены (Sf) большинство антител (за исключением p55/ 51) перестали выявляться уже спустя 2 мес., а через 8 мес. они исчезли совсем. К этому сроку ИФА у обследуемой тоже стал отрицательным. Сокультивирование полученных от супругов лимфоцитов с перевиваемыми клеточными лимфоидными линиями CEEM-SS и C-8166 позволило тем не менее обнаружить присутствие ВИЧ у обоих обследуемых (5–7% инфицированных клеток). Осуществленный после 2 лет наблюдения анализ крови наших пациентов с помощью ПЦР также подтвердил наличие в лимфоцитах провирусной ДНК ВИЧ-1. Инфицированность ВИЧ пациентки Sf перестала вызывать сомнение. Однако все последующие результаты исследований ее крови иммуноферментным методом и с помощью ПЦР неизменно были отрицательными. На 4-м году наблюдения диагноз «ВИЧ-инфекция» у пациентки комиссионно был снят. Последующие 5 лет контроля подтвердили правильность вынесенного заключения. По-видимому, положительные результаты вирусологического обследования пациентки и ПЦР на первом этапе эпидемиологического расследования явились следствием лабораторной контаминированности исследуемых образцов крови.

Эпидемиологические особенности ВИЧ-инфекции в Беларуси

Пристальный интерес к серодиагностике СПИД закономерен и вполне оправдан: лишь с ее помощью можно составить более или менее объективное мнение о сложившейся в стране эпидемической ситуации. Следует подчеркнуть, что на первом этапе исследований (1990 г.) медицинская общественность республики имела слабое представление о наличии инфекции на ее территории, возможных путях распространения и степени охвата ею жителей Беларуси. К тому же Всемирная организация здравоохранения, основываясь на выявленных в других странах мира эпидемиологических и социальных особенностях заболевания, предложила своеобразную, не соответствующую канонам классической эпидемиологии, методику учета и анализа СПИД: в расчет принимать лишь тех лиц, у которых инфекция достигла кульминации, т. е. проявилась клинически. Но уже к 1985 г., когда были приготовлены и апробированы первые отечественные диагностические препараты, стало ясно, что манифестная, т. е. клинически выраженная форма инфекции представляет собой лишь небольшую (около 10%) часть когорты заразившихся ВИЧ. Учитывая это, на протяжении первых 6 лет (1987–1993 гг.) с нашим участием диагноз ВИЧ-инфекция серологически был установлен у 100 человек. Лишь после этого можно было приступать к эпидемиологическому анализу. Результаты этих исследований изложены в работах [5, 8–10, 12, 13, 19, 21, 22, 26, 27, 29–36].

Как уже отмечалось, первый ВИЧ-инфицированный в Беларуси иностранец был обнаружен в ноябре 1986 г. Спустя год была выявлена инфицированная и среди коренных жителей Беларуси. Всего за первые 2 года работы лаборатории был выявлен 31 инфицированный. Почти половина из них (14 человек) были жителями различных регионов Африки. К этому времени сотрудники нашей лаборатории приобрели опыт выделения возбудителя СПИД. Уже в 1988 г. было изолировано (это было первое выделение ВИЧ в СССР) 6 штаммов от иностранцев, а на следующий год — еще 2 штамма вируса от коренных жителей.

Серологические и вирусологические данные позволяют оценить начальный этап развития эпидемии в Беларуси как период относительного эпидемического благополучия. Длился он 9 лет (1987–1995 гг.). За это время было выявлено 113 инфицированных, в т. ч. 15 лиц со СПИДом. Большинство заразившихся (76 человек, или 67,3%) проживали в Минске. Ведущим путем распространения инфекции являлся гетеросексуальный, а основным источником инфекции служили прибывающие в страну студенты из стран Африки. Так, среди 14 946 994 обследованных коренных жителей Беларуси было выявлено лишь 64 инфицированных (4,3 на 1 млн обследованных), тогда как среди иностранцев этот показатель составлял 607,7$\%_{0000}$ (46 человек из 75700 обследованных), т. е. инфицированные обнаруживались в 140 раз чаще. Еще более разительными эти различия были при уче-

те заболевших СПИД. Так, по состоянию на 1 января 1995 г. показатель заболеваемости (в расчете на каждый миллион жителей) в США был равен 1515,5, в Испании — 705,5, во Франции — 552,6, в Италии — 424,1, в Германии — 156,7, тогда как в Беларуси он составлял лишь 1,1%$_{0000}$.

На территории СССР эпидемическая ситуация вплоть до 1996 г. также оставалась относительно благополучной. Например, в России на 1 января 1995 г. на учете состоял 1321 инфицированный (18,4 на 1 млн населения), в Украине — 398 человек, Литве — 29, Латвии — 25, Эстонии — 44, в Беларуси — 105.

Как мы уже отмечали, самый высокий показатель инфицированности приходился на прибывших в Беларусь иностранцев (607,7%$_{0000}$). Второе место удерживали лица, отнесенные к категории наркоманов (69,7%$_{0000}$). Довольно часто (21,1%$_{0000}$) инфекция обнаруживалась среди лиц с венерическими заболеваниями и лиц, находившихся в местах заключения (15,6%$_{0000}$). Самым низким этот показатель был у соматических пациентов, проходивших курс стационарного лечения.

В 1996 г. спорадический характер инфекционного процесса внезапно сменился эпидемическим. Было зарегистрировано резкое увеличение числа инфицированных в Светлогорском районе Гомельской области: с помощью ИФА в июле–августе 1996 г. было выявлено 532 серопозитивных лица (обследовано 1229 человек). У 318 из них диагноз был подтвержден ИБ-тестом. Почти все инфицированные свидетельствовали об употреблении наркотических средств или имели очевидные признаки внутривенных инъекций.

Вспышка ВИЧ-инфекции в Гомельской области коренным образом изменила эпидемическую ситуацию в республике: количество инфицированных в течение одного года увеличилось со 113 (кумулятивные данные за 1987–1995 гг.) до 1021 человека. Таким образом, 1996 г. можно считать началом нового периода в развитии эпидемического процесса в Беларуси — периода эпидемического неблагополучия. К середине 1998 г. общее количество ВИЧ-инфицированных достигло 2095 человек. Интенсивный показатель инфицированности в республике увеличился в 20 раз и достиг 204,9%$_{0000}$, а в Гомельской области он вплотную приблизился к уровню наиболее пораженных стран Европейского континента. Так, на Гомельскую область в начале 1998 г. приходилось 83,2% выявленных инфицированных в стране, тогда как еще за 2 года до этого жители области составляли лишь 8,9% от общего числа зарегистрированных серопозитивных лиц. Сегодня (по состоянию на 1 января 2014 г.) в Беларуси проживает 15711 заразившихся. Половина из них (7567 человек) по-прежнему приходится на жителей Гомельской области (165,9 и 382,2 на 100 тыс. человек соответственно).

Анализ возрастной структуры инфицированных свидетельствует о явном увеличении долевого участия в эпидемическом процессе лиц юношеского и подросткового возраста: почти отсутствовавшая (0,9%) в годы эпидемического благополучия прослойка подростков (15–19 лет) к началу 1998 г. достигла небывало высокого показателя (21,0%).

Уже этих двух эпидемиологических особенностей (концентрация заразившихся на ограниченной территории и резкое «омоложение» инфекции) было достаточно, чтобы допустить возможность внезапной смены ранее превалировавшего в стране пути инфицирования (гетеросексуальные контакты) на другой, более часто реализуемый. Это предположение подтвердилось: долевое участие в эпидемическом процессе наркоманов в целом по республике увеличилось с 7,0 (до 1996 г.) до 83,0% (данные на конец 1998 г.). Эпидемиологическое изучение отдельных очагов инфекции дало дополнительные доказательства того, что парентеральный путь заражения ВИЧ в республике становился доминирующим.

Этиология СПИД (биологические свойства вируса иммунодефицита человека)

Всего сотрудниками лаборатории было изолировано 26 штаммов HTLV-III (или ВИЧ-1). Все они были доведены до чистой культуры и пассировались на перевиваемых Т-лимфобластоидных и моноцитарных клетках (главным образом H9, Molt$^4/_8$, CEM-SS, Jurkat-tat 3, Hut-78). Большинство (19) изолятов были выделены от вирусоносителей. Два вирусных штамма (zmb и Sh, оба изолированы от бессимптомных вирусоносителей) отличались высокой репликативной активностью и были отнесены к "high/rapid" культуральному типу. Остальные 24 штамма, в т. ч. и те 7, которые были изолированы от лиц с клиническими проявлениями, размножались слабо на всех клеточных линиях и отнесены к "slow/low" типу. По вполне понятным соображениям (желание иметь в своей коллекции местный штамм, который мог бы быть использован для конструирования диагностической тест-системы), мы сосредоточили свое внимание на изучении свойств "high/rapid" штаммов. Далее будут кратко представлены результаты исследований, касающихся биологических свойств местных изолятов [2, 3, 12, 25, 28, 37–41].

Как уже упоминалось, высокорепликативные штаммы ВИЧ-lzmb и ВИЧ-lSh были изолированы нами из крови бессимптомных вирусоносителей (Z, Sh), что противоречило представлениям большинства исследователей (по их мнению, такие изоляты могли быть получены лишь от лиц со СПИДом). Удивительным и до сих пор необъясненным остается тот факт, что на протяжении последующего длительного срока наблюдения за этими же вирусоносителями (пациент Z обследовался 3, а Sh — 2 раза) от них выделялись только низкорепродуктивные штаммы типа "slow/low". Параллельное изучение свойств первых изолятов показало, что у штамма от вирусоносителя Z (он получил название ВИЧ-lzmb) биологическая активность была выражена четче, чем у штамма от пациента Sh. Именно поэтому ему было отдано предпочтение.

Штамм ВИЧ-lzmb активно размножался, вызывая цитопатический эффект во всех испытанных клеточных культурах (C-8166, H9, Hut-78, CEM.SS, $Molt^4/_8$, MT4, Jurkat, Jurkat-tat 3, U973, ЛПК). Электронно-микроскопическое исследование срезов инфицированных лимфоидных клеток выявило наличие в них зрелых вирионов диаметром 110–120 нм с электронно-плотной конусовидной сердцевиной. Вирус имел плавучую плотность, равную 1,19 г/см^3 (градиент хлорида цезия), 1,14 г/см^3 (урографин), 1,16–1,18 г/см^3 (сахароза). Электрофоретическое исследование очищенного ВИЧ-lzmb в полиакриламидном геле выявило присутствие в препарате 8 вирусоспецифических белков с молекулярным весом 120, 65, 55, 51, 41, 32, 24 и 17 кД. Все эти данные позволили сделать заключение о принадлежности изолята к семейству ретровирусов со свойствами, характерными для HTLV-III (ВИЧ-1). В 1990 г. этот вывод был подтвержден независимым исследованием С.С. Маренниковой и др. [37], в котором культуральные свойства штамма zmb сравнивались с эталонным штаммом IIIB. Характер накопления антигенов ВИЧ в жидкой фракции обеих вирусных культур оказался сходным, тогда как клеточный антиген штамма zmb несколько отставал от штамма IIIB как количественно, так и по времени накопления. Авторы делают заключение, что выделенный нами штамм ВИЧ-lzmb, бесспорно, может рассматриваться как кандидат для практического использования в производственных целях. С 1998 г. штамм ВИЧ-lzmb используется сотрудниками лаборатории для организованного нами производства подтверждающего диагноз теста «БелВИЧ-1 Блот» и для испытаний противовирусной активности у лекарственных средств и дезинфектантов.

Патогенез ВИЧ-инфекции

Представляется вполне закономерным, что изучение отдельных сторон инфекционного процесса (эпидемиологические и иммунологические аспекты, наблюдаемые *in vitro* и *in vivo*, биологические особенности этиологического агента, механизмы подавления репликации ВИЧ и, наконец, особенности клинического проявления инфекции у человека и животных) неизбежно ведут хотя бы к частичному прояснению механизма развития патологического процесса, т. е. раскрытию патогенеза инфекции. Мы также занялись выяснением некоторых сторон патогенеза СПИД [8, 42–59]:

1. Какова патоморфологическая основа наблюдаемых нарушений со стороны центральной нервной системы (деменция, с которой связаны двигательные расстройства, нарушения восприятия, познавательные расстройства и изменения личности) у лиц, больных СПИДом?

2. Следует ли считать абсолютным постулат о тропности ВИЧ к организму человека? Другими словами, способен ли ВИЧ переживать (в любой форме) в организме не только человека, но и животного, вызывая в нем патологические изменения?

3. Как быстро развивается феномен интеграции генома ВИЧ в геном инфицированной клетки-хозяина? Зависит ли этот процесс от инфицирующей дозы, а также от морфологических особенностей ткани пораженных органов?

Располагая полученным в одном из исследовательских институтов США опытом приготовления первичных тканевых культур из ткани мозга человека, мы предприняли попытку морфологического и вирусологического контроля над мозговой тканью после ее инфицирования высокорепликативным штаммом ВИЧ-1 (rapid/high). Цель такого эксперимента — выяснить, являются ли нервные клетки (в частности, астроциты) прямой мишенью для ВИЧ.

Приготовленные нами первичные монослойные культуры из биоптатов мозговой ткани взрослого человека формировались в течение 14–20 дней и на 89–92% состояли из протоплазматических и фиброзных астроцитов, на 8–11% из фибробластов и макрофагоподобных клеток. В качестве инфицирующего агента использовали штамм ВИЧ-1 IIIB. Инфицирование осуществляли двумя методами — культуральной жидкостью (титр — 5 lg $ТЦД_{50}$) и лимфобластоидными клетками-продуцентами ВИЧ.

Вирусологический контроль осуществляли с помощью реакции непрямой флюоресценции (поиск антигена), контроля за обратно-транскриптазной активностью и наличием в ткани ДНК-провируса (методом дот-гибридизации). Наблюдение за инфицированными культурами велось в течение восьми пассажей. Уже на первом пассаже можно было констатировать резкую стимуляцию пролиферативного процесса: опытные клетки размножались быстрее и формировали монослой почти в 2 раза быстрее (в течение 7–10 дней), чем контрольные (15–16 дней). Вторая особенность заключалась в том, что в опытных культурах уже в начале второго пассажа (на 18-й день и позже) произошло слияние отдельных клеток, в результате сформировались гигантские многоядерные (до 17 ядер в одной клетке) образования. Количество таких клеток с каждым пассажем увеличивалось: на 2-м пассаже их было 5%, а на 7–8-м — около 15%. Как известно, сходные морфологические изменения исследователи находят и в био- или аутопсийном аналогичном материале, полученном непосредственно от пациентов со СПИДом.

Вирусологический контроль установил присутствие в цитоплазме клеток вирусоспецифического антигена. Явных признаков репродукции ВИЧ (почкование вирусных частиц на плазматической мембране, наличие обратно-транскриптазной активности) обнаружено не было. В супернатанте регулярно выявлялись вирусоспецифические белки p17 и p24. Клеточная культура семи пассажей содержала ДНК провируса ВИЧ-1. Очевидные признаки активного размножения вируса были заметны лишь в тех культурах, в культуральную жидкость которых добавлен митоген фитогемагглютинин[1*]. Однако самым удивительным было то, что с такой же закономерностью инфекционный процесс развивался в культурах астроцитов мозговой ткани не только человека, но и морской свинки. После постановки аналогичного эксперимента с мозговой тканью животного все параметры вирусологического контроля были практически идентичны тем, которые наблюдались в опытах с тканью мозга человека. Не отметили мы лишь стимуляции пролиферативного процесса.

Убедившись в принципиальной возможности смены вирусом иммунодефицита человека своего хозяина [45, 48, 49, 54, 56, 58], мы продолжили эксперимент. На этот раз вместо тканевых культур испытывались лабораторные животные (морские свинки, хлопковые крысы). Инфицирующим материалом служил лизат культуры лимфобластов (МТ-4), зараженных штаммом ВИЧ-lzmb (9 lg $ТЦД_{50}$).

Предварительный эксперимент (использовано 12 морских свинок, 3 из которых были интактными) показал [46], что, несмотря на отсутствие явных клинических проявлений (животные наблюдались в течение 3 мес), в ткани селезенки регулярно обнаруживалась ДНК провируса ВИЧ-1. Учитывая особую важность установленного факта – доказанную возможность воспроизведения ВИЧ-инфекции на лабораторном животном – мы решили провести новый эксперимент с соблюдением необходимого контроля. В качестве подопытного животного на этот раз испытывалась хлопковая крыса [46, 49–51, 55, 57].

Как и в предыдущем эксперименте, для заражения животных использовали штамм ВИЧ-1 zmb, выделенный сотрудниками нашей лаборатории. Титр его составил не менее 8,0 lg $ТЦД_{50}$. Заражение хлопковых крыс (132 животных, в том числе 32 контрольных) проводилось интраперитонеально (по 0,8 мл) и ретробульбарно (по 0,4 мл под оба глазных яблока). За животными велось наблюдение в течение 6 мес после их инфицирования.

Клинический мониторинг (контроль за температурой, массой, поведением животных и их внешним видом) не выявил четкой манифестации инфекции, хотя некоторые клинические симптомы отличали опытных животных от контрольных. Так, 17% опытных животных к концу срока наблюдения погибли. Как правило, летальному исходу предшествовало резкое падение массы тела (до 50% от первоначального). Подавляющее большинство крыс (16 из 17) погибли в отдаленные сроки наблюдения (3-4-й месяцы после инфицирования) при наличии явных симптомов воспаления легких (на вскрытии регулярно отмечалось "опеченение" легочной ткани). Лихорадочная реакция наблюдалась лишь в течение 2-й недели после заражения, но она существенно не отличалась от той, которая зафиксирована у контрольных особей, получавших взвесь незараженной лимфоидной культуры. Достоверно установлено, что масса селезенки (часть животных по истечении 1, 2, 3, 5 и 6-го

1 * Описанная модель ВИЧ-инфекции *in vitro* была успешно использована нашими коллегами (W.E.G. Muller и др.) из университета г. Майнца (Германия) для изучения противовирусной активности нового антиретровирусного препарата — мемантина [71].

месяцев повергалась вивисекции) у подопытных животных к концу 2-го месяца на 20,9% превышала таковую у контрольных. Однако к концу 6-го месяца картина менялась на обратную: масса селезенки у инфицированных особей была на 20,8% меньше, чем в контроле.

В течение 1–2-го месяца после заражения в мозге и селезенке опытных животных отмечались четкие признаки воспалительной реакции, которые к концу наблюдения (4-й месяц) сменялись атрофией и дегенерацией.

Исследование слайдов из мозговой и селезеночной ткани животных методом непрямой иммунофлюоресценции не позволило составить четкого представления о динамике накопления в тканях антигенов ВИЧ: "положительные" образцы встречались довольно редко и не всегда четко проявлялись. По-другому выглядели результаты исследования образцов тканей с помощью ПЦР (82 образца от опытных и 44 – от контрольных животных). Спустя 3 мес после инфицирования интраперитонеально и до конца срока наблюдения все 16 образцов селезенки опытных животных содержали провирусную ДНК ВИЧ-1. Медленнее инфицировалась ткань головного мозга: положительная ПЦР всех образцов этой ткани стала регистрироваться только через 5 мес после заражения. Во всех 23 образцах контрольных животных реакция давала отрицательный результат.

Ретробульбарный путь инфицирования оказался менее результативным: обязательная регистрация провирусной ДНК в ткани селезенки начиналась лишь спустя 6 мес после инфицирования, а в мозговой ткани даже в этот срок часть образцов (1 из 5) была свободна от генома ВИЧ.

Основываясь на этих результатах, мы предложили использовать данную модель ВИЧ-инфекции для контроля *in vivo* за противовирусной активностью химиопрепаратов или вакцин против СПИДа. Судить об их эффективности при таком контроле следует не по традиционно констатируемой выраженности клинических симптомов инфекции (они, как видно из приведенного примера, выражены в большинстве случаев нечетко и непостоянно), а по наличию или отсутствию признака инфекта (провирусной ДНК) в ткани селезенки животного. Контроль за инфицированностью животных (а значит и за эффективностью лечебного препарата) следует проводить через полгода, но не ранее, чем через 3 мес. после контрольного инфицирования (челендж-инфекции) животного.

Предложенная модель ВИЧ-инфекции [46, 50, 55, 57, 60] нашла своих сторонников и последователей среди ученых Национального института здоровья США (National Institute of Allergy and Infection Diseases, NIH, Rockwill, Maryland). Одна из публикаций на эту тему [61] возглавила список 10 наиболее информативных и оригинальных статей, посвященных опыту моделирования инфекции (Top 10 Articles published in the same domain. Article Delivery Services, March, 18, 2011; Bio. Medlib.).

Результаты экспериментов пролили свет и на обсуждаемый в настоящее время вопрос о динамике процесса интеграции генома ВИЧ в геном клетки организма животного. До сих пор практически никем не оспаривается постулат о том, что интеграция геномов ВИЧ и клетки наступает сразу же после попадания вируса в организм. Приведенные выше результаты опровергают это положение и позволяют убедиться в его неприменимости, по крайней мере, в тех случаях, когда ВИЧ попадает в организм невосприимчивого животного (морская свинка, хлопковая крыса и др.). Вполне вероятно, что процесс интеграции генома ВИЧ осуществляется синхронно с процессом репликации вируса в клетке хозяина. Поскольку мы не зарегистрировали факта завершенной репликации ВИЧ в организме животных (по крайней мере на раннем этапе инфекции, т.е. сразу после их заражения), можно допустить, что и интеграционный процесс у таких животных, следуя за репликативным, запаздывает на 2 (в тканях селезенки) и даже на 5–6 мес. (в мозговой ткани).

Клиника и этиотропная химиотерапия СПИД

Внезапная и резкая вспышка ВИЧ-инфекции в Беларуси (1996 г.) обусловила чрезвычайную актуальность всех исследований, направленных на выяснение клинических особенностей, методов специфической терапии СПИД и поиск новых лекарственных средств против этой инфекции. Учитывая крайне ограниченный отечественный опыт клинического наблюдения (до 1996 г. в республике было зарегистрировано 18 человек, больных СПИДом), наша лаборатория поставила перед собой задачу обобщить международный опыт клинического наблюдения за ВИЧ-инфекцией и предоставить в распоряжение клиницистов новейшие рекомендации в отношении терапии СПИД и сопутствующих ему оппортунистических заболеваний. Именно эти вопросы стали предметом обсуждения на XI (г. Ванкувер, Канада, 1996 г.) и XII (г. Женева, Швейцария, 1998 г.) международных конференциях по СПИДу. Опубликованные материалы наряду с другими послужили основой научных ли-

тературных обзоров по клинической диагностике [8, 62–67] и лечению ВИЧ-инфекции [62, 68–75]. Ряд работ [33, 62, 68, 70–75] был посвящен описанию кардинально изменившихся за последние годы подходов к этиотропной терапии СПИД, в частности характеристике комбинированной химиотерапии и методам иммунологического и вирусологического контроля ее эффективности. Кроме того, были обобщены результаты собственных исследований лаборатории, направленных на поиски новых лекарственных средств против ВИЧ-инфекции [51, 69, 76–84].

Поиск этот велся преимущественно среди коммерчески доступных и широко используемых лекарственных средств для терапии различного рода соматических заболеваний (кардиологических, неврологических, психических, онкологических и др.). Обоснованность избранного нами исследовательского направления может быть подтверждена примером двойного использования самого распространенного в лечении СПИД препарата — азидотимидина (зидовудина, AZT): с 1964 по 1984 гг. он назначался как противоопухолевое средство.

На первом этапе наши исследования ограничились лабораторными испытаниями препаратов, осуществляемыми с помощью формазанового теста, который позволяет следить за гибелью лимфоидных клеток человека после их обработки испытуемым препаратом и последующего заражения высокопатогенным штаммом ВИЧ. Результаты этих исследований изложены в публикациях [77, 78, 83–85]. Было испытано 156 соединений, в т. ч. 146 лекарственных препаратов и 10 химических соединений оригинального синтеза. Итоговые результаты были следующими. Среди 146 готовых лекарственных форм преобладающее большинство (129, или 88,3%) было лишено противовирусной активности, 11 (7,5%) проявили очень слабую активность и 6 (4,1%) препаратов оказались ингибиторами ВИЧ. Три из последних, к сожалению, обладали довольно выраженным побочным эффектом и, следовательно, их вряд ли можно использовать для лечения СПИДа. Зато остальные три, такие как ксантинола никотинат (вазодилататор), трентал (вазодилататор) и тардиферон (средство для лечения железодефицитной анемии), вполне подходили для этой цели. Дополнительным исследованием с помощью трех различных лабораторных тестов был доказан выраженный синергический эффект каждого из них на противовирусную активность базового препарата HAART — азидотимидина.

Оценивая в целом исследовательскую работу лаборатории, направленную на борьбу со СПИДом, можно констатировать, что некоторые разработки (например, изучение биологических свойств ВИЧ, оценка качества производившихся ранее диагностикумов) в данный момент имеют лишь историческое значение. Другие, напротив, не утратили своей практической значимости и теперь. Среди них достойны упоминания следующие:

1. Разработка и коммерческая реализация отечественной подтверждающей диагностической тест-системы «Бел. ВИЧ-1 Блот».

2. Научно обоснованный анализ складывающейся в стране эпидемической обстановки.

3. Разработка экспериментальных моделей *(in vivo* и *in vitro)* ВИЧ-инфекции, которые могут найти свое применение при оценке вакцинных и лечебных препаратов против СПИДа.

4. Критическая оценка результатов теста «иммунный блоттинг».

5. Комплексный подход к оценке статуса инфицированности пациента в случае недостоверности или неинформативности предыдущих лабораторных исследований.

6. Популяризация современных представлений о тактике этиотропной химиотерапии СПИДа.

Литература

1. Анализ сывороток крови методом иммуноблота с использованием природного и рекомбинантного антигенов вируса иммунодефицита человека / М.И. Букринский [и др.] // Вопр. вирусологии. — 1988. — Т. 33, № 6. — С. 700–703.

2. К вопросу диагностики ВИЧ-инфицированности / В.Ф. Еремин [и др.] // Актуальные вопросы аллергологии, иммунологии и СПИДа: материалы 7-й респ. науч. конф. — Каунас, 1992. — С. 54.

3. Комплексный подход к диагностике ВИЧ-инфекции / В.Ф. Еремин [и др.] // Здравоохр. Беларуси. — 1993. — № 2. — С. 37–40.

4. Выявление ВИЧ-инфекции и синдрома приобретенного иммунного дефицита на территории Белоруссии / Н.Д. Коломиец [и др.] // Здравоохр. Белоруссии. — 1989. — № 1. — С. 60–62.

5. Динамика сероконверсии у ВИЧ-инфицированных наркоманов / Л.И. Костикова [и др.] // Вирусные гепатиты и ВИЧ-инфекция (эпидемиология, диагностика, профилактика, лечение): тез. докл. 2-й Междунар. конф. — Минск, 1999. — С. 75–76.

6. Применение молекулярно-биологических методов для диагностики и изучения ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь / С.А. Попов [и др.] // Актуальные вопросы аллергологии, иммунологии и СПИДа: материалы 7-й респ. науч. конф. — Каунас, 1992. — С. 75.

7. Методы молекулярной биологии в комплексной диагностике ВИЧ-инфекции / С. А. Попов [и др.] // Здравоохр. Беларуси. – 1993. – № 4. – С. 29-32.

8. Рытик, П.Г. СПИД: синдром приобретенного иммунного дефицита / П.Г. Рытик, А.Г. Коломиец, Н.Д. Коломиец. — Минск: Беларусь, 1988. — 127 с.

9. Рытик, П.Г. Научное сопровождение национальной программы профилактики СПИД в Беларуси / П.Г. Рытик // Мед. новости. — 2000. — № 11. — С. 10–19.

10. Сравнительная характеристика диагностических препаратов, применяемых для определения антител к ВИЧ при массовом обследовании населения / П.Г. Рытик [и др.] // Материалы юбил. конф. науч. о-ва врачей Могилевщины. — Могилев, 1989. — С. 126–128.

11. Комплексный подход к диагностике ВИЧ-инфекции: использование полимеразной цепной реакции в качестве альтернативного подтверждающего теста / П.Г. Рытик [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 1996. — № 5. — С. 23–27.

12. Рытик, П.Г. СПИД: эпидемиология, этиология, лабораторная диагностика и патогенез / П.Г. Рытик // Здравоохранение. — 1999. — № 5. — С. 25–29.

13. Эпидемиологический анализ ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь / П.Г. Рытик [и др.] // Мед. новости. — 1999. — № 3. — С. 3–7.

14. Серологические свойства изолятов ВИЧ-1 из очага эпидемии в Гомельской области Республики Беларусь (1996 г.) / М.Ю. Щелканов [и др.] // Вопр. вирусологии. — 1998. — Т. 43, № 5. — С. 220–229.

15. Молекулярный портрет эпидемии в Светлогорском (Гомельская область Беларуси) очаге эпидемии ВИЧ-1 / Н.Г. Ярославцева [и др.] // СПИД, рак и родственные проблемы: материалы 6-й междунар. конф., СПб., 1998 г. // Рус. журн. ВИЧ/СПИД и родств. пробл. — 1998. — Т. 2, № 2. — С. 25.

16. Серотипический атлас ВИЧ-позитивных сывороток с территории бывшего СССР: данные 1998 г. / Н.Г. Ярославцева [и др.] // СПИД, рак и родственные проблемы: материалы 6-й междунар. конф., СПб., 1998 // Рус. журн. ВИЧ/СПИД и родств. пробл. — 1998. — Т. 2, № 2. — С. 44.

17. Complex approach to HIV-infection diagnosis / V.F. Eremin [et al.] // Progress in Clinical Virology: 1995 Joint Meet., Prague, Czech Republic, 10–14 Sept., 1995: abstr. — Prague, 1995. — P. 101 (PA/110).

18. Serotype heterogenecity analysis of HIV-positive sera from the territory Byelorussia / A.N. Judin [et al.] // AIDS, Cancer and Related Problems: abstr. 4th Int. Conf. — St. Peterburg, 1996. — P. 101.

19. Simultaneous introduction of distinct HIV-1 subtypes into different risk groups in Russia, Byelorussia and Lithuania / V.V. Lukashov [et al.] // AIDS. — 1995. — Vol. 9, № 5. — P. 435–439.

20. Complex evaluation of the laboratory testing data of the doubtful HIV-infection cases / P.G. Rytik [et al.] // AIDS, Cancer and Related Problems: abstr. 2nd Int. Conf. — St. Petersburg, 1993. — P. 17.

21. Epidemiological survey of HIV-infection in Belarus / P.G. Rytik [et al.] // AIDS, Cancer and Related Problems: abstr. 4th Int. Conf. — St. Peterburg, 1996. — P. 108.

22. HIV-infection in Belarus (1987-1997) / P.G. Rytik [et al.] // AIDS, Cancer and Related Problems: abstr. 6th Int. Conf., St. Petersburg, 1998 // Rus. J. HIV/AIDS and Relat. Probl. — 1998. — Vol. 2, № 2. — P. 104–105.

23. Serological homogeneity of HIV-1 from Svetlogorsk epidemic source (1996) in Byelarus / N.G. Yaroslavtseva [et al.] // AIDS, Cancer and Related Problems: abstr. 5th Int. Conf., St. Petersburg, 1997 // Rus. J. HIV/AIDS and Relat. Probl. — 1997. — Vol. 1, № 1. – P. 257.

24. Культивирование высокорепликативного штамма ВИЧ-1 в условиях низкого содержания эмбриональной сыворотки / И.И. Кучеров [и др.] // Идеи Пастера в борьбе с инфекциями: материалы 2-й междунар. конф., посвящ. 75-летию ин-та им. Пастера. — СПб., 1998. — С. 64.

25. Очистка и контроль специфичности нативных структруных белков ВИЧ-1 / П.Г. Рытик [и др.] // Идеи Пастера в борьбе с инфекциями: материалы 2-й междунар. конф., посвящ. 75-летию ин-та им. Пастера. — СПб., 1998. — С. 68.

26. Особенности эпидемического процесса среди ВИЧ-инфицированных наркоманов / П.Г. Рытик [и др.] // СПИД, рак и родственные проблемы: материалы 7-й междунар. конф. СПб, 1999 // Рус. журн. ВИЧ/СПИД и родств. пробл. — 1999. — Т. 3, № 1. — С. 72.

27. Characteristics of epidemic process in HIV-infected Drug Users in Svetlogorsk / P.G. Rytik [et al.] // AIDS, Cancer and Related Problems: abstr. 7th Int. Conf., St. Petersburg, 1999 // Rus. J. HIV/AIDS and Related Probl. — 1999. — Vol. 3, № 1. — P. 180.

28. Использование полимеразной цепной реакции для контроля за латентной ВИЧ-инфекцией *in vitro* / В.Ф. Еремин [и др.] // Вопр. вирусологии. — 1991. — Т. 36, № 4. — С. 331–332.

29. Рытик, П.Г. Эпидемиология и клиника СПИДа: (обзор литературы) / П.Г. Рытик, И.Н. Воинов // Здравоохр. Белоруссии. — 1987. — № 7. — С. 66–68.

30. Эпидемиология ВИЧ-инфекции в Беларуси: эпидемиологический обзор / П.Г. Рытик [и др.] // Здравоохранение. — 1996. — № 8. — С. 29–32

31. ВИЧ-инфекция в Беларуси (1987–1997 гг.) / П.Г. Рытик [и др.] // СПИД, рак и родственные проблемы: материалы 6-й междунар. конф., СПб., 18–22 мая 1998 г. // Рус. журн. ВИЧ/СПИД и родств. пробл. — 1998. — Т. 2, № 2. — С. 38.

32. Эпиднадзор за ВИЧ-инфекцией в Республике Беларусь / П.Г. Рытик [и др.] // Рус. журн. ВИЧ/СПИД и родств. пробл. — 1998. — Т. 2, № 3. — С. 63–68.

33. Рытик, П.Г. Современные представления о профилактике СПИДа и ВИЧ-инфицирования / П.Г. Рытик // Здравоохранение. — 1999. — № 7. — С. 30–32.

34. Natural history of HIV-infection in the former USSR / E. Karamov [et al.] // XI Int. Conf. on AIDS, Vancouver, 1996: abstr. — Tu. B. 2245.

35. Natural history of HIV-infection in the former USSR / E. Kamarov [et al.] // 10th Int. Congr. Virology, Jerusalem, Israel, 11–16 Aug., 1996: abstr. — PW. 62–2.

36. Epidemiological peculiarities of HIV-infection in Belarus at the present state / P.G. Rytik [et al.] // AIDS, Cancer and Related Problems: abstr. 5th Int. Conf., St. Petersburg, 1997 // Rus. J. HIV/AIDS and Relat. Probl. — 1997. — Vol. 1, № 1. — P. 84.

37. О штаммовых особенностях циркулирующего в СССР ВИЧ-1 по данным изучения его свойств в клеточных культурах / С.С. Маренникова [и др.] // Вопр. вирусологии. — 1991. — Т. 36, № 5. — С. 356–361.

38. Биологические свойства вируса иммунного дефицита, выделенного от жителя БССР / П.Г. Рытик [и др.] // Здравоохр. Белоруссии. — 1989. — № 11. — С. 11–12.

39. Биологические свойства ВИЧ, выделенного от вирусоносителя, проживающего в БССР / П.Г. Рытик [и др.] // Вопр. вирусологии. — 1990. — Т. 35, № 5. — С. 389–390.

40. Рытик, П.Г. Биологическая характеристика rapid/high штамма ВИЧ, выделенного в СССР / П.Г. Рытик, В.Ф. Еремин, С.А. Попов // Материалы 62-й сес. Общ. собрания АМН СССР. — М., 1991.

41. Biological properties of HIV strains isolated in Belarus / V.F. Eremin [et al.] // AIDS, Cancer and Related Problems: abstr. 4th Int. Conf. — St. Peterburg, 1996. — P. 101.

42. Поражения центральной нервной системы при синдроме приобретенного иммунного дефицита (СПИД) / П.Г. Рытик [и др.] // Здравоохр. Белоруссии. — 1988. — № 10. — С. 62–65.

43. Рытик, П.Г. Современные представления о механизме развития синдрома приобретенного иммунного дефицита / П.Г. Рытик, А.Г. Коломиец, Н.Д. Коломиец // Здравоохр. Белоруссии. — 1988. — № 11. — С. 64–70.

44. Культура астроцитов человека как модель для изучения нейрологического аспекта патогенеза СПИД / П.Г. Рытик [и др.] // Экологические проблемы иммунологии и аллергии: тез. докл. 1-го иммунолог. съезда Белоруссии. — Минск, 1990. — С. 114–115.

45. Особенности формирования многоядерных астроцитов при моделировании ВИЧ-инфекции *in vitro* / П.Г. Рытик [и др.] // Применение электронной микроскопии в науке и технике: тез. докл. Третьей респ. науч.-техн. конф. — Минск, 1991. — С. 8.

46. Рытик, П.Г. Особенности моделирования ВИЧ-инфекции на лабораторных животных / П.Г. Рытик, В.Ф. Еремин, Н.Н. Полещук // Здравоохр. Беларуси. — 1992. — № 9. — С. 35–38.

47. Использование первичной культуры астроцитов для моделирования ВИЧ-нейроинфекции / П.Г. Рытик [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 1993. — № 2. — С. 47–52.

48. Применение первичной культуры астроцитов для моделирования нейроинфекции, обусловленной ВИЧ / П.Г. Рытик [и др.] // Идеи Пастера в борьбе с инфекциями: тез. докл. Междунар. симп., посвящ. году Пастера. — СПб., 1995. — С. 116.

49. Использование полимеразной цепной реакции при моделировании ВИЧ-инфекции на животных / П.Г. Рытик [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологи и иммунобиологии. — 1995. — № 3. — С. 86–89.

50. Моделирование ВИЧ-инфекции на лабораторных животных / П.Г. Рытик [и др.] // Актуальные проблемы микробиологии: этиология, патогенез, терапия и диагностика: ст. и тез. докл. междунар. науч.-практ. конф. — Минск: Минсктиппроект, 1998. — С. 91–95.

51. Методические подходы к испытанию эффективности дезинфектантов в отношении вирусов гепатита *А* и *В*, ВИЧ и других вирусов / Л.П. Титов [и др.] // Вирусные гепатиты и ВИЧ-инфекция (эпидемиология, диагностика, профилактика, лечение): тез. докл. 2-й Междунар. конф. — Минск, 1999. — С. 70.

52. Bestimmung ainer HIV-infektion in menschlichen Knochen / H. Merz [et al.] // Unfallchirurg. — 1991. —— Vol. 94, № 1. — P. 47–49.

53. Accumulation of transcripts coding for prion protein in human astrocytes during infection with human immunodeficiency virus / W.E. Müller [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. — 1992. — Vol. 1139, № 1–2. — P. 32–40.

54. Susceptibility of primary human glial fibrillary acidic protein-positive brain cells to human immunodeficiency virus infection *in vitro*: anti-HIV activity of memantine / P.G. Rytik [et al.] // AIDS Res. Hum. Retroviruses. — 1991. — Vol. 7, № 1. — P. 89–95.

55. Non-traditional approach to assessment of HIV-infection model in laboratory animals / P.G. Rytik [et al.] // AIDS, Cancer and Related Problems: abstr. 1st. Int. Conf. — St. Petersburg, 1992. — P. 25.

56. Rytik, P.G. Comparative morphological characteristics of different neuroinfection, reproduced in vitro on primary astrocytes culture / P.G. Rytik, N.N. Poleshchuk, Z.B. Kvacheva // AIDS, Cancer and Related Problems: abstr 2nd Int. Conf. — St. Petersburg, 1993. — P.15.

57. Non-traditional approach to the design of HIV-infection laboratory model / P.G. Rytik [et al.] // 10th Int. Congr. Virology, Jerusalem, Israel, 11–16 Aug., 1996: abstr. — Jerusalem, 1996. — PW. 06–16.

58. Use of astrocytes primary culture for modelling HIV-neuroinfection / P.G. Rytik [et al.] // AIDS, Cancer and Related Problems: abstr. 7th Int. Conf., St. Petersburg, 1999 // Rus. J. AIDS/HIV Relat. Probl. — 1999. — Vol. 3, № 1. — P. 26.

59. Susceptibility of human astrocytes to human immunodeficiency virus infection in vitro – anti-HIV activity of memantine / H.C. Schroder [et al.] // Biochemie des Nervensystems: Konf. der Gesellschaft fur Biologische Chemie. — 1990. — Bd. 371. — S. 1038.

60. Экспериментальная ВИЧ-инфекция / П.Г. Рытик [и др.] // Актуальные проблемы медицинской вирусологии: материалы науч. конф., посвящ. 90-летию со дня рожд. М.П. Чумакова. — М., 1999. — Ч. 2. — С. 103.

61. Small animal model of HIV-infection / P. Rytik [et al.] // J. Clin. Virol. — 2004. — Vol. 31, suppl. 1. — P. 83–87.

62. Этиотропная терапия ВИЧ-инфекции и сопутствующих заболеваний: метод. рекомендации / И.И. Кучеров [и др.] // БелНИИЭМ. — Минск, 1999. — 26 с.

63. Два случая СПИДа: клинико-анатомический анализ / М.К. Недзведь [и др.] // Здравоохранение. — 1995. — № 3. — С. 14–18.

64. Рытик, П.Г. Сравнительная оценка методов лабораторной диагностики пневмоцистной пневмонии / П.Г. Рытик // Здравоохр. Белоруссии. — 1991. — № 5. — С. 62–66.

65. Рытик, П.Г. Пневмоцистная пневмония как одно из клинических проявлений СПИДа / П.Г. Рытик, Н.Д. Коломиец // Клинич. медицина. — 1991. — Т. 69, № 9. — С. 3–6.

66. Клинико-патогенетические особенности саркомы Капоши / П.Г. Рытик [и др.] // Клинич. медицина. — 1992. — Т. 70, № 1. — С. 19–23.

67. Рытик, П.Г. Клиническая диагностика СПИДа / П.Г. Рытик // Здравоохранение. — 1999. — № 11. — С. 29–32.

68. Еремин, В.Ф. Современные подходы к терапии ВИЧ-инфекции / В.Ф. Еремин, П.Г. Рытик // Здравоохр. Беларуси. — 1993. — № 4. — С. 65–70.

69. Коломиец, А.Г. Молекулярно-биологическая характеристика HTLV-III, патогенез и перспективы разработки препаратов для специфической химиотерапии синдрома приобретенного иммунодефицита / А.Г. Коломиец, П.Г. Рытик // Химиотерапия и химиопрофилактика вирусных инфекций. Особо опасные и медленные инфекции: сб. материалов заседания пробл. комис. — Минск, 1985. — С. 76–93.

70. Рытик, П.Г. Химиотерапия СПИДа / П.Г. Рытик // Мед. новости. — 1996. – № 8. — С. 3–10.

71. Рытик, П.Г. Лечение СПИДа и сопутствующих заболеваний / П.Г. Рытик // Клинич. медицина. — 1997. — № 1. — С. 5–10.

72. Рытик, П.Г. Вакцины против СПИДа: реальность и перспективы / П.Г. Рытик // Мед. новости. — 1997. — № 11. — С. 3–11.

73. Рытик, П.Г. Новые подходы к химиотерапии ВИЧ-инфекции / П.Г. Рытик // Здравоохранение. — 1998. — № 1. — С. 33–37.

74. Комбинированная этиотропная химиотерапия ВИЧ-инфекции / П.Г. Рытик [и др.] // Здравоохранение. — 1999. — № 12. — С. 25–29.

75. Современные подходы к специфической терапии ВИЧ-инфекции / П.Г. Рытик [и др.] // Вирусные гепатиты и ВИЧ-инфекция (эпидемиология, диагностика, профилактика, лечение): тез. докл. 2-й Междунар. конф. — Минск, 1999. — С. 45.

76. Эффективность различных дезинфектантов и антисептиков в отношении возбудителей гепатита, ВИЧ-инфекции и других вирусов / В.Г. Гудков [и др.] // Вирусные гепатиты и ВИЧ-инфекция (эпидемиология, диагностика, профилактика, лечение): тез. докл. 2-й междунар. конф. — Минск, 1999. — С. 70–71.

77. Лабораторный скрининг лекарственных препаратов на анти-ВИЧ активность / И.И. Кучеров [и др.] // Вирусные инфекции на пороге 21 века. Эпидемиология и профилактика: материалы междунар. юбил. конф. Воен.-мед. акад. — СПб., 1999. — С. 246–248.

78. Синтез и изучение фармакологического действия синтетических индукторов цитокинов / П.Г. Рытик [и др.] // Вирусные инфекции на пороге 21 века. Эпидемиология и профилактика: материалы междунар. юбил. конф. Воен.-мед. акад. — СПб., 1999. — С. 244–245.

79. Опыт поиска ингибиторов ВИЧ-1 *in vitro* / И.И. Кучеров [и др.] // Вирусные гепатиты и ВИЧ-инфекция (эпидемиология, диагностика, профилактика, лечение): тез. докл. 2-й Междунар. конф. — Минск, 1999. — С. 79.

80. Antibody to hepatitis E virus in HIV-infected individuals and AIDS patients Antibody to hepatitis E virus in HIV-infected individuals and AIDS patients / M.S. Balayan [et al.] // J. Viral Hepat. — 1997. — Vol. 4, № 4. — P. 279–283.

81. Therapeutic AIDS vaccines / A.S. Bourinbaiar [et al.] // Curr. Pharm. Des. — 2006. — Vol. 12, № 16. — P. 2017–2030.

82. 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, № 11. — P. 1187–1190.

83. Anti-HIV-1 activity of actidanone derivatives / F. Noskov [et al.] // AIDS, Cancer and Related Problems: abstr. 5th Int. Conf., St. Petersburg, 1997. — C002.

84. New antiviral drugs / F. Noskov [et al.] // Progress in Clinical Virology III: Inaugural Meet. Eur. Soc. Clin. Virology, Bologna, Italy, 1997: abstr. — c-12

85. Рытик, П.Г. Новые противовирусные препараты – ингибиторы репликации ВИЧ-1 / П.Г. Рытик, Ф.С. Носков, И.И. Кучеров // Материалы 7-го съезда Всеросс. о-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. — М., 1997. — С. 41.

HISTORY OF THE HIV-INFECTION STUDY IN BELARUS

Rytik P. G.

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

In the paper results of the retrospective 10-years study period of HIV infection, realized by scientists of BelRIEM (Belarusian Research Institute for Epidemiology & Microbiology, currently – State Institution "The Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology") have been generalized. The work was conducted independently and jointly with researchers from other research institutions: D.I. Ivanovsky Institute for Virology of the Russian Academy of Medical Sciences (Moscow, Russia), Institute of Physiological Chemistry at the University of Mainz Medical Center (Germany), Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (Atlanta, USA), National Institute of Neurological Disorders and Stroke (Bethesda, USA), and Institute of Tropical Medicine (Antwerp, Belgium). The paper includes the results of surveillance on HIV-infection epidemic development, assess the laboratory diagnostic tests validity, biological properties of HIV strains, circulating in the territory of the Republic of Belarus, designing a laboratory HIV-infection model in tissue culture and animals, the analysis of AIDS clinical manifestations

in persons, the search for new effective drugs and treatment scheme. Frames of the paper presentation do not allow detail focus on the dedication of facts obtained. They are fully reflected in the attached list of independent scientific publications.

Keywords: HIV, AIDS, model, diagnosis, treatment, epidemiology.

Поступила 30.06.2014

ДИНАМИКА ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В БЕЛАРУСИ ЗА ПОСЛЕДНИЕ 10 ЛЕТ

Самойлова Т.И.[1], Климович О.В.[1], Соглаева А.А.[1], Яшкова С.Е.[2], Веденьков А.Л.[2]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;

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

Реферат. В статье представлены результаты изучения зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита в Беларуси за период 2004–2013 гг.

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

Введение. Среди арбовирусных инфекций наиболее значимой в эпидемиологическом отношении для Республики Беларусь является клещевой энцефалит (КЭ), основным переносчиком возбудителя которого является лесной клещ *Ixodes ricinus*. За последние годы проведения исследований по проблеме КЭ наблюдается тенденция к росту численности переносчиков, повышению уровня их естественной зараженности до 10–15% и выше, расширению ареалов распространения инфицированных клещей по территории Республики Беларусь [1]. Для оценки эпидситуации и изучения закономерностей циркуляции вируса КЭ в природных очагах Республики Беларусь необходимы ежегодные исследования членистоногих-переносчиков на их зараженность — выявление антигенов вируса в иксодовых клещах [2].

Для изучения вирусофорности клещей в природных очагах в последние годы широко используется экспресс-метод иммуноферментного анализа (ИФА), который имеет высокую чувствительность и не уступает методу биопробы на животных [3].

В данной работе приведены результаты исследования иксодовых клещей, собранных на территории республики в период 2004–2013 гг., на выявление антигена вируса КЭ с использованием иммуноферментного метода.

Цель работы — изучение зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита в Республике Беларусь за период 2004–2013 гг.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись иксодовые клещи двух видов: *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus*, собранные на территории всех областей республики в 2004–2013 гг. Методом ИФА было исследовано 5197 экземпляров (664 биопробы) *I. ricinus* и 2109 экземпляров (251 биопроба) *D. reticulatus* из природных очагов. Перед постановкой ИФА иксодовых клещей подвергали первичной биологической обработке. Клещей распределяли по биопробам в зависимости от их вида, пола, стадии развития, степени насыщения. В одну биопробу брали 10–15 экземпляров голодных или полунапитавшихся самок; 10 голодных самцов; 2–5 напитавшихся самок или 50–100 нимф иксодовых клещей. Далее членистоногих отмывали фосфатным буферным раствором (pH 7,0), растирали в фарфоровой ступке и готовили суспензии [4]. Приготовленные из клещей суспензии исследовали методом ИФА для выявления в них антигена вируса КЭ с использованием диагностических наборов фирмы Вектор-БЕСТ, согласно инструкции производителя.

Результаты и их обсуждение. В результате исследований иксодовых клещей, собранных в природных очагах в 2004–2013 гг., методом ИФА антиген вируса КЭ в целом по республике выявлялся в клещах *I. ricinus* в 16%, а в *D. reticulatus* — 15,1 % (таблица).

Таблица — Данные по выявлению антигена вируса КЭ в клещах методом ИФА (2004–2013 гг.)

Области	Клещи по видам					
	Ixodes ricinus биопроб/экз.	Кол-во положительных	% положительных	*Dermacentor reticulatus*	Кол-во положительных	% положительных
Витебская	191/1130	25	13,1	1/2	–	–
Могилевская	77/677	9	11,7	20/178	3	15,0
Гродненская	96/822	20	20,8	39/305	7	17,9
Минская	124/911	21	16,9	62/412	10	16,1
Брестская	84/854	17	20,2	12/112	2	16,7
Гомельская	62/583	10	16,1	75/757	12	16,0
Минск	30/220	4	13,3	42/343	4	9,5
Всего по РБ	664/5197	106	16	251/2109	38	15,1

Примечания:
1 — В числителе — количество исследованных биопроб.
2 — В знаменателе — количество экземпляров.

Как видно из таблицы, процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* за 10 лет составил: по Витебской области — 13,1%, по Могилевской — 11,7%, по Гродненской — 20,8%, по Минской — 16,9%, по Брестской — 20,2%, по Гомельской — 16,1% и по г. Минску — 13,3%. В клещах *D. reticulatus* процент антигена вируса КЭ варьировал от 9,5% в г. Минске до 17,9% по Гродненской области. По Могилевской области он составлял 15,0%, по Гомельской — 16,0% по Минской — 16,1%, по Брестской — 16,7%.Клещи *D. reticulatus* из Витебской области были представлены малым количеством экземпляров.

Исследование иксодовых клещей по годам позволило установить, что, начиная с 2004 г., процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* возрос: в 2004 г. он составлял 12,0%, в 2005 г. — 13,3%, в 2006 г. — 14,9%, в 2007 г. — 14,8%, в 2008 г. — 15,8%, в 2009 г. — 14,3%, в 2010 г. — 15,4%, в 2011 г. — 16,5%, в 2012 г. — 19,3%, в 2013 г. — 18,8% (рисунок 1). Зараженность иксодовых клещей по годам приведена на рисунке 1.

В разрезе областей процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* варьировал от 11,7% по Могилевской области до 20,8% — по Гродненской. Высокие показатели выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* наблюдались также в Брестской (20,2%) и Минской (16,9%) областях республики. Наиболее высокая зараженность клещей *D. reticulatus* также отмечена в Гродненской (17,9%), Брестской (16,7%) и Минской (16,1%) областях страны (рисунок 2).

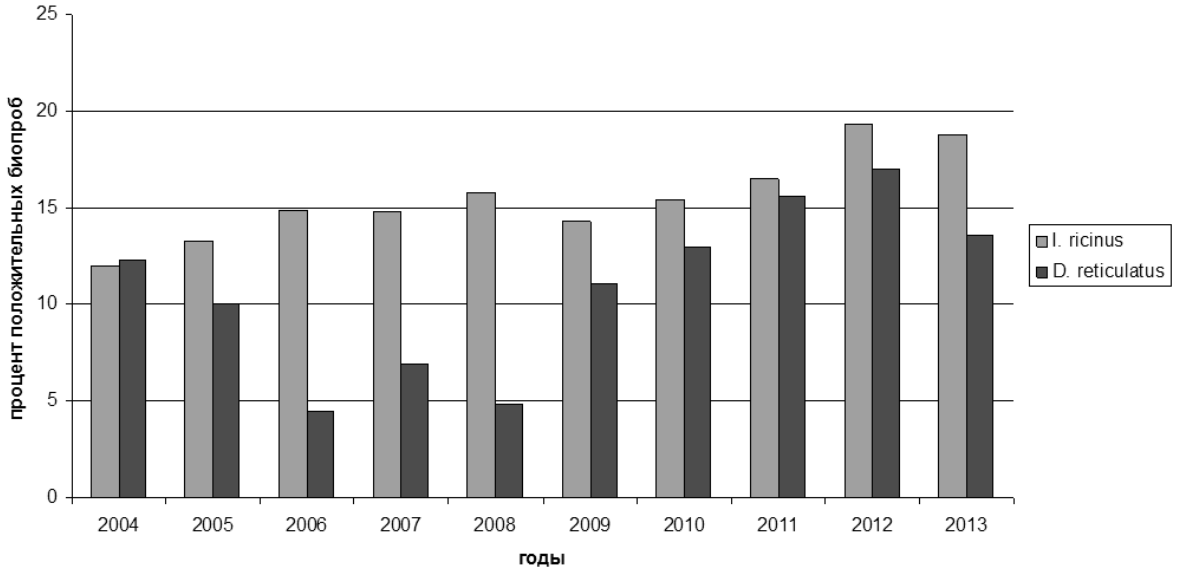


Рисунок 1 — Динамика выявления антигена вируса КЭ в клещах методом ИФА по годам (2004–2013 гг.)

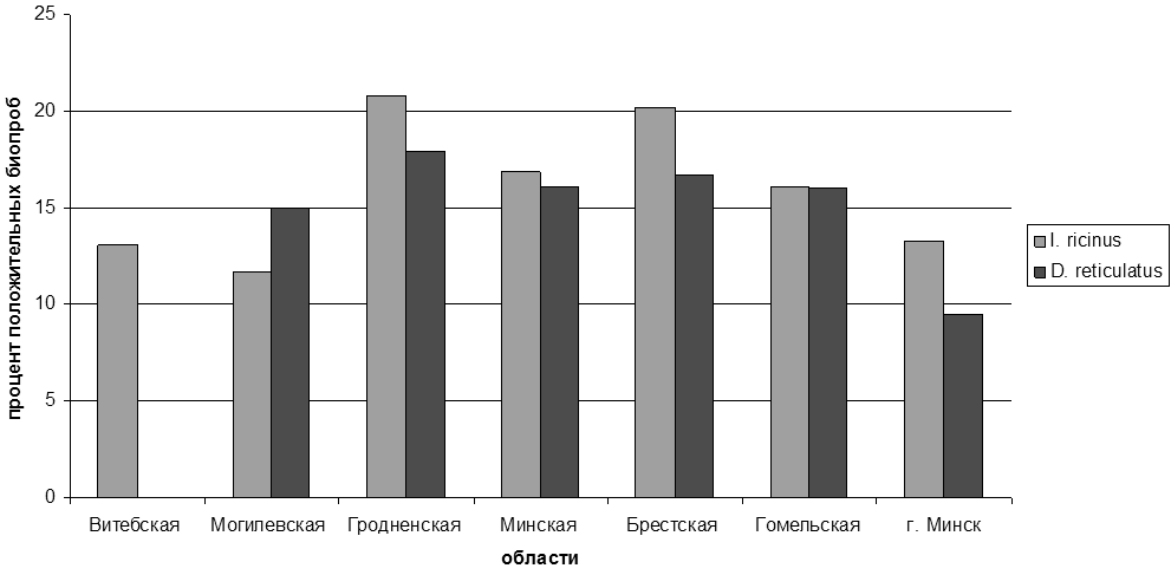


Рисунок 2 — Данные по выявлению антигена вируса КЭ в клещах в 2004–2013 гг. методом ИФА по областям

По районам Минской области зараженность клещей была отмечена в Стародорожском, Столбцовском и Минском районах, в Витебской области — Шумилинском, Браславском, Оршанском и Витебском районах. На территориях других областей зараженность клещей выявлена в Свислочском, Сморгонском и Волковысском районах Гродненской области, Каменецком, Пружанском и Малоритском районах Брестской области и в Осиповичском, Быховском районах Могилевской области.

Заключение. Следует отметить, что зараженность иксодовых клещей вирусом КЭ в Республике Беларусь за последние 5 лет оставалась высокой и составляла для *I. ricinus* 16,7%, а для *D. reticulatus* — 14,06%. В то же время инфицированность клещей в предыдущие годы (2004–2008 гг.) была отмечена на уровне 14,2% для *I. ricinus* и 7,7% для *D. reticulatus*.

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

Литература

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

2. Львов, Д.К. Стратегия и тактика профилактики клещевого энцефалита на современном этапе / Д.К. Львов, В.И. Злобин // Вопр. вирусологии. — 2007. — № 5. — С. 26–30.

3. Мельникова, О.В. Вирусологический мониторинг природных очагов клещевого энцефалита в Прибайкалье на основании индивидуального исследования иксодовых клещей: автореф. дис. … канд. биол. наук / О.В. Мельникова. — Томск, 1995. — 25 с.

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

INVESTIGATION OF IXODE TICKS INFECTED BY TICK-BORNE ENCEPHLITIS VIRUS IN BELARUS IN 2004–2013

Samoilova T.I.[1], Klimovich O.V.[1], Soglaeva A.A.[1], Yashkova S.E.[2], Vedenkov A.L.[2]
[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk;
[2]Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus.

In article are presented the results of studies of ixodoidea tick's infectiousness by tick-borne encephalitis virus in Belarus during 2004–2013 years.

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

Поступила 25.07.2014

ИНФИЦИРОВАННОСТЬ КРОВОСОСУЩИХ КОМАРОВ И МОШЕК ВИРУСОМ ЗАПАДНОГО НИЛА НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ В 2011–2013 гг.

Соглаева А.А.[1], Самойлова Т.И.[1], Климович О.В.[1], Азарова И.А.[1], Яшкова С.Е.[2], Веденьков А.Л.[2]
[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологи, Минск;
[2]Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь

Реферат. В статье представлены результаты выявления антигена вируса Западного Нила в кровососущих комарах и мошках, собранных на территории всех областей Республики Беларусь за период 2011–2013 гг.

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

Введение. Одной из наиболее значимых арбовирусных инфекций в эпидемиологическом отношении для Республики Беларусь является вирусный Западно-Нильский энцефалит, возбудителем которого является вирус Западного Нила (ЗН). Вирус ЗН относится к роду *Flavivirus*, семейства *Flaviviridae* и принадлежит к антигенному комплексу японского энцефалита [1]. Впервые этот возбудитель был выделен в Африке (Уганда) K. Smithburn и соавт. в 1937 г. из крови лихорадящей женщины при массовом обследовании населения на носительство вируса желтой лихорадки и по месту его обнаружения получил одноименное название — «Западный Нил» [2]. Природные очаги Западно-Нильской инфекции зарегистрированы практически повсеместно в Африке, а также в странах европейского Средиземноморья, Ближнего Востока, Средней Азии, на Кавказе, Индийском субконтиненте, в Индонезии, Малайзии, Таиланде и других тропических государств. На Американском континенте вирус ЗН был впервые выявлен в 1999 г. [3]. В Европе вирус ЗН был выделен в 60-х гг. (Франция, Россия) от людей, комаров и клещей, хотя наличие антител к вирусу было обнаружено в крови жителей Албании еще в конце 50-х гг. [4]. В настоящее время различными исследователями выделяются изоляты вируса ЗН во многих странах мира [4–7]. В последние годы вирус ЗН становится все более агрессивным и вызывает заболевания и эпидемические вспышки даже в тех регионах, в которых он не был ранее известен [3, 8, 9]. На территории Беларуси вирус впервые был выделен и идентифицирован в 1985 г. от птиц (штамм 48-ЗН Тремля). Позже вирус был изолирован от кровососущих комаров рода *Aedes* (штаммы 319 и 2438) и из крови лихорадящего человека (штамм Вин.), проживающего на территории Беловежской пущи [1].

Цель работы — выявление антигена вируса Западного Нила в кровососущих комарах и мошках, собранных на территории Республики Беларусь за 2011–2013 гг.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили кровососущие комары и мошки, собранные во всех областях республики за 2011–2013 гг.: Брестская (90 биопроб), Витебская (67 биопроб), Гомельская (106 биопробы), Гродненская (91 биопроб), Минская (85 биопроб) и Могилевская (89 биопроб). Кровососущие комары в наших исследованиях были представлены 3-мя родами: *Aedes* (41,9%), *Anopheles* (32,3%) и *Culex* (25,8%), мошки — сем. *Simulidae*. Выявление антигена вируса ЗН в полевом материале проводили методом ИФА. Перед постановкой ИФА проводили подготовку биопроб: биопробы кровососущих комаров и мошек отмывали эфиром, 70%-м спиртом, а затем трехкратно физиологическим раствором с добавлением антибиотиков. Для приготовления суспензии членистоногих тщательно растирали и к гомогенатам добавляли физиологический раствор из расчета 0,4 мл на 20 комаров, а затем разводили равным объемом промывочного буфера. Осветленную надосадочную жидкость (после центрифугирования или отстаивания в течение нескольких часов при температуре +4°С) использовали в ИФА. ИФА проводили с использованием «Тест-системы иммуноферментной для индикации антигена вируса Западного Нила» производства Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва, Россия) согласно инструкции производителя.

Результаты и их обсуждение. Исследование в ИФА биопроб кровососущих комаров показало, что антиген вируса ЗН выявлялся на территории всех областей республики (таблица).

Таблица — Выявление антигена вируса ЗН в кровососущих комарах и мошках по областям за 2011–2013 гг.

ОБЛАСТИ	*Кровососущие комары*		*Мошки*	
	биопроб	% положительных	биопроб	% положительных
Витебская	61/7	11,5	6/0	–
Могилевская	76/13	17,1	13/0	–
Гродненская	75/10	13,3	16/0	–
Минская	80/9	11,3	5/0	–
Брестская	67/12	17,9	23/2	8,7
Гомельская	78/16	20,5	28/2	7,1
ИТОГО:	437/67	15,3	91/4	4,4

Примечания:
1 — В числителе — количество исследованных биопроб.
2 — В знаменателе — количество положительных биопроб.

Как видно из таблицы, наиболее высокий процент выявления антигена за три года отмечен в Гомельской области (20,5), а наиболее низкий — в Минской (11,3) и Витебской (11,5) областях. В Гродненской области антиген вируса ЗН выявлялся в 13,3% биопроб, а в Брестской и Могилевской областях процент положительных биопроб был приблизительно на одном уровне и составил 17,9 и 17,1 соответственно. Зараженность кровососущих комаров вирусом ЗН в целом по республике за три года составила 15,3%. Антиген вируса ЗН выявлялся также в биопробах мошек, собранных на территории Брестской (8,7%) и Гомельской (7,1%) областей.

Следует отметить, что выявление антигена вируса ЗН в кровососущих комарах в 2013 г. возросло по сравнению с 2011–2012 гг., как по республике в целом, так и отдельно по некоторым областям (рисунок 1).

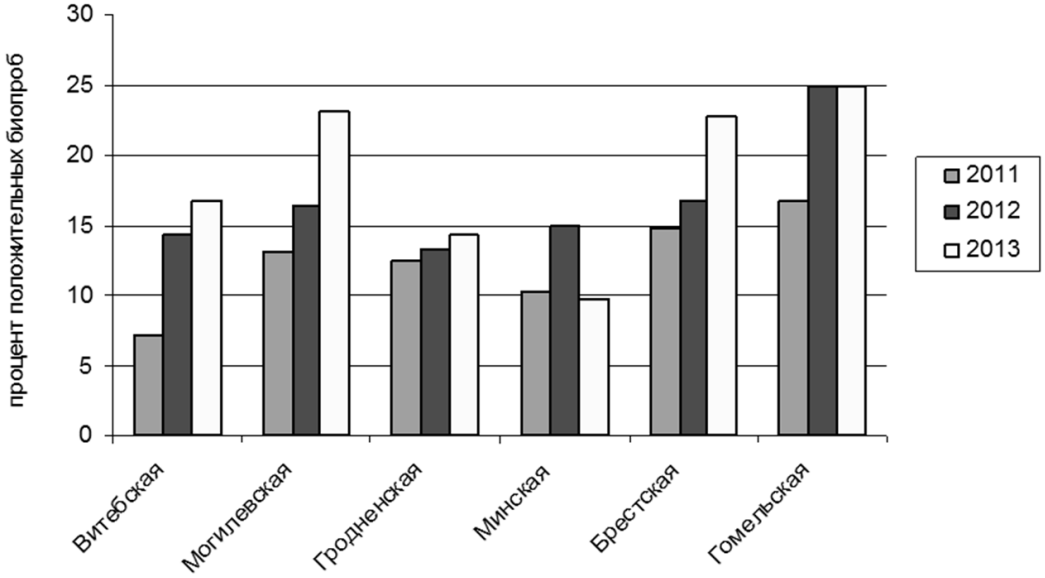


Рисунок 1 — Выявление антигена вируса Западного Нила в кровососущих комарах по областям Республики Беларусь по годам

Как видно из рисунка, процент выявления положительных биопроб в 2013 г. был выше, чем в 2011 и 2012 гг. в Витебской, Могилевской, Гродненской и Брестской областях. Наибольшая динамика роста выявления антигена отмечена в Витебской (с 7,1% в 2011 г. до 16,7% в 2013 г.) и Могилевской (с 13,1% в 2011 г. до 23,1% в 2013 г.) областях. Наименьшая динамика роста отмечена в Гродненской области: с 12,5% в 2011 г. до 14,3% в 2013 г. Процент выявления положительных биопроб в Гомельской области в 2012 и 2013 гг. оставался на одном уровне (25%), но вырос по сравнению с 2011 г. — 16,7%. Что касается Минской области, то выявление антигена вируса ЗН в 2012 г. (15,0%) возросло по сравнению с 2011 г. (10,3%), однако в 2013 г. произошло снижение процента положи-

тельных биопроб до 9,7%. Выявление антигена вируса ЗН в кровососущих комарах на территории всей республики увеличилось с 12,8% в 2011 г. до 17,9% в 2013 г.

Если рассматривать зараженность комаров по родам, то наибольший процент содержания антигена вируса отмечен у комаров р. *Anopheles* — 24,1% (34 положительных биопробы из 141 исследованных). Процент положительных биопроб кровососущих комаров р. *Aedes* составил 8,7 (16 из 183), а р. *Culex* — 15,0 (17 из 113) (рисунок 2).

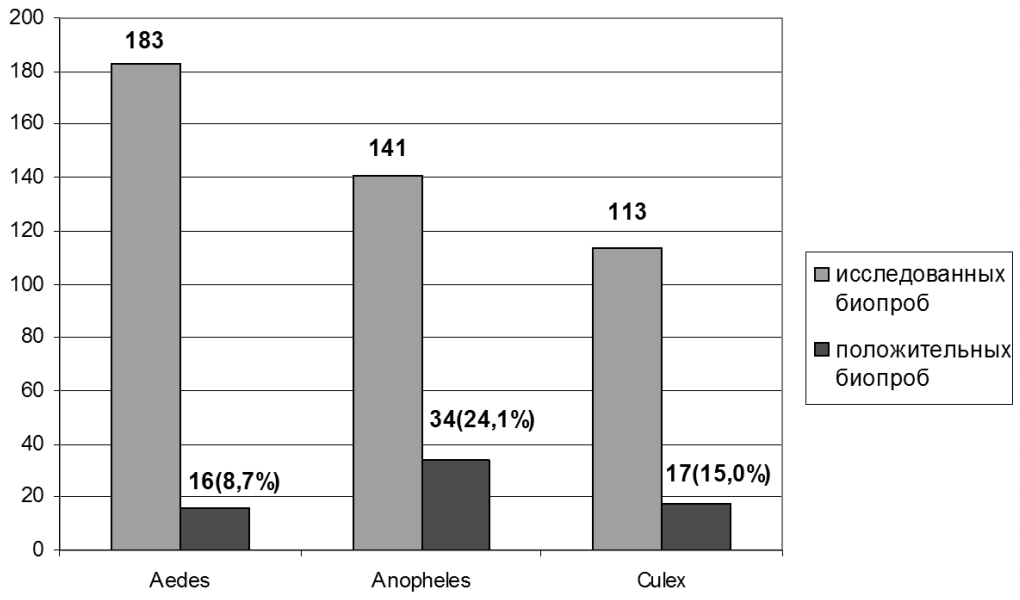


Рисунок 2 — Выявление антигена вируса Западного Нила в биопробах кровососущих комаров по родам (2011–2013 гг.)

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

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

Литература

1. Самойлова, Т.И. Арбовирусы в республике Беларусь (полевые и экспериментальные исследования): дис. … д-ра мед. наук: 03.00.06, 14.00.30 / Т.И. Самойлова. — Минск, 2003. — 257 л.

2. Львов, Д.К. Лихорадка Западного Нила / Д.К. Львов // Вопр. вирусологии. — 2000. — № 2. — С. 4–9.

3. Nosal, B. West Nile virus / B. Nosal, R. Pellizzari // Can. Med. Assoc. J. — 2003. — Vol. 168, № 11. — P. 1443–1444.

4. Hubalek, Z. West Nile fever — a reemerging mosquito-born viral disease in Europe / Z. Hubalek, J. Halouzka // Emerg. Infect. Dis. — 1999. — № 5. — P. 643–650.

5. Isolation of two strains of West Nile virus during an outbreak in Southern Russia, 1999 / D.K. Lvov [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2000. — № 6. — P. 373–376.

6. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses / J.S. Mackenzie [et al.] // Nature Med. — 2004. — Vol. 10, № 12. — P. 98–109.

7. Zeller, H.G. West Nile virus: an overiew of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas / H.G. Zeller, I. Schuffenecker // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 23, № 3. — P. 147–156.

8. Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000 / M.Y. Chowers [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2001. — № 7. — P. 675–678.

9. Environmental drivers of West Nile fever epidemiology in Europe and Western Asia / S. Paz [et al.] // Int. J. Environ. Res. Public Health. — 2013. — Vol. 10. — P. 3543–3562.

WEST NILE VIRUS INFECTION IN BLOOD-SUCKING MOSQUITOES AND MIDGES IN THE REPUBLIC OF BELARUS IN 2011–2013

Soglaeva A.A.[1], Samoilova T.I.[1], Klimovich O.V.[1], Azarova I.A.[1], Yashkova S.E.[2], Vedenkov A.L.[2]
[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk;
[2]Republican Center for Hygiene, Epidemiology &Public Health, Minsk, Belarus.

In the paper results obtained on detection of West Nile virus in blood-sucking mosquitoes and midges collected in Belarus in 2011–2013 are presented.

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

Поступила 27.07.2014

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

Спиридонов В.Е., Чернякова Н.И.
Витебский областной клинический кожно-венерологический диспансер, Витебск, Беларусь

Реферат. В статье рассмотрены основные методы лабораторной диагностики герпетической инфекции с обсуждением проблемы их использования в практическом здравоохранении. Представлены данные о необходимости обследования пациентов без клинических проявлений и при субклиническом течении инфекции.

Ключевые слова: герпесвирусная инфекция, диагностика, полимеразная цепная реакция.

Введение. Герпетическая инфекция является одной из самых распространенных вирусных инфекций человека и представляет собой серьезную медико-социальную проблему.

Вирусом простого герпеса инфицировано свыше 90% людей земного шара и до 20–30% из них имеют те или иные клинические проявления. Европейским бюро ВОЗ герпетическая инфекция отнесена в группу болезней, которые определяют будущее инфекционной патологии.

По данным ВОЗ, генитальный герпес занимает 3-е место в структуре инфекций, передаваемых половым путем, уступая лишь гонорее и негонококковым уретритам, и 2-е место после гриппа в структуре смертности от вирусной патологии.

Женщины инфицируются вирусом простого герпеса почти в 2 раза чаще, чем мужчины, что в условиях растущего иммунодефицита и широкого распространения инфекции представляет серьезную опасность для репродуктивного здоровья населения. Частота генитальной герпетической инфекции среди женщин репродуктивного возраста составляет около 25%, при этом истинная ситуация не поддается контролю из-за значительной частоты бессимптомных форм и вирусоносительства. Заражение вирусом простого герпеса нередко приводит к бесплодию, невынашиванию и осложненному течению беременности, родов и послеродового периода, развитию внутриутробной патологии, перинатальной заболеваемости и смертности, рождению детей с тяжелыми физическими и умственными отклонениями [1] .

Медицинская и социальная значимость проблемы герпетической инфекции в современных условиях заслуживает серьезного внимания и требует от врача высоких профессиональных навыков по ведению данной категории пациентов.

Цель работы — изучение роли молекулярно-генетических методов в диагностике герпетической инфекции у пациентов с ИППП, разработка рациональных алгоритмов диагностики инфекции для практического здравоохранения.

Материалы и методы. Сегодня существует довольно большое количество разнообразных методов лабораторной диагностики герпетической инфекции, отличающихся по точке приложения, длительности выполнения, чувствительности и специфичности. Это создает мнимое впечатление о легкости диагностики болезней, вызванных герпесвирусными агентами. Однако важно отметить, что не каждый из приведенных методов может быть достаточно достоверным способом верификации диагноза в конкретных случаях и удобным для практического здравоохранения, поэтому для

выбора рационального подхода к диагностике клиницист должен быть хорошо осведомлен о потенциальных возможностях того или иного диагностического теста, его преимуществах и недостатках при разных формах герпесвирусных инфекций.

Вирусологический метод. Его сущность состоит в выделении вируса в культурах чувствительных клеток (например, эмбриональных фибробластов) или куриных эмбрионах. Он по-прежнему остается «золотым стандартом» диагностики вирусных инфекций человека, поскольку характеризуется высокой чувствительностью (85–100%) и специфичностью (100%), а также позволяет получить чистую культуру вируса для дальнейшего изучения, в частности, испытания чувствительности к противовирусным препаратам. Однако существенная дороговизна и трудоемкость препятствуют широкому внедрению вирусологического метода в повседневную клиническую практику. Кроме того, результаты этого исследования получают слишком поздно (от 2 до 20 дней после забора биоматериала), поэтому использовать такую диагностику при неотложных состояниях нерационально [2].

Электронная микроскопия позволяет выявить вирусные частицы в исследуемом образце (биоптате, культуре клеток, аутопсийном материале) и определить видовую принадлежность вирионов по их морфологическим признакам, однако этот метод все еще малодоступен для клинической практики и используется в основном в научных целях [3].

Биологическая проба состоит в заражении чувствительных лабораторных животных (белых мышей или кроликов) биоматериалом, полученным от пациента с герпетической инфекцией. Этот метод может быть использован в спорных случаях герпесвирусной инфекции, например, для диагностики атипического герпетического энцефалита, при сомнительных результатах ДНК-диагностики и иммуноморфологических методов исследования [4].

Сегодня главенствующую роль в верификации герпесвирусных инфекций человека играют методы ДНК-диагностики, в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ДНК-гибридизация.

Гибридизация ДНК — высокоспецифический метод, позволяющий идентифицировать геном вируса после его гибридизации с комплементарными молекулами ДНК-диагностикума. Метод позволяет определить способность исследуемой вирусной ДНК гибридизироваться (специфически связываться) с меченой комплементарной ДНК известной природы, на основании чего делается вывод о видовой принадлежности исследуемого образца нуклеиновой кислоты. При этом специфичность указанного метода прямо пропорциональна длине комплементарной полинуклеотидной цепочки. В качестве маркера применяют ферменты (например, пероксидазу, щелочную фосфатазу) или изотопы. Кроме того, для выявления феномена гибридизации проводят электрофорез в геле, позволяющий дифференцировать электрофоретическую подвижность комплементарной ДНК и комплекса «комплементарная ДНК – ДНК вируса» [2]. Недостатками ДНК-гибридизации является сравнительно длительное время выполнения (в среднем 5–7 сут), что может создавать существенные затруднения при диагностике ургентных состояний, а также высокая частота ложноотрицательных результатов при низком количестве вирусной ДНК в исследуемой пробе.

ПЦР — наиболее широко используемый метод диагностики герпетических инфекций человека. В основе метода лежит катализируемое ферментом термостабильной ДНК-полимеразой многократное образование копий (*амплификация*) определенного участка ДНК, представляющего диагностический интерес. При этом для амплификации, т. е. синтеза ДНК-матрицы, отбирают наиболее консервативную часть вирусного генома, обычно какой-нибудь уникальный ген, который наиболее четко отличает его от прочих патогенов. ПЦР — высокоточный метод. Теоретически для получения результата достаточно иметь в среде всего одну молекулу ДНК возбудителя. Чувствительность ПЦР составляет 98%, а специфичность — 94%. Ложноотрицательные результаты возможны при несоблюдении технологических процедур исследования, а также при использовании некачественных реактивов. Ложноположительные данные можно получить при подсчете результатов методом электрофореза, что связано с возможностью контаминации воздушной среды рабочего пространства ампликонами, выявленными в ходе предварительных постановок. Предпочтительнее использовать закрытые методики подсчета, например, иммунофлуоресцентные детекторы, при которых нет прямого контакта между продуктами реакции и воздушной средой, а результаты исследования являются более корректными.

Наиболее точной является методика так называемой *real-time ПЦР*, т. е. ПЦР в реальном времени. Ее отличительным свойством является подсчет количества амплифицированных ДНК по мере

их накопления после каждого амплификационного цикла, а не в конце постановки. ПЦР как диагностический метод лишена основных недостатков ДНК-гибридизации, в частности, характеризуется повышенной чувствительностью, что связано с искусственным повышением содержания вирусной нуклеиновой кислоты в исследуемом материале. Также за счет проведения ПЦР существенно ускоряется время получения результата исследования. Если при ДНК-гибридизации может понадобиться около 5–7 сут, то результат ПЦР-диагностики доступен уже через 3–6 ч после начала проведения [2]. Это преимущество имеет огромное значение при неотложных состояниях, вызванных герпесвирусной инфекцией, когда необходимо установить диагноз в течение суток. Все эти особенности обеспечили беспрецедентный успех ПЦР как диагностического теста при вирусных инфекциях человека [5].

Методы определения вирусных антигенов (иммуноморфологические методы) позволяют выявить специфические вирусные молекулы, входящие в состав капсида и мембраноподобной оболочки вирионов. Для их идентификации используют специфические моноклональные антитела, а результат определяют по изменению окраски субстрата в реакции иммуноферментного анализа (ИФА) или по феномену свечения при использовании метода флуоресцирующих антител (МФА). Специфичность таких методов составляет около 90%, однако чувствительность гораздо ниже, чем у ПЦР (55–75%) [6].

Серологические методы (реакции нейтрализации, связывания комплемента, гемагглютинации, иммунофлуоресценции и др.) позволяют оценить характер и напряженность специфического гуморального иммунитета и не предоставляют прямой информации для подтверждения диагноза герпесвирусной инфекции. Наличие противогерпетических IgM свидетельствует об определенной остроте процесса (первичная инфекция, реинфекция, реактивация). Специфические IgG являются антителами вторичного иммунного ответа и выявляются во второй половине инфекционного процесса при первичном заражении, а также в случае латентных инфекций (иммунная память), при персистенции и реактивации патогена. Поэтому определение таких иммуноглобулинов не позволяет точно оценить клиническое значение имеющейся инфекции и не может быть достаточно надежным критерием для установления диагноза и назначения противовирусного лечения [3].

Данное исследование проводилось с участием 100 пациенток в возрасте от 20 до 39 лет, которые обратились в УЗ «ВОККВД» для обследования на ИППП. У 50 пациенток в анамнезе за последние 5 лет были клинические проявления герпетической инфекции, наличие других ИППП, отягощенный акушерский анамнез. Группу сравнения составили женщины с благополучным акушерским анамнезом, без ИППП и клинических проявлений герпетической инфекции на момент обследования.

Материалом для исследования послужило отделяемое цервикального канала. Проводили исследование на наличие ДНК вируса простого герпеса 1, 2 типов. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения прибора RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия) для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналам для регистрации скопления продуктов амплификации фрагментов ДНК и по каналу для регистрации продукта амплификации ДНК внутреннего контрольного образца. Результаты интерпретировали по пересечению или отсутствию такового кривой флюоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяло наличие для данной пробы ДНК значения порогового цикла «Ct». Статистическая обработка данных проведена с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение. Сравнимые группы были сопоставимы по возрасту, средний возраст обследуемых пациенток составил в основной группе 29,4±6,3 (20–35) года, в группе сравнения — 30,6±6,2 (23–39) года.

По результатам исследований в основной группе (n = 50) выявлена ДНК вируса простого герпеса 1, 2 типов у 11 (22,0%) пациенток, в группе сравнения (n = 50) выявлена ДНК вируса простого герпеса 1, 2 типов у 2 (4,0%) пациенток.

Зарубежными и отечественными исследователями доказано, что у лиц с субклиническими симптомами генитального герпеса и без них происходит периодическое выделение вируса. Передача вируса простого герпеса от инфицированного партнера здоровому в большинстве случаев происходит при субклиническом течении инфекции [7], что подтверждает важность обследования половых партнеров женщин, у которых отсутствуют клинические проявления инфекции.

Выводы:

1. Для диагностики герпетической инфекции оптимальным является метод амплификации нуклеиновых кислот.

2. ПЦР-диагностика в режиме реального времени позволяет получить более достоверные результаты исследования.

3. Необходимо проводить обследование на герпетическую инфекцию пациентов, у которых отсутствуют клинические проявления инфекции.

Заключение. Исследование показало, что метод ПЦР в режиме реального времени является оптимальным для диагностики герпетической инфекции в практическом здравоохранении.

Литература

1. Близнюк, Е.А. Генитальный герпес: этиопатогенез, клиника, диагностика, лечение / Е.А. Близнюк, С.Г. Зражевская, Ю.П. Шихалева. — Спб.: Альфа-лидер, 2006. — 85 с.
2. Исаков, В.А. Герпесвирусные инфекции человека / В.А. Исаков, Е.И. Архипова, Д.В. Исаков. — СПб.: СпецЛит, 2006. — 304 с.
3. Абатуров, А.Б. HHV-6 инфекция у детей / А.Б. Абатуров, Л.Р. Шостакович-Корецкая // Здоровье ребенка. — 2007. — № 3. — С. 70–80.
4. Postentry events are responsible for restriction of productive varicella-zoster virus infection in Chinese hamster ovary cells / R.L. Finnen [et al.] // J. Virol. — 2006. — Vol. 80. — P. 10325–10334.
5. Мальцев, Д.В. Современные методы диагностики герпесвирусных инфекций человека и принципы интерпретации их результатов / Д.В. Мальцев // Клин. иммунология. Аллергология. Инфектология. — 2010. — № 1. — С. 23–33.
6. Иммунология / Д. Мейл [и др.]. — М.: Логосфера, 2007. — 556 с.
7. Гомберг, М.А. Снижение риска передачи инфекции как цель терапии генитального герпеса: обзор литературы / М.А. Гомберг // Российский журнал кожных и венерических болезней. Приложение «Герпес». — 2009. —- № 1. —- С. 41–42.

ROLE OF MOLECULAR AND GENETIC METHODS IN DIAGNOSIS OF HERPES INFECTION

Spiridonov V.E., Cherniakova N.I.

Vitebsk Regional Clinical Dermatovenerologic Dispensary, Vitebsk, Belarus

The paper describes the main methods of laboratory diagnosis of herpes infection with discussion of the problem of their use in medical practice. Discussed to a desired examination of patients without clinical manifestations and subclinical infection.

Keywords: herpesvirus infection, diagnosis, polymerase chain reaction.

Поступила 10.07.2014

РОЛЬ СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ Г. МИНСКА К ВИРУСУ ГЕПАТИТА *А*

Федорова И.В.[1], Чистенко Г.Н.[1], Северинчик И.В.[1], Глинская И.Н.[2], Фисенко Е.Г.[2], Левшина Н.Н.[2]

[1]Белорусский государственный медицинский университет, Минск;

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

Реферат. В статье представлены результаты изучения популяционного иммунитета к вирусу гепатита *А* среди различных возрастных групп населения г. Минска. Установлен удельный вес лиц разного возраста с защитной концентрацией антител (20 мМЕ/мл) к вирусу гепатита *А*. Выявлено сочетанное влияние факторов «возраст» и «занятость/профессия» на иммунологическую структуру взрослого населения. Рассчитаны показатели спрогнозированной вероятности наличия защитной концентрации антител в различных возрастных и профессиональных группах населения г. Минска. Установлены возрастные и профессиональные группы с высоким риском инфицирования и заболевания вирусным гепатитом *А*. Рекомендована вакцинация лицам из групп риска.

Ключевые слова: вирусный гепатит *А*, защитная концентрация антител, популяционный иммунитет, группы риска.

Введение. В последние годы в Республике Беларусь произошли существенные изменения эпидемического процесса вирусного гепатита *А* (ВГА). Показатель заболеваемости ВГА населения страны на протяжении последних девяти лет не превышал 10 случаев на 100 000 населения. Тем не менее регистрируемый уровень заболеваемости лишь частично отражает истинную интенсивность эпидемического процесса, что связано со значительным количеством субклинических и безжелтушных форм [1, 2]. Объективные суждения об интенсивности эпидемического процесса ВГА и других его закономерностях на конкретной территории могут быть сформированы лишь в результате сочетанного анализа регистрируемой заболеваемости и данных мониторинга популяционного иммунитета [3, 4].

С целью выявления контингентов населения, не имеющих протективного иммунитета к возбудителю, установления роли социально-экономических факторов в иммунной структуре нами был проведен мониторинг популяционного иммунитета к вирусу гепатита А (ГА).

Материалы и методы. Материалом для изучения состояния иммунитета к вирусу ГА среди различных групп населения г. Минска являлись 1274 сывороток крови детей и взрослых в возрасте от 1 до 63 лет, отобранных случайным образом из числа пациентов, обратившихся за оказанием медицинских услуг в поликлиники г. Минска. Субъекты принимались в исследование только после подписания информированного согласия. Для каждого участника заполнялась индивидуальная анкета. При изучении состояния иммунитета сыворотка пациентов отделялась от крови и тестировалась для обнаружения суммарных антител к вирусу ГА методом комбинированной ингибирующей технологии с флуоресцентным количественным определением суммарных антител на автоматическом анализаторе miniVidas в микробиологической лаборатории МингорЦГЭ. Для иммуноферментного анализа использовалась тест-система VIDAS Anti-HAV Total (HAVT) REF 30312 (БиоМерье, Франция). Для исследования использовалась сыворотка в разведении 1:100. Результаты определения концентрации антител представлены в мМЕ/мл (стандарт ВОЗ). Серопозитивными считали пациентов с защитной концентрацией антител к вирусу ГА 20 мМЕ/мл и более.

Оценку риска инфицирования вирусом ГА в различных возрастных и профессиональных группах проводили с использованием показателя отношения шансов. Статистической проверке подвергалась нулевая гипотеза об отсутствии статистической связи между удельным весом неиммунных лиц и восприимчивостью к вирусу ГА. Доверительные интервалы рассчитывали методом Вильсона без поправки на непрерывность. Для выявления статистической связи между различными предикторами и зависимой переменной «наличие защитной концентрации антител» использовали критерий Крамера (V) [5, 6]. Социально-экономическими предикторами являлись: возраст, пол, занятость (социальный статус, профессиональная принадлежность), количество человек в семье, наличие в семье детей до 14 лет, общая площадь на 1 человека, доход на одного члена семьи. Статистической проверке подвергалась нулевая гипотеза об отсутствии статистической связи между зависимой переменой и предикторами.

Расчет спрогнозированной вероятности наличия защитной концентрации антител в различных возрастных и профессиональных группах проводили с использованием метода бинарной логистической регрессии [6]. Обработку полученных результатов исследований проводили с применением пакета прикладных программ SPSS for Windows версия 19.0.

Результаты и их обсуждение. При изучении состояния популяционного иммунитета к вирусу ГА среди совокупного населения г. Минска установлены общие закономерности, свойственные для территорий с умеренным типом эпидемического процесса [3, 4]. Особенности проявления эпидемического процесса ВГА на территории крупного промышленного города, существующая система эпидемиологического надзора оказали влияние на формирование иммунологической структуры населения к вирусу ГА.

В результате обследования 1274 человек было установлено, что частота выявления защитной концентрации антител к вирусу ГА среди совокупного населения г. Минска составила 27,9±1,3%, при этом доля иммунных лиц в возрасте 1–17 лет и 18 лет и старше составила 12,6±1,2 и 49,8±2,2% соответственно.

Частота выявления антител к вирусу ГА в возрастных группах населения г. Минска различалась. Так, у детей 1–5 лет антитела к вирусу ГА были обнаружены в 12,3±2,4% случаев. У детей 6–9 лет доля серопозитивных лиц составила 17,9±7,2%, у детей и подростков 10–14 лет — 12,6±2,2%,

среди подростков 15–17 лет — 12,2±1,9%, среди взрослых 18–19 лет — 13,0±5,0%. Достоверные различия в показателях относительной частоты выявления анти-ВГА среди детей и подростков, а также лиц 18–19 лет отсутствовали (p>0,05).

Установлено достоверное увеличение удельного веса серопозитивных лиц в возрастной группе 20–29 лет, где показатель частоты выявления защитной концентрации антител к вирусу ГА был в 2,8 раз выше по сравнению с таковым у лиц 18–19 лет (p<0,05). Увеличение доли иммунных лиц в группе 20–29 лет сопряжено также с возрастанием доли лиц, больных ВГА, указанной возрастной группы на современном этапе развития эпидемического процесса. Так, если в группе 18–19 лет среднемноголетний удельный вес заболевших ВГА составил 13,1±0,5%, то в группе 20–29 лет он увеличился в 2,5 раза (32,9±0,8%, p<0,05).

Доля иммунных лиц среди взрослого населения старше 20 лет нарастала постепенно по мере увеличения возраста. Показатели относительной частоты выявления защитной концентрации антител среди взрослого населения достоверно отличались (p<0,05), за исключением возрастных групп 20–29 и 30–39 лет (p>0,05). У обследованных в возрасте 30–39 лет доля серопозитивных лиц составила 45,0±5,0%, 40–49 лет — 68,1±4,3%. Максимальных показателей частота выявления антител к вирусу ГА в г. Минске достигала 93,4±3,2% у лиц в возрастной группе 50 лет и старше.

Рассчитанный показатель отношения шансов (OR) в возрастных группах также значительно отличался (рисунок). Анализ показал, что в сравнении с взрослыми лицами 50 лет и старше шанс встретить восприимчивого к вирусу ГА среди детей 1–5 лет и 15–17 лет был выше в 101,5 и 102,2 раза соответственно. Также высоким сохраняется шанс встретить серонегативного среди детей 6–9 лет и 10–14 лет, показатель OR в данных группах составил 65,6 и 99,3 соответственно. В возрастной группе 18–19 лет показатель OR составил 95,0. Повозрастная динамика показателей отношения шансов показала, что шанс встретить восприимчивого к вирусу ГА в более старших возрастных группах уменьшался.

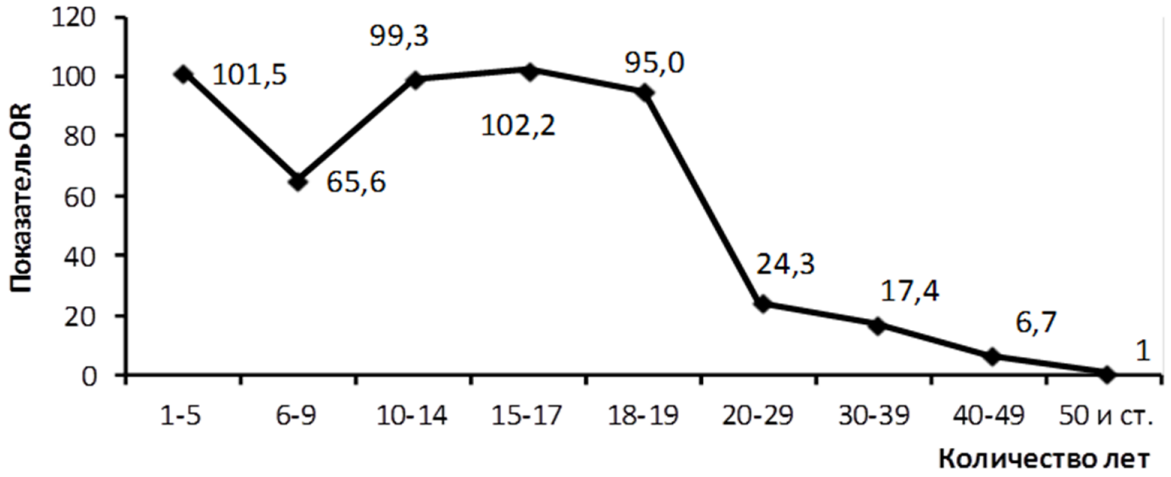


Рисунок — Возрастная динамика шансов встречи восприимчивых лиц к вирусу гепатита *А* населения г. Минска

Среди мужского населения доля иммунных лиц составила 45,9%, женского — 49,7% (p>0,05).

Частота встречаемости защитной концентрации антител к вирусу ГА среди взрослого населения с количеством человек в семье 6 и более составила 64,3%, 4–5 человек — 47,2%, 2–3 человека — 47,8%, 1 человек — 57,1% (p>0,05).

Удельный вес серопозитивных лиц с одним ребенком в семье до 14 лет составил 45,2%, 2 ребенка и более — 50,0%, нет детей до 14 лет — 49,4% (p>0,05).

В семьях с общей площадью на одного человека меньше 18 м^2 доля серопозитивных составила 49,8%, больше 18 м^2 — 46,8% (p>0,05).

Распределение иммунных лиц среди взрослого населения в зависимости от дохода на одного члена семьи было следующим: доход меньше прожиточного минимума — 60,0%, прожиточный минимум — 48,2%, больше прожиточного минимума — 46,7% (p>0,05).

При изучении состояния иммунитета к вирусу ГА в отдельных социально-профессиональных группах населения г. Минска установлено, что среди рабочих суммарные антитела в защитном титре были обнаружены в 60,0% случаев, что статистически достоверно выше, чем среди учителей/государственных служащих/работников офиса (47,1%) и студентов (13,0%). Доля серопозитивных лиц среди работников здравоохранения составила 54,2%, работников сферы питания — 45,7%, домохозяек и безработных лиц — 55,7% (p>0,05). Минимальных показателей частота выявления антител к вирусу гепатита *А* достигала у лиц, относящихся к группе студентов, 13,0%, что объясняется возрастными особенностями иммунологической структуры при ВГА (таблица 1). Так, например, в возрастной группе 18–19 лет удельный вес студентов составлял 71,7%, в группе 20–29 лет — 17,2%, в группе 30–39 лет — 1,0%.

Таблица 1 — Частота выявления защитной концентрации суммарных антител к вирусу гепатита *А* и отношения шансов в социально-профессиональных группах взрослого населения г. Минска

Занятость	Число обследованных	Серопозитивные (20 мМЕ/мл и более)				
		абс. число	частота, %	95% ДИ	OR	95% ДИ
Рабочие (референтная группа)	155	93	60,0±	52,1–67,4	1	
Учителя/государственные служащие/работники офиса	119	56	47,1±	38,3–56,0	1,7	1,04–2,73
Работники здравоохранения	48	26	54,2±	40,3–67,4	1,3	0,66–2,44
Работники сферы питания	35	16	45,7±	30,5–61,8	1,8	0,85–3,73
Домохозяйки/безработные лица	79	44	55,7±	44,7–66,1	1,2	0,69–2,06
Студенты	69	9	13,0±	7,0–23,0	10,0	4,63–21,62

Для установления влияния социально-экономических факторов на иммунологическую структуру взрослого населения г. Минска проведено изучение статистической зависимости между зависимой переменной «наличие защитной концентрации суммарных антител к вирусу ГА» и независимыми переменными — предикторами.

На основании полученных значений критерия Крамера и ошибки достоверности различий установлено наличие статистической зависимости между зависимой переменной «защитная концентрация антител» и предикторами «возраст», «занятость/профессия» (значение критерия Крамера и ошибки достоверности различий составили 0,494; p<0,001 и 0,328; p<0,001 соответственно). Наличие статистической связи позволяет утверждать, что данные предикторы являются факторами, оказывающими влияние на вероятность инфицирования и заболевания ВГА.

В результате обработки данных методом бинарной логистической регрессии вычислены спрогнозированные показатели вероятности наличия защитной концентрации антител к вирусу ГА среди взрослого населения г. Минска в зависимости от сочетанного влияния факторов «возраст» и «занятость/профессия» (таблица 2).

Таблица 2 — Спрогнозированная вероятность наличия защитной концентрации суммарных антител к вирусу гепатита *А* населения г. Минска в зависимости от сочетанного влияния факторов «возраст» и «занятость/профессия»

Профессия	Показатель спрогнозированной вероятности наличия защитной концентрации антител, %				
	18–19 лет	20–29 лет	30–39 лет	40–49 лет	50 лет и старше
Рабочие	27,9	47,2	51,0	71,6	94,8
Учителя/государственные служащие/работники офиса	17,8	33,3	36,7	58,5	91,1
Работники здравоохранения	–	40,4	44,2	65,8	93,3
Работники сферы питания	17,0	32,1	35,5	57,3	90,6
Домохозяйки/безработные лица	23,9	42,0	45,7	67,2	93,7
Студенты	8,3	17,3	19,6	–	–

С целью определения меры влияния конкретного фактора на вероятность наличия защитной концентрации суммарных антител к вирусу ГА нами было введено понятие коэффициента нагрузки зависимой переменной изучаемым фактором (КН). КН представляет собой математическую разницу между вероятностью серопозитивных лиц при сочетанном влиянии обоих факторов «возраст», «занятость/профессия» и спрогнозированной вероятностью наличия защитной концентрации антител при влиянии одного фактора «возраст». Коэффициент нагрузки зависимой переменной изучаемым фактором может принимать положительное и отрицательное значение. Положительное значение КН свидетельствует об усилении влияния фактора «занятость/профессия», увеличивая тем самым вероятность быть невосприимчивым к вирусу ГА в зависимости от профессиональной деятельности. Отрицательное значение КН указывает на увеличение вероятности быть восприимчивым в различных профессиональных группах (таблица 3).

Таблица 3 — Коэффициенты нагрузки зависимой переменной «наличие защитной концентрации суммарных антител» изучаемым фактором «занятость/профессия»

Профессия/занятость	Возрастная группа				
	18–19 лет	20–29 лет	30–39 лет	40–49 лет	50 лет и старше
Рабочие	15,1	18,1	9,1	7,7	-0,2
Учителя/государственные служащие/ работники офиса	6,7	-3,5	-5,9	-13,8	-4,5
Работники здравоохранения	–	3,9	-0,1	-0,9	1,1
Работники сферы питания	4,0	4,7	-7,0	-7,9	-2,0
Домохозяйки/безработные лица	12,0	5,9	0,8	3,6	3,5
Студенты	-14,8	-22,7	-24,4	–	–

В возрастной группе 18–19 лет удельный вес лиц с защитной концентрацией антител к вирусу ГА составил 13,0%. Последовательное исключение из анализа лиц, относящихся к различным профессиональным группам, позволило вычислить спрогнозированную вероятность серопозитивных лиц в зависимости от влияния в отдельности фактора «возраст». Полученное значение спрогнозированной вероятности находилось в пределах 11,1–13,3% и практически совпадало с фактическим популяционным удельным весом иммунных лиц. Исключение составляют 28% лиц в возрасте 18–19 лет, не относящихся к студентам, у которых удельный вес иммунных лиц составил 23,1%. Такое расхождение в значениях удельного веса объясняется тем, что на долю студентов в данной возрастной группе приходится 72%. Спрогнозированная вероятность наличия защитной концентрации антител в зависимости от сочетанного влияния факторов «возраст» и занятость/профессия» составила: рабочие — 27,9%, учителя/госслужащие/работники офиса — 17,8%, работники сферы питания — 17,0%, домохозяйки/безработные лица — 23,9%, студенты — 8,3%. Максимальные значения КН зависимой переменной приходились на факторы «занятость — студент» — (-14,8), «занятость — домохозяйки/ безработные лица» — 12,0, «профессия — рабочие» — 15,1.

В возрастной группе 20–29 лет популяционный удельный вес иммунных лиц составил 36,9%. Спрогнозированная вероятность серопозитивных лиц в данной возрастной группе находилась в пределах 29,1–40,0%. Спрогнозированная вероятность серопозитивных лиц при сочетанном влиянии факторов «возраст» и «занятость/профессия» составила: рабочие — 47,2%, учителя/госслужащие/работники офиса — 33,3%, работники здравоохранения — 40,4% работники сферы питания — 32,1%, домохозяйки/безработные лица — 42,0%, студенты — 17,3%. В целом по разным профессиям спрогнозированный удельный вес серопозитивных лиц не отличался от фактической доли иммунных в популяции, за исключением рабочих и студентов, где КН составил 18,1 и -22,7 соответственно.

Среди лиц в возрасте 30–39 лет на долю иммунных лиц приходилось 45,0% населения. Показатель спрогнозированной вероятности иммунных лиц находился в пределах 41,9 до 44,9%. Спрогнозированная вероятность серопозитивных лиц в профессиональных группах данной возрастной категории составила: рабочие — 51,0%, учителя/госслужащие/работники офиса — 36,7%, работники здравоохранения — 44,2% работники сферы питания — 35,5%, домохозяйки/безработные лица — 45,7%, студенты — 19,6%. Максимальные значения КН определялись среди студентов (-24,4) и рабочих (9,1).

Доля иммунных лиц в возрастной группе 40–49 лет составляла 68,1%. Спрогнозированная вероятность иммунных лиц среди возрастного контингента 40–49 лет составила 63,6–72,3%. Влияние на зависимую переменную «защитная концентрация антител» фактора «занятость/профессия отмечалось только в группе учителя/госслужащие/работники офиса, где КН составил -13,8.

В возрастной группе 50 лет и старше спрогнозированная вероятность наличия защитной концентрации антител в различных профессиональных группах не отличалась (90,6–94,8%) и отражала фактическое состояние коллективного иммунитета к вирусу ГА у населения данной возрастной группы (93,4%).

Выводы:

1. В результате изучения состояния популяционного иммунитета к вирусу ГА совокупного населения г. Минска выявлены возрастные группы восприимчивые к данной инфекции. Так, дети и подростки, а также лица 18–19 лет более чем в 82% случаев (82,1–87,8%) в равной степени остаются незащищенными от вируса ГА. Именно в этих группах существует высокий шанс (OR 65,6–102,2) заболевания ВГА в случае инфицирования вирусом.

2. Более половины взрослого населения в возрасте 20–29 и 30–39 лет остаются восприимчивыми к вирусу ГА, доля серонегативных лиц в данных группах составляет 63,1±3,4 и 55,0±5,0% соответственно. Удельный вес иммунных лиц в группе 40–49 лет приближается к пороговому значению доли серопозитивных (70% и выше), при котором популяционный иммунитет к ВГА обеспечивает достаточный противоэпидемический уровень защиты в соответствующих возрастных группах [7]. Население 40–49 лет и старше 50 лет формируют протективную прослойку иммунных лиц с удельным весом иммунных лиц 68,1 и 93,4% соответственно.

3. Установлено отсутствие влияния на иммунологическую структуру населения г. Минска таких социально-экономических факторов, как пол, размер семьи, количество в семье детей до 14 лет, общая площадь на одного человека, доход на одного члена семьи.

4. Наличие статистической связи между зависимой переменной «защитная концентрация антител» и независимыми переменными «возраст», «занятость/профессия» позволяет утверждать, что данные предикторы являются факторами, оказывающими влияние на вероятность инфицирования и заболевания ВГА. Спрогнозированная вероятность серонегативных (восприимчивых) лиц 18–19, 20–29 лет среди студентов составляет 91,7 и 82,7% соответственно. Именно в этих группах существует высокий риск заболевания ВГА в случае инфицирования. В целях профилактики ВГА контингентам из групп риска по инфицированию и заболеванию рекомендуется вакцинация.

Литература

1. Исследование иммунной прослойки лиц к вирусному гепатиту *А* у населения района эндемичного по этой инфекции / А.Я. Фольмер [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2007. — № 6. — С. 29–34.

2. Заболеваемость и иммунологическая структура населения при вирусном гепатите *А* в разные фазы развития многолетних эпидемических циклов / Л.И. Шляхтенко [и др.] // Журн. микробиологии. — 1994. — № 5. — С. 42–45.

3. Характеристика манифестного и скрытого компонентов эпидемического процесса гепатита *А* в городах России / С.Л. Мукомолов [и др.] // Журн. микробиологии. — 2001. — № 3. — С. 35–39.

4. Современные эпидемиологические закономерности гепатита *А* в Российской Федерации / И.В. Шахгильдян [и др.] // Мир вирусных гепатитов. — 2006. — № 1. — С. 10–13.

5. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. — М.: Медиа Сфера, 2002. — 312 с.

6. Наследов, А.Д. Математические методы психологического исследования: анализ и интерпретация данных / А.Д. Наследов. — СПб.: Речь, 2007. — 389 с.

7. Молекулярно-генетические технологии в изучении эпидемического процесса вирусного гепатита А / Т.Н. Быстрова [и др.] // Мед. альманах. — 2010. — № 2. — С. 242–245.

INFLUENCE OF SOCIAL AND ECONOMIC FACTORS ON IMMUNOLOGICAL STRUCTURE OF ADULT POPULATION IN MINSK TO VIRUS HEPATITIS *A*

Fyedorova I.V.[1], Chistenko G.N.[1], Severinchik I.V.[1], Clinskaya I.N.[2], Fisenko E.G.[2], Levshina N.N.[2]
[1]Belarusian State Medical University, Minsk;
[2]Minsk Municipal Center for Hygiene & Epidemiology, Minsk, Belarus

Results of studying of collective immunity to virus hepatitis *A* among various age groups of the population in Minsk are presented in the paper. The percent of different age groups with protective concentra-

tion of antibodies (20 mIU/mL) to virus hepatitis *A* are determined. At the age of 18–19 years the percent of immune persons — 13.0%, 20–29 years — 36.9%, 30–39 years — 45.0%, 40–49 years — 68.1%, 50 years are more senior — 93.4%. The combined influence factors of age and employment/profession on immunological structure are revealed. The predicted probabilities of existence of protective antibodies in various age and professional groups of the population of Minsk are calculated. Age and professional groups with high risk of infection and a disease of hepatitis *A* virus are established. Vaccination is recommended to persons from groups of risk.

Keywords: virus hepatitis *A*, protective concentration of antibodies, population immunity, risk groups.

Поступила 09.09.2014

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Шиманович В.П., Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А.
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Проводимый с конца декабря 2010 г. в Республике Беларусь молекулярно-эпидемиологический мониторинг эпидемического паротита основан на лабораторном обследовании каждого подозрительного случая с последующим изучением выделенного вируса. Среди 118 лабораторно подтвержденных случаев за период с 16 октября 2010 г. по 31 декабря 2012 г. выявлено 27 вакциноассоциированных случаев эпидемического паротита (далее — ВАЭП), 53 случая, связанных с горизонтальной трансмиссией вакцинного вируса, и 38 случаев, причина которых не установлена. Частота развития ВАЭП составила 1 случай на 10000 введенных первых доз вакцины против кори, эпидемического паротита и краснухи (далее — КПК) и 1 случай на 32000 введенных вторых доз вакцины КПК. Частота случаев эпидемического паротита, возникших в результате горизонтальной трансмиссии, составила 1 на 3500 введенных первых доз вакцины КПК. На основании результатов мониторинга Министерством здравоохранения Республики Беларусь принято решение о прекращении с октября 2012 г. использования вакцины, содержащей вакцинный штамм вируса паротита Leningrad-Zagreb. В 2013 г. зарегистрировано 5 лабораторно подтвержденных случаев эпидемического паротита, из которых 2 являются завозными. Существенное снижение заболеваемости подтверждает правильность решения о смене вакцины.

Ключевые слова: эпидемический паротит, вакциноассоциированные случаи, горизонтальная трансмиссия, вакцинация, заболеваемость

Введение. Эпидемический паротит является вакциноуправляемой инфекцией, первая вакцина против которого была разработана в 1946 г. Вакцина была основана на формалининактивированном диком вирусе и вызывала лишь краткосрочный иммунитет с низкой защитной эффективностью. В дальнейшем в Японии, Советском Союзе, Швейцарии и США были разработаны живые аттенуированные паротитные вакцины. Как минимум 11 вакцинных штаммов используется в мире, среди которых штамм Jeryl Lynn и производный от него штамм RIT 4385, а также штамм Urabe Am9 являются наиболее распространенными, затем следуют Leningrad-Zagreb и Leningrad-3. Использование других штаммов ограничено в большинстве случаев одной страной. Вакцина против эпидемического паротита может быть представлена как моновалентной вакциной, так и в комбинации с другими антигенами (комбинированная вакцина против кори, эпидемического паротита и краснухи) [1].

Используемые в настоящее время вакцины против эпидемического паротита продемонстрировали высокую эффективность в клинических исследованиях. Так, введение одной дозы вакцины, содержащей штамм Jeryl Lynn, вызывает 80–100% сероконверсию у вакцинированных лиц. Уровень сероконверсии для штамма Urabe составил 95%, Leningrad-3 — 89–98%, Leningrad-Zagreb — 87–100% [1–4].

Анализ вспышек эпидемического паротита продемонстрировал эпидемиологическую эффективность вакцин, содержащих штамм Jeryl Lynn, в пределах 63–96%, штамм Urabe — от 54,4 до 93% в зависимости от количества полученных доз вакцины [1, 4, 5].

Практическое применение паротитных вакцин показало их разную степень безопасности. Так, в США при использовании вакцины, содержащей штамм Jeryl Lynn, поствакцинальный асептический менингит встречается с частотой 1 случай на 100000 введенных доз КПК вакцины [6]. В Германии штамм Jeryl Lynn был ассоциирован с 0,1 случая асептического менингита на 100000 вакцинных доз [7]. Вакцина, содержащая паротитный штамм Urabe AM9, во многих странах была отозвана с рынка из-за чрезмерного количества вакциноассоциированного асептического менингита (от 9 до 100 случаев на 100000 введенных доз) [8, 9]. Асептический менингит является не редким явлением в поствакцинальном периоде и при использовании вакцин, содержащих штамм Leningrad-3. В Словении в 1979–1986 гг. частота асептического менингита оценивалась на уровне 100 случаев на 100000 введенных доз. Для штамма Leningrad-Zagreb также установлена связь между введением вакцины и возникновением асептического менингита. Во время кампаний массовой иммунизации показатель вакциноассоциированных менингитов составлял 1 случай на 3390—19247 введенных доз вакцины [10].

Для вакцинных штаммов Urabe, Leningrad-3 и Leningrad-Zagreb описаны случаи эпидемического паротита, возникшие в результате их горизонтальной трансмиссии.

Sawada с соавт. в 1993 г. описал передачу вакцинного штамма Urabe от вакцинированного ребенка его сестре [11]. В 2009 г. российскими учеными описаны случаи инфицирования в результате горизонтальной передачи вакцинного штамма Leningrad-3 [12]. Ряд публикаций касается выявленных в Хорватии случаев горизонтальной передачи штамма Leningrad-Zagreb и возникновения случаев эпидемического паротита у контактировавших лиц с развитием осложнений, в т. ч. в виде менингоэнцефалита. Заболевание у контактных возникало в период 31–45 дней от момента вакцинации ребенка и встречалось с частотой 1 на 5300 введенных доз вакцины [13, 14].

В Республике Беларусь вакцинация против эпидемического паротита внедрена в 1980 г. с использованием одной дозы моновакцины российского производства на основе штамма Leningrad-3. В 2000 г. в практику иммунизации внедрена двудозовая схема вакцинации. В период 2000–2004 гг. использовалась вакцина «Тримовакс» (производства Aventis Pasteur, Франция), содержащей штамм вируса паротита Urabe, и «Приорикс» (производства GlaxoSmithKline Biological, Бельгия), в состав которой входил штамм RIT 4385, с 2005 г. — вакцина КПК (производства Serum Institute of India, Индия), содержащая паротитный штамм Leningrad-Zagreb. Применение вакцинации в Республике Беларусь позволило снизить заболеваемость эпидемическим паротитом к 2013 г. в 402,2 раза по сравнению с довакцинальным периодом.

В 2010 г. показатель заболеваемости эпидемическим паротитом в Республике Беларусь впервые составил менее 1 на 100000 населения, что позволило с 16 декабря 2010 г. внедрить молекулярно-эпидемиологический мониторинг, основанный на лабораторном обследовании каждого случая, подозрительного на эпидемический паротит.

Цель работы — анализ случаев эпидемического паротита, выявленных в результате проведения молекулярно-эпидемиологического мониторинга за инфекцией в период с 16 декабря 2010 г. по 31 декабря 2013 г.

Материалы и методы. В период с 16 декабря 2010 г. по 31 декабря 2013 г. врачами амбулаторно-поликлинических и больничных организаций здравоохранения выявлено 694 подозрительных на эпидемический паротит случаев в 7 регионах страны среди лиц, обратившихся за медицинской помощью. Клинические образцы (сыворотка крови, моча и носоглоточный смыв, далее — НГС) от этих случаев были собраны и направлены для исследования в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии г. Минск.

Как подозрительные на эпидемический паротит рассматривались лица с острым проявлением одно- или двустороннего воспаления околоушных или других слюнных желез.

Критерии лабораторного подтверждения диагноза «эпидемический паротит» были следующими:

- определение IgM антител к вирусу паротита в сыворотке крови;
- определение РНК вируса паротита в клинических образцах (НГС и моча) методом ПЦР;
- изоляция вируса паротита в культуре клеток Vero с последующей идентификацией методом ПЦР.

Полученный положительный результат хотя бы одним из методов считался лабораторным подтверждением диагноза.

Определение IgM антител к вирусу паротита проведено с использованием иммуноферментных тест-систем производства Virion\Serion (Германия) или Simens (Германия).

Изоляция вируса паротита выполнена инокуляцией образцов НГС и мочи в культуру клеток Vero и культивированием в течение 7 дней при температуре 37ºС. В случае появления цитопатического эффекта, также как и при его отсутствии, супернатант культуры клеток собирали и использовали для выделения РНК.

Вирусную РНК выделяли из НГС, мочи и культуральной жидкости, используя наборы QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) или 5 MagMAX-96 Viral Isolation Kit (Ambion, США) с автоматизированным экстрактором MagMAX Express (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя.

Определение РНК вируса паротита выполняли методом ПЦР со специфическими праймерами к SH-гену. Обратная транскрипция и первый раунд ПЦР были выполнены с использованием ПЦР набора QIAGEN OneStep (QIAGEN, Германия) в объеме 25 µl с праймерами MuV-1f (5'-TCAACACAATATCAAGTA-3', 6119-6139) и MuV-1r (5'-TTCTGTGTTGTATTGTGA-3', 6556-6573). Условиями раунда были: начальная денатурация при 94ºС в течение 5 мин только с праймерами с последующим 50ºС в течение 30 мин, 95ºС в течение 15 мин, с последующими 40 раундами — 94ºС в течение 30 с, 50ºС — 30 с, 72ºС — 1 мин с последующей финальной эллонгацией при 72ºС в течение 5 мин. Второй раунд ПЦР проведен в объеме 25 µl, который включал 0,8 µM праймеров MuVf (5'-ATGATCTCATCAGGTAC-3', 6143-6159) и MuVr (5'-TCCTAAGTTTGTTCTGG-3', 6539-6555), 1X Standerd PCR Buffer, 1,8 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs, 0,5 U Taq DNA Polymerase (NEB, UK) и 1 µl продукта из первого раунда ПЦР. Условиями раунда были: 94ºС в течение 1,5 мин с последующими 30 циклами при 94ºС в течение 30 с, 55ºС — 30 с, 72ºС — 1 мин и финальной элонгацией при 72ºС в течение 5 мин. ПЦР были выполнены в Mastercycler Gradient (Eppendorf, Германия). Продукты амплификации анализировали в 1,5% агарозном геле, окрашенном GelStar Gel Stain (Lonza, США) с использованием электрофорезного буффера 1x TAE.

Амплифицированный в ПЦР продукт вырезали из геля и очищали с использованием набора QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия) и секвенировали в обоих направлениях с использованием BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США) на капиллярном секвенаторе (Model 3100 Avant, Applied Biosystems, США), используя ПЦР-праймеры в качестве сиквенс-праймеров.

Нуклеотидные последовательности выравнивали и анализировали с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с имеющимися в GenBank было выполнено с помощью BLAST сервера (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Генотипирование проведено на основании филогенетического анализа участка SH-гена (длиной 316 нуклеотидов) с использованием программы MEGA 5.0

Результаты и их обсуждение. Среди 694 подозрительных на эпидемический паротит случаев, выявленных за весь период наблюдения, 497 были выявлены с 16 декабря 2010 г. по 31 декабря 2012 г. и 197 — в 2013 г.

Анализ ситуации по заболеваемости эпидемическим паротитом в Республике Беларусь за период с 16 декабря 2010 г. по 31 декабря 2012 г. В анализируемый период эпидемический паротит был подтвержден в 118 из 497 подозрительных случаев (23,7%). В 92 случаях (79,7%) подтверждение диагноза «эпидемический паротит» основано на определении специфических IgM антител, в 8 случаях (6,8%) — на определении РНК вируса в НГС или моче и в оставшихся 16 случаях (13,5%) – на определении и специфических IgM антител и РНК вируса. Вирус паротита изолирован в культуре клеток из биологического материала 9 пациентов, у которых выявлялись специфические IgM антитела и/или РНК вируса.

Лабораторно подтвержденные случаи эпидемического паротита были зарегистрированы во всех 7 административных регионах страны: в г. Минске — 48 случаев, в Могилевской области — 25 случаев, Брестской — 13 случаев, Гродненской — 12 случаев, Гомельской — 10 случаев, Минской — 6 случаев и Витебской области — 4 случая. Возраст пациентов составлял от 1 года до 42 лет. Среди заболевших было 52 мужчин и 66 женщин (рисунок 1).

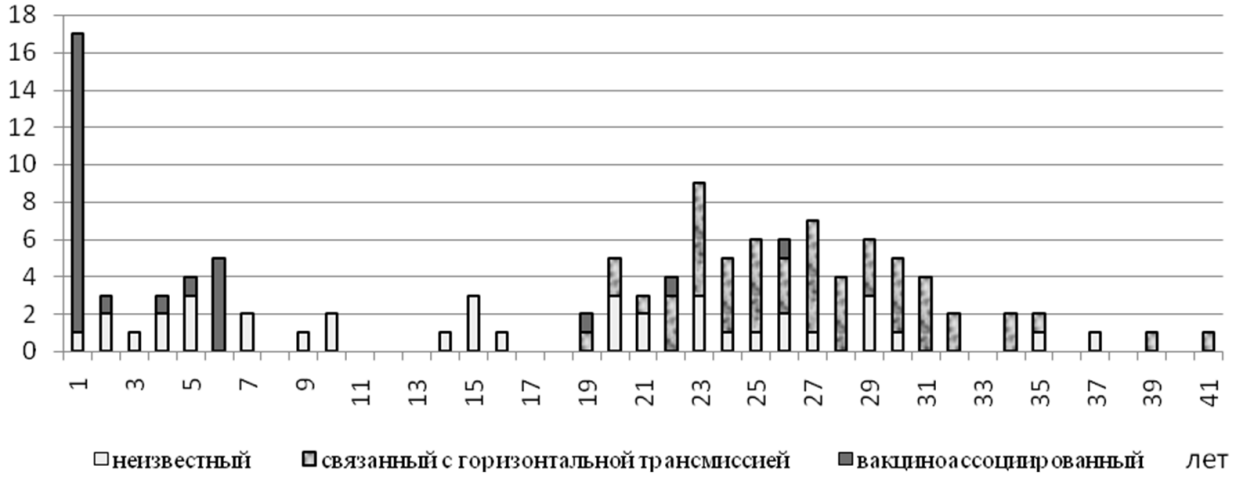


Рисунок 1 — Возрастная структура случаев эпидемического паротита в 2011–2012 гг. в Республике Беларусь

Среди 118 лабораторно подтвержденных случаев эпидемического паротита 27 (22,9%) зарегистрированы у лиц, недавно вакцинированных вакциной КПК, и отнесены к вакциноассоциированным случаям. Для 53 (44,9%) заболевших установлена эпидемиологическая связь с недавно вакцинированными детьми. Эти случаи предположительно (до проведения молекулярно-генетического исследования вируса) отнесены к случаям, связанным с горизонтальной трансмиссией вакцинного штамма от вакцинированных детей к восприимчивым лицам, находящимся с ними в близком контакте. В 38 (32,2%) случаях связь с вакцинацией отсутствовала.

Вакциноассоциированные случаи возникли с 11-го по 28-й день после иммунизации вакциной КПК. 19 случаев инфекции зарегистрированы у детей после введения им первой дозы вакцины КПК и 5 случаев — после введения второй дозы. Среди взрослых было зарегистрировано 3 вакциноассоциированных случая. Двое из этих взрослых (в возрасте 19 и 22 лет) были иммунизированы по эпидемическим показаниям во время вспышки кори в 2011 г. (Червенский район Минской области), третий (в возрасте 26 лет) — по причине поездки в страну с высоким уровнем заболеваемости корью.

У 8 из 27 пациентов имели место только симптомы паротита, у 19 пациентов паротит протекал с подъемом температуры тела: 37,1–37,9°С — 7 случаев, 38,0–38,9°С — 10 случаев, 39,0°С — 2 случая. У 22 пациентов отмечалось одностороннее поражение желез, у 5 — двустороннее. Панкреатит, как осложнение инфекции, диагностирован у двух взрослых. 12 из 27 лиц с вакциноассоциированным паротитом были госпитализированы.

Все 27 случаев ВАЭП лабораторно подтверждены как минимум одним из трех лабораторных методов, однако вирус в культуре клеток изолирован только в одном случае у ребенка в возрасте 1 года. Анализ SH-гена выделенного вируса показал 100% идентичность с вакцинным штаммом Ленинград-Загреб.

Частота развития вакциноассоциированного паротита составила 1 случай на 10000 введенных первых доз вакцины и 1 случай на 32000 введенных вторых доз вакцины и не являлась более высокой, чем описано в литературе.

Случаи, связанные с горизонтальной трансмиссией вакцинного штамма Ленинград-Загреб (53), зарегистрированы у взрослых лиц в возрасте 19–41 года. Длительность временного периода между вакцинацией ребенка и возникновением симптомов заболевания у контактировавших лиц варьировала от 29 до 59 дней. Случаи регистрировались почти ежемесячно в течение всего анализируемого периода (рисунок 2) и выявлены во всех административных регионах Беларуси.

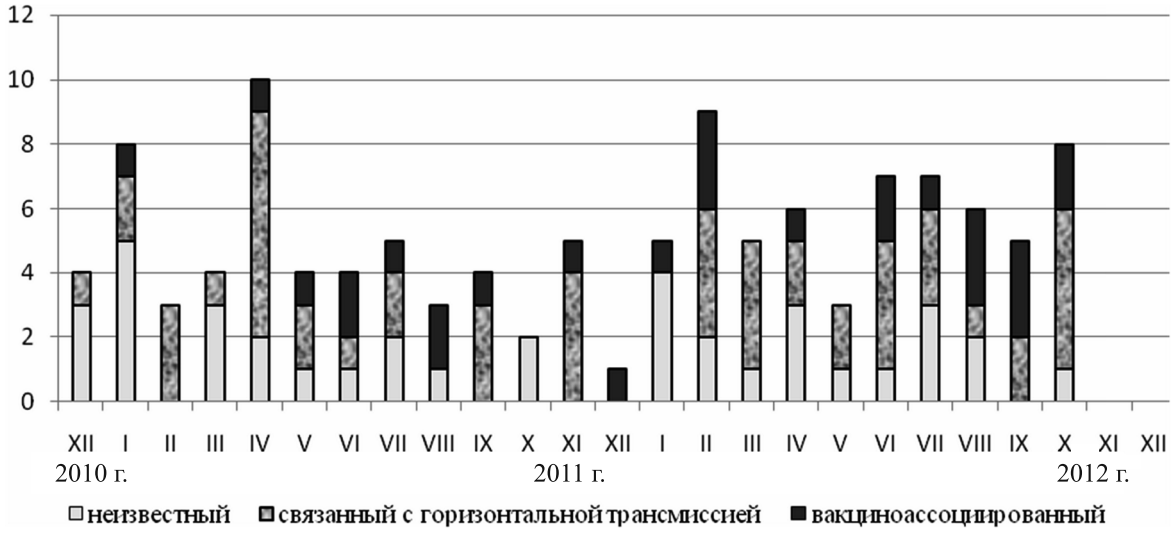


Рисунок 2 — Случаи эпидемического паротита, выявленные в Республике Беларусь в период с 16 декабря 2010 г. по 31 декабря 2012 г.

Анализ вакцинального статуса заболевших лиц показал, что 26 из 53 пациентов были вакцинированы одной дозой моновалентной паротитной вакцины 17–29 лет назад, не вакцинированы 2 человека и 25 пациентов не имели информации о проведенной вакцинации (среди них 5 человек родились до внедрения вакцинации в 1980 г., 19 человек могли получить максимум одну дозу вакцины).

По гендерной принадлежности большинство заболевших лиц (39 из 53 человек, 73,6%) были женщины, 37 из которых находились в отпуске по уходу за ребенком.

По эпидемиологическим данным источником инфекции для 53 заболевших взрослых лиц явились 52 ребенка, вакцинированных первой дозой вакцины КПК девяти различных серий. У одного ребенка развился вакциноассоциированный паротит, остальные дети в поствакцинальный период были здоровы. Ни одного случая эпидемического паротита в результате контакта с вакцинированными детьми в возрасте 6 лет, получившими вторую дозу вакцины, выявлено не было.

В течение периода наблюдения в каждом семейном очаге было зарегистрировано по одному случаю заболевания, за исключением трех семей: в первой из них паротит развился у ребенка на 17-й день после вакцинации вакциной КПК и у его матери на 35-й день после вакцинации ребенка; в другой семье паротит был выявлен у двух взрослых (отец и тетя) после контакта с ребенком, вакцинированным вакциной КПК; в третьей семье случаи эпидемического паротита зарегистрированы у обоих родителей после вакцинации дочерей-близнецов.

У 30 из 53 пациентов отмечался односторонний паротит, у 23 — двусторонний паротит. В 37 случаях заболевание протекало с лихорадкой (37,1–38,5°С), в 16 случаях повышения температуры тела не наблюдалось. В 5 случаях эпидемический паротит осложнился панкреатитом, в одном случае — менингитом. В целом 27 из 53 пациентов (50,9%) были госпитализированы в течение 6–7 дней.

Частота случаев эпидемического паротита, возникших в результате горизонтальной трансмиссии вакцинного штамма, составила 1 случай на 3500 введенных первых доз вакцины.

Секвенирование и последующий анализ SH-гена 11 вирусов паротита (8 выделенных в культуре клеток и 3 амплифицированных непосредственно из образцов НГС) показал их полную идентичность вакцинному штамму Ленинград-Загреб, входящему в состав вакцины КПК, которой были вакцинированы дети.

Случаи эпидемического паротита, связь с вакцинацией для которых не была установлена, зарегистрированы у лиц в возрасте 1–37 лет, половина из которых — дети. Большинство пациентов (20 из 38, 52,6%) были лица мужского пола; 17 из 38 (44,7%) случаев выявлены у детей, посещающих школу (10 случаев) или детские сады (7 случаев). Остальные случаи были выявлены среди студентов (3 случая), детей дошкольного возраста, не посещающих детский сад (2 случая), беременных (1 случай), женщин, находящихся в декретном отпуске (5 случаев), медицинского персонала (1 случай), лиц других профессий (8 случаев) и безработных (1 случай).

Только 9 пациентов (23,7%) получили две дозы вакцины против эпидемического паротита, 16 (42,1%) — одну дозу, 4 (10,5%) не были вакцинированы и для 9 пациентов (23,7%) вакцинальный статус не известен.

Клиническая картина эпидемического паротита у этих пациентов не отличалась от таковой у пациентов двух описанных выше групп (вакциноассоциированные случаи и случаи, возникшие в результате горизонтальной трансмиссии вакцинного штамма вируса паротита). В клинической картине 8 пациентов отмечены только симптомы паротита, у 30 наблюдалась также лихорадка: в 19 случаях температура тела регистрировалась в пределах 37,1–37,9°С, в 7 случаях — 38,0–38,9°С, в 4 случаях — 39,0°С. У 29 заболевших выявлен односторонний паротит, у 9 — двусторонний. Орхит, как осложнение эпидемического паротита, диагностирован в 1 случае, 17 из 38 пациентов (44,7%) были госпитализированы.

Все 38 случаях эпидемического паротита этой группы были лабораторно подтверждены только определением специфических IgM антител.

Основываясь на данных исследования, нельзя исключить, что случаи эпидемического паротита, причина возникновения которых не установлена, также не являются результатом горизонтальной трансмиссии вакцинного вируса паротита. Эпидемиологические расследования подтверждают, что ни один из 38 пациентов не уезжал из Беларуси в течение инкубационного периода и не находился в контакте с пациентом с эпидемическим паротитом, находясь в стране. Среди этих пациентов было 5 женщин, находящихся в отпуске по уходу за ребенком (дети не получали КПК вакцину), и 17 детей, посещающих школы и дошкольные учреждения. Эти лица могли иметь контакт с детьми, которые недавно впервые вакцинировались КПК вакциной. Таким образом, основываясь на данных исследования, нельзя исключить, что случаи эпидемического паротита, причина возникновения которых не установлена, также являются результатом горизонтальной трансмиссии вакцинного вируса паротита.

Учитывая низкий спорадический уровень заболеваемости эпидемическим паротитом, принимая во внимание результаты молекулярно-эпидемиологического мониторинга, указывающие на то, что горизонтальная передача вакцинного вируса может стать почти единственной причиной возникновения эпидемического паротита, а также понимая, что появление даже одного такого случая может вызвать стратегический удар по вакцинации, Министерством здравоохранения Республики Беларусь было принято решение о прекращении использования вакцины, содержащей штамм Leningrad-Zagreb, с октября 2012 г.

Анализ случаев эпидемического паротита, выявленных в 2013 г. В 2013 г. после перехода на вакцину, не содержащую штамм Leningrad-Zagreb, было выявлено и лабораторно обследовано 197 случаев, подозрительных на эпидемический паротит. Пациентами являлись лица в возрасте от 1 до 71 года из всех регионов страны.

По результатам лабораторных исследований подтверждено 5 (2,5%) случаев, из них 4 случая — на основании обнаружения специфических IgM антител и 1 случай — специфических IgM антител и РНК вируса.

Среди лабораторно подтвержденных случаев 4 человека вакцинированы против эпидемического паротита (2 — двукратно, 2 — однократно), у 1 отсутствовали сведения об иммунизации.

Два лабораторно подтвержденных случая классифицированы как завозные: из России (на основании эпидемиологических данных) и из Чехии (на основании эпидемиологических данных и результатов генотипирования вируса). Первым заболевшим (апрель 2013 г.) оказался мужчина 26 лет, проживающий в г. Минске, который заболел после посещения России, где провел большую часть инкубационного периода заболевания. Лабораторное подтверждение диагноза было основано на выявлении специфических IgM антител в сыворотке крови и диагностически значимом нарастании концентрации IgG антител в парных сыворотках, взятых на 5 и 9-й день после начала заболевания (1363 мМЕ/мл и 6754 мМЕ/мл соответственно). Выявить РНК вируса в носоглоточном мазке или моче с помощью ПЦР не удалось. Второй заболевший — ребенок 12 лет из г. Могилева, который во время инкубационного периода находился в Чехии. Диагноз подтвержден на основании выявления IgM антител в сыворотке крови и обнаружения РНК вируса паротита в носоглоточном смыве с помощью ПЦР. Генотипирование выявленного вируса показало, что он относится к генотипу G. В последние годы этот генотип вируса является наиболее распространенным во многих странах Европы.

Ни одного вакциноассоциированного случая, либо случая, связанного с горизонтальной трансмиссией вакцинного вируса, в 2013 г. выявлено не было.

Сравнение результатов 2011 и 2012 гг., основанных на результатах лабораторной диагностики и данных эпидемиологического надзора, показывает, что они практически не различались между собой: эпидемический паротит выявлялся в течение всех месяцев года, в каждом регионе республики, структуру заболеваемости составляли вакциноассоциированные случаи, случаи, связанные с горизонтальной трансмиссией вакцинного штамма, а также случаи, причина возникновения которых не установлена. В то же время сравнение результатов 2012 и 2013 гг. свидетельствует о существенных изменениях в эпидемическом процессе эпидемического паротита: отмечается снижение заболеваемости на 92,2% (с 0,64 до 0,05 на 100 тыс. населения), в структуре заболеваемости отсутствуют вакциноассоциированные случаи и случаи, обусловленные горизонтальной трансмиссией вакцинного штамма вируса паротита.

Заключение. Как свидетельствуют результаты молекулярно-эпидемиологического мониторинга эпидемического паротита, заболеваемость эпидемическим паротитом в 2011 и 2012 гг. практически не различалась. Большую долю (67,8%) зарегистрированных случаев составляли случаи, связанные с вакцинацией (вакциноассоциированные случаи, случаи, связанные с горизонтальной трансмиссией вакцинного вируса). В 2013 г. после перехода на вакцину, не содержащую вакцинный штамм Leningrad-Zagreb, в Республике Беларусь было выявлено только 5 случаев, из них для двоих был доказан завозной характер. Полученные данные молекулярно-эпидемиологического мониторинга подтверждают правильно выбранную тактику в отношении перехода на вакцину, не содержащую штамма Leningrad-Zagreb.

Литература

1. Outbreak news: Mumps virus vaccines / World Health Organization (WHO) // Week. Epidemiol. Rec. — 2007. — Vol. 82. — P. 49–60.

2. Prevention of mumps in preschool institutions using a live mumps vaccine made from strain / M.G. Garaseferian [et al.] // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. — 1988. — № 4. — С. 39–42.

3. Evaluation in young children of the Urabe Am 9 strain of live attenuated mumps vaccine in comparison with the Jeryl Linn strain / T. Vesikari [et al.] // Acta Pediatr. Scandinavica. — 1983. — Vol. 72. — P. 37–40.

4. Mumps outbreaks in Canada and the United States: time for new thinking on mumps vaccines / H. Peltola [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2007. — Vol. 45, № 4. — P. 459–466.

5. Comparative efficacy of Rubini, Jeryl-Lynn and Urabe mumps vaccine in an Asian population / G. Ong [et al.] // J. Infect. — 2005. — Vol. 51, № 4. — P. 294–298.

6. Risk of hospitalization because of aseptic meningitis after measles-mumps-rubella vaccination in one- to two-year-old children: an analysis of the Vaccine Safety Datalink (VSD) Project / S. Black [et al.] // Pediatr. Infect. Dis. J. — 1997. — Vol. 16. — P. 500–503.

7. Measles-mumps vaccination in the FRG: an empirical analysis after 14 years of use. Tolerability and analysis of spontaneously reported side-effects / R. Fesharek [et al.] // Vaccine. — 1990. — Vol. 8. — P. 446–456.

8. Amexis, G. Correlation of genetic variability with safety of mumps vaccine Urabe AM9 strain. / G. Amexis, N. Fineschi, K. Chumakov // Virology. — 2001. — Vol. 287, № 1. — P. 234–241.

9. Aseptic meningitis caused by measles–mumps–rubella vaccine in Japan / K. Ueda [et al.] // Lancet. — 1995. — Vol. 346. — P. 701–702.

10. Arruda, W.O. Aseptic meningitis in a large MMR vaccine campaign (590,609 people) in Curitiba, Paraná, Brazil, 1998 / W.O. Arruda, C. Kondageski // Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. — 2001. — Vol. 43, № 5. — P. 301–302.

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

12. Horizontal transmission of the Leningrad-3 live attenuated mumps vaccine virus / A.V. Atrasheuskaya [et al.] // Vaccine. — 2005. — Vol. 24, № 10. — P. 1530–1536.

13. Horizontal transmission of the Leningrad-Zagreb mumps vaccine strain: a report of three cases / G.Tešović [et al.] // Vaccine. — 2008. — Vol. 26. — P. 1922–1925.

14. Transmission of the L-Zagreb mumps vaccine virus, Croatia, 2005-2008 [Electronic resource] / B. Kaic [et al.] // Eurosurveillance. — 2008. — Vol. 13, № 4–6. — P. 150–152. — Mode of access: http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EQ/V13N02/V13N02.pdf. — Date of access: 17.04.2008.

THE MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL MONITORING OF MUMPS IN BELARUS

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

In the Republic of Belarus molecular-epidemiological monitoring of mumps is carried out since the end of December, 2010 and based on laboratory investigation of each suspected case with subsequent investigation of the isolated viruses. From December 10, 2010 till December 31, 2012 in total 118 mumps cases were laboratory confirmed with 27 of them classified as vaccine-associated, 53 as caused by horizontal transmission of L-Zagreb vaccine strain and for 38 cases the origin of the virus was not identified. Vaccine-associated mumps was developed with a rate of 1 case per about 10000 first doses of vaccine and 1 per about 32000 second doses of vaccine. The mumps caused by horizontal transmission of L-Zagreb vaccine strain was detected in Belarus with a rate of 1 per 3500 introduced first doses of vaccine. Based on the results obtained, at the end of 2012 the Ministry of Health decided to switch to MMR vaccine that does not contain the L-Zagreb vaccine strain. In 2013 only 5 laboratory confirmed cases of mumps were registered, 2 of them were imported. Significant decrease of mumps incidence confirms adequacy of the decisions in changing of vaccine.

Keywords: mumps, vaccination, horizontal transmission.

Поступила 06.08.2014

ЛИХОРАДКА ЗАПАДНОГО НИЛА НА ЮГЕ УКРАИНЫ

Юрченко О.А.[1], Дубина Д.А.[1], Виноград Н.А.[2]
[1]Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И.И. Мечникова Министерства здравоохранения Украины, Одесса;
[2]Львовский национальный медицинский университет им. Д. Галицкого, Львов, Украина

Реферат. В работе представлены результаты комплексного эпизоотологического и эпидемиологического мониторинга лихорадки Западного Нила на юге Украины. С помощью серологических и молекулярно-биологических методов установлен видовой состав комаров и птиц, обеспечивающих циркуляцию вируса Западного Нила в природных очагах. Лабораторно подтверждены случаи лихорадки Западного Нила среди населения региона. Полученные результаты свидетельствуют об активном функционировании природных очагов, в т. ч. антропургических, лихорадки Западного Нила на юге Украины и необходимости осуществления эпизоотологического мониторинга и лабораторной диагностики этой инфекции у людей.

Ключевые слова: вирус Западного Нила, носители, переносчики, лихорадка Западного Нила.

Введение. Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) — трансмиссивное инфекционное заболевание, вызываемое одноименным вирусом, относящимся к антигенному комплексу японского энцефалита рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* [1]. В настоящее время вирус Западного Нила (ВЗН) широко распространен в Европе, многих странах Африки, Азии, Океании (подтип Кунджин), Америке [2, 3].

Впервые случаи заболевания людей ЛЗН были выявлены в Африке в 1937 г. [4], и длительное время ЛЗН не была приоритетной проблемой медицины. В 1996 г. медико-социальное значение ЛНЗ существенно изменилось, когда крупные вспышки ЛЗН начали регистрироваться в Румынии и Российской Федерации, произошла интродукция вируса на Американский континент [2, 5, 6], а ЛЗН стала рассматриваться как серьезная угроза общественному здравоохранению.

Основными резервуарами ВЗН в природе являются птицы, а основными переносчиками — широко распространенные в северном полушарии орнитофильные комары *Culex pipiens Linneus 1758* [1, 2]. ВЗН попадает в организм компетентного орнитофильного комара-переносчика во время питания кровью на инфицированной птице. После короткого периода, необходимого для репликации вируса, инфицированный комар при укусе передает ВЗН основным хозяевам и резервуарам вируса — мигрирующим или автохтонным птицам, или случайным тупиковым хозяевам — лошадям и людям [7].

В умеренном поясе выделяют два типа эпидемического цикла ВЗН: сельский (или дикий) и городской (или синантропный) [3]. Первый цикл вовлекает мигрирующие и местные виды птиц (например, белые аисты и голуби) и один или более вид орнитофильных комаров. Обычно дикий цикл поддерживается в заболоченных местностях, дельтах и поймах рек — местах гнездования мигриру-

ющих птиц и выплода комаров — потенциальных переносчиков ВЗН. В городской, синантропный, цикл вовлечены домашние птицы, такие как курица, домовой воробей, сизый голубь, и комары *C. pipiens molestus*, способные питаться как на людях, так и на птицах. Такой цикл наблюдается в городских условиях, когда деятельность человека делает доступными множество мест размножения для популяций комаров, как это произошло в Бухаресте (Румыни) и в США [2, 4].

Из данных литературы известно, что около 80% случаев инфицирования людей ВЗН проходит асимптоматично, а у остальных 20% инфекция протекает в виде самокупирующегося гриппоподобного заболевания. Примерно у одного из 150 заболевших развиваются неврологические осложнения, такие как менингит, энцефалит, острый вялый паралич, парапарез [3, 8].

Циркуляция ВЗН в Украине была отмечена еще в 1970-х гг., однако до сих пор недостаточно изученной осталась структура природных очагов ЛЗН и роль возбудителя в инфекционной патологии человека.

Цель работы — определение видов основных переносчиков и резервуаров ВЗН в природных очагах и оценка этиологического значения ВЗН в возникновении заболеваний среди населения юга Украины.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили суспензии комаров и мозга птиц, отловленных в г. Одессе и Одесской области в 2000–2007 гг. Кровососущие комары, отловленные в природных стациях, а также в подвалах и подъездах жилых многоквартирных домов, были представлены 18 видами, относящимися к шести родам. Птицы двух экологических групп — наземно-кормящиеся и водно-болотные, экологические относились к 48 видам. Среди наземно-кормящихся (33 вида) четыре вида являлись синантропными.

Наличие вируса в биологическом материале определяли двумя методами: в иммуноферментном анализе (ИФА) исследовали 23251 экземпляр (281 пул) комаров и 259 птиц (230 пулов), в полимеразной цепной реакции (ПЦР) — 7488 экземпляров (153 пула) комаров и 90 птиц. Полевой материал объединялся в пулы по принципу однотипности видового состава векторов и птиц.

Выявление антигенов ВЗН проводили с помощью ИФА-тест-систем производства Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, а детекцию РНК — с использованием тест-систем «ВектоНил-РНК-ампли-100» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, РФ) и «ГенНил» производства РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, РФ).

При госпитальном синдромальном надзоре тестировали сыворотки крови 2 групп пациентов с подозрением на ЛЗН — амбулаторных (320 образцов) и госпитализированных (409 образцов), обратившихся за медицинской помощью в период с 1999 по 2007 гг. Все образцы тестировали на наличие антигемагглютининов и антител класса IgG к ВЗН, 115 образцов от амбулаторных и 62 образца от госпитализированных пациентов исследовали на наличие антител класса IgM к ВЗН. В сыворотках, в которых были выявлены антитела класса IgG к ВЗН, определяли авидность вирусоспецифических антител (92 образца от амбулаторных и 58 — от госпитализированных). Для серологических исследований использовали антиген ВЗН и ИФА-тест-системы для выявления антител классов IgM и IgG к ВЗН производства Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва, РФ), а также ИФА-тест-системы «ВектоНил-IgG» и «ВектоНил-IgG-авидность» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, РФ).

Анализ, учет и интерпретацию результатов проводили в соответствии с наставлениями производителей.

Вирусофорность кровососущих комаров и минимальный уровень инфицированности птиц определяли как отношение количества позитивных проб к количеству исследованных особей и выражали в процентах (%).

Для оценки результатов серологических исследований определяли процент лиц, в сыворотках крови которых были обнаружены вирусоспецифические антитела.

Статистическую обработку проводили с использованием стандартных методов. В процессе анализа полученных результатов проводили оценку их вероятности, а при сравнении показателей — вероятность разницы между ними. С этой целью рассчитывали ошибку выборочной доли (Sp%), 95% доверительный интервал, t-критерий Стьюдента [9].

Результаты и их обсуждение. При исследовании методом ИФА антиген ВЗН был выявлен в 10 (3,56±1,11%) пробах комаров, при этом вирусофорность составила 0,04±0,01%. Исследование ко-

маров с использованием ПЦР позволило обнаружить РНК ВЗН в 12 (7,84±2,17%) пробах, что соответствовало в этом случае уровню вирусофорности 0,16±0,05%. Анализ видового состава комаров, в которых был выявлен ВЗН, показал, что наибольшее значение в поддержании циркуляции вируса имеет орнитофильный вид *Culex pipiens* (рисунок). Вместе с тем в циркуляции вируса участвуют комары *Aedes caspius dorsalis*, *Ae. duplex Mart*, *Anopheles bifurcatus* и *Culiseta annulata*.

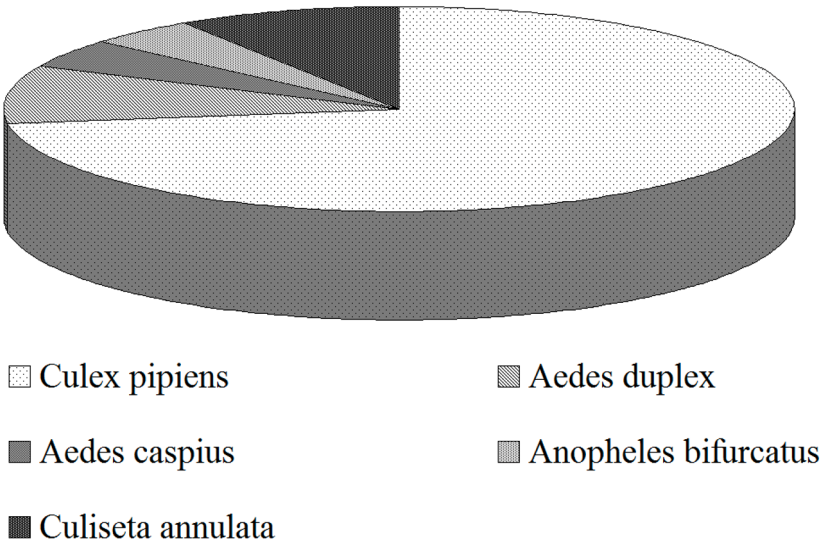


Рисунок — Структура видового состава комаров-переносчиков вируса Западного Нила на юге Украины

При этом следует отметить, что РНК ВЗН была обнаружена как у комаров, отловленных в природе (открытые биотопы), так и в многоквартирных домах (закрытые биотопы). При этом вирусофорность комаров из природных биотопов была значительно выше (t = 3,720; p<0,001) (таблица).

Таблица — Результаты исследований в ПЛР на наличие РНК вируса Западного Нила комаров из закрытых и открытых биотопов г. Одессы и Одесской области

Биотопы	Вид и количество исследованного материала		Из них положительных проб (пулов)	
	комары	пробы (пулы)	абс.	вирусофорность, %±m
Закрытые	6483	108	6	0,09±0,04
Открытые	1005	45	6	0,60±0,24
Всего	7488	153	12	0,16±0,05

При исследовании суспензий мозга птиц в ИФА антиген ВЗН был выявлен в одной из 230 проб. При этом минимальный уровень инфицированности птиц ВЗН составил 0,39±0,39%. Применение ПЦР позволило обнаружить РНК ВЗН у 15 видов (16,67±3,93%) птиц.

При этом ВЗН обнаружен у восьми видов водно-болотных птиц — перевозчик (*Actitis hypoleucos*), кулик чернозобик (*Calirdris alpine*), галстучник (*Charadrius hiaticula*), чайка хохотунья (*Larus cachinnans*), чайка озерная (*Larus ridibundus*), гаршнеп (*Lymnocryptes minimus*), кулик турухтан (*Philomachus pugnax*), фифи (*Tringa glareola*) — и трех видов наземно-кормящихся: ворона серая (*Corvus cornix*), голубь сизый (*Columba livia*) и зарянка (*Erithacus rubecula*). В целом ВЗН был выявлен у 22,92±6,07% птиц водно-болотной экологической группы и у 1,66±0,74% наземно-кормящихся. Полученные данные свидетельствуют о ведущей роли птиц водно-болотного комплекса в поддержании циркуляции вируса на юге Украины (t = 6,539; p<0,001).

Обследование показало, что у амбулаторных пациентов антигемагглютинины к ВЗН выявлялись в 22,5±2,33%, антитела класса IgG — 28,75±2,53%, а антитела класса IgM — в 0,87±0,87% случаев. Аналогичные показатели у госпитализированных лиц составили 14,67±1,75; 18,58±1,92 и 3,23±2,24% соответственно.

При анализе результатов серологических исследований было лабораторно подтверждено 33 случая ЛЗН, что составило 4,53±0,77% обследованных. У 20 пациентов выявлены низкоавидные (индекс авидности <50%) IgG-антитела, у 10 наблюдалась сероконверсия или 4-кратный прирост титра антител, у 3 обнаружены антигемагглютинины и антитела класса IgM при отсутствии антител класса IgG.

Выявление антигемагглютининов к ВЗН наблюдалось с 5-го дня, а IgG-антител — с 7-го дня заболевания. Присутствие антител класса IgM к ВЗН отмечено на 9 и 22-й день от начала заболевания.

Динамика увеличения авидности антител класса IgG к ВЗН у разных пациентов варьировала. Отмечены случаи как раннего появления высокоавидных IgG-антител (индекс авидности 66%) на 14-й день заболевания, так и присутствия низкоавидных IgG-антител (индекс авидности 4%) на 41-й день болезни.

Из 11 пациентов, у которых инфекция протекала в форме острого лихорадочного заболевания (ОРВИ), только в 2 случаях тяжесть заболевания требовала госпитализации, остальные лечились амбулаторно. У большинства лиц с ЛЗН с поражением ЦНС клинически диагностировали серозный менингит (19 случаев), у двоих — гнойный менингоэнцефалит и у одного пациента — гнойный менингит.

Возраст заболевших колебался от 3 мес. до 75 лет и в среднем составил 41,42±3,45 года, т. е. в основном заболевание развилось у людей в возрасте от 34,59 до 48,25 года (95% доверительный интервал). Разницы между частотой заболевания среди женщин и мужчин не выявлено. Случаи заболевания не были связаны между собой, за исключением 2 случаев ЛЗН в одной семье в пгт. Белозерка Херсонской области в сентябре 2003 г. Большинство (26) случаев ЛЗН было выявлено в городах Одесса и Херсон, остальные — в сельских районах этих областей. Заболеваемость ЛЗН характеризовалась выраженной сезонностью: случаи заболевания начинали регистрироваться в июле, достигая максимума в сентябре, и прекращались в ноябре.

Полученные нами данные согласуются с современными знаниями о функционировании природных и антропургических очагов ВЗН в Европе. Сочетание этих двух типов очагов наблюдается на окраинах Одессы, где расположены пруды и заболоченные участки, на которых гнездятся мигрирующих птицы водно-болотного комплекса, и происходит основной выплод комаров. Комары *C. pipiens* залетают в находящиеся поблизости многоквартирные дома, где успешно размножаются в затопленных водой подвалах. Дополнительными компонентами данного антропургического очага ЛЗН являются синантропные птицы — сизые голуби и серые вороны.

Проведенными на юге Украины исследованиями установлено, что только у 4,5% пациентов с подозрением на ЛЗН были выявлены маркеры острой инфекции, притом, что антитела к ВЗН обнаружены у 15–29% лиц. Из этого следует, что примерно 10–25% обследованных, у которых клинические признаки заболевания позволяли предполагать ЛЗН, перенесли эту инфекцию ранее.

Заключение. На основании исследования потенциальных векторов и резервуаров ВЗН с использованием ИФА и ПЦР показана высокая активность на юге Украины природных очагов ЛЗН, а также функционирование антропургических очагов этого особо опасного заболевания. Циркуляция ВЗН в регионе осуществляется преимущественно среди птиц водно-болотной экологической группы орнитофильными комарами *Culex pipiens*. Кроме того, в циркуляцию ВЗН вовлечены 4 симпатрических вида комаров и такие распространенные синантропные виды птиц, как серая ворона и сизый голубь.

Обследование позволило лабораторно подтвердить 33 случая заболевания, из которых две трети случаев протекали с поражением ЦНС.

Полученные результаты являются основной для оптимизации лабораторной диагностики трансмиссивных вирусных инфекций как составляющей лабораторного мониторинга вирусных особо опасных природно-очаговых зооантропонозных болезней на юге Украины.

Литература

1. Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean Basin / P. Calistri [et al.] // Open Virol. J. — 2010. — Vol. 4. — P. 29–37.

2. Hubalek, Z. West Nile fever — a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe / Z. Hubalek , J. Halouzka // Emerg. Infect. Dis. — 1999. — Vol. 5, № 5. — P. 643–650.

3. West Nile virus: characteristics of an african virus adapting to the third millennium world / M. Monini [et al.] // Open Virol. J. — 2010. — Vol. 4. — P. 42–51.
4. West Nile virus / G.L. Campbell [et al.] // Lancet Infect. Dis. — 2002. — Vol. 2, № 9. — P. 519–529.
5. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern US / R.S. Lanciotti [et al.] // Sci. — 1999. — Vol. 286. — P. 2333–2337.
6. West Nile virus infection in commercial waterfowl operation, Wisconsin / J.K. Meece [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2006. — Vol. 12, № 9. — P. 1451–1453.
7. Rappole, J.H. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere / J.H. Rappole, S.R. Derrickson, Z. Hubálek // Emerg. Infect. Dis. — 2000. — Vol. 6. — P. 319–328.
8. Clinical characteristics and functional outcomes of West Nile Fever / J.T. Watson [et al.] // Ann. Intern. Med. — 2004. — Vol. 141. — P. 360–365.
9. Лакин, Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие / Г.Ф. Лакин. — 4-е изд. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.

WEST NILE FEVER IN SOUTH UKRAINE

Yurchenko O.A.[1], Dubina D.A.[1], Vynograd N.A.[2]
[1]Mechnikov Ukranian Anti-Plague Research Institute of the Ministry of Health of Ukraine, Odessa;
[2]Danylo Halytskiy Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

The paper represents the results of epizootic and epidemiological monitoring of West Nile fever in the South Ukraine. Using serological and molecular biological methods species composition of mosquitoes and birds, providing WNV circulation in natural foci was defined. Human cases of West Nile fever in the region were laboratory confirmed. The findings suggest the active functioning of natural foci of West Nile fever in the South Ukraine and the necessity of epizootic monitoring and laboratory diagnosis of this infection in humans.

Keywords: West Nile virus, vectors, reservoirs, West Nile fever.

Поступила 13.06.2014

RECENT DEVELOPMENTS IN ME/CFS RESEARCH IN THE UK

Pheby D.
Buckinghamshire New University, Uxbridge, UK

Abstract. Recent developments in ME/CFS research capability in the UK are described. These include a Biobank linked to the ME/CFS Disease Register which was part of the National ME/CFS Observatory project, and a proposed post mortem tissue archive. The Medical Research Council is also taking an interest in ME/CFS, having established an Expert Group on ME/CFS and having funded five research projects on the basis of its recommendations, and having also established a national Collaborative to coordinate research into this still little-understood disease.

Introduction. Despite much active research into ME/CFS, the development of a substantial corpus of scientific knowledge has until recently been impeded by the lack of an overall coherent research strategy, and by the absence of an infrastructure to support research. However, in recent years there have been rapid advances in ME/CFS research, not only in the acquisition of new scientific knowledge, but also in the development of infrastructure facilities to support research. In the UK, a number of developments have taken place as our contribution to this worldwide endeavour.

Some of the current developments have built on the success of the National ME Observatory project, presented here in 2010. A number of scientific papers have been published reporting the results of Observatory investigations into the epidemiology of ME/CFS [1–3], and also qualitative social research [4–6]. A further piece of work related to the qualitative social research carried out by the Observatory investigated why patient surveys and randomised controlled trials produced conflicting results as regards the outcomes of management programmes, in particular graded exercise and cognitive behaviour therapy [7].

Several on-going projects have emerged from the Observatory project. These include the UK ME/CFS Biobank, which is closely linked to the ME/CFS Disease Register which was developed as part of the Observatory project. There are also moves to develop a post mortem tissue archive for the study of ME/

CFS. In addition, further initiatives have been undertaken by the Medical Research Council. All these developments are detailed in subsequent sections of this paper.

The UK ME/CFS Biobank

The aim of the UK ME/CFS Biobank was to develop a key resource for biomedical research, especially the investigation of biomarkers for diagnosis and prognosis. Within this overall aim, there were some specific objectives. These were initially to establish a biobank for the study of ME/CFS, as a resource for high quality and ethically approved biomedical research studies benefiting from well catalogued blood samples, which are linkable to clinical and risk factors data, and to establish a research programme to investigate risk factors for severity, and to correlate clinical phenotype with disease severity.

It was planned subsequently to disseminate the resource to the research community, to develop high throughput studies, benefiting from sample collections and rapid advancing sequencing (e.g. whole genome sequencing,) and other molecular techniques, such as those investigating immune and genetic biomarkers, and to link the Biobank to the planned 'post-mortem' tissue bank for the study of ME/CFS. Other research possibilities envisages included linkage of data from stored biological samples with longitudinal clinical data from the Disease Register, which will enable, for example, identification of clinical and pathological factors associated with particular outcomes of interest, including disease severity, and thereby coul;d contribute to the development of prevention strategies.

These initial aims having been achieved, the Biobank, which is based at the Royal Free Hospital in London (part of University College London), but managed from the London School of Hygiene and Tropical Medicine, is now able to expand very substantially its activities, having been awarded a research grant of $1.5 million by the National Institutes of Health, Washington DC. The NIH project aims to:

1. Investigate risk factors for disease severity.
2. Correlate clinical phenotype with disease severity.
3. Disseminate the resource to researchers and others.
4. Plan high throughput studies, which will benefit from sample collections, rapidly advancing molecular techniques (e.g. investigating immune and genetic biomarkers), expansion of the Disease Register, and a link to the proposed post-mortem tissue bank for the study of ME/CFS.

More information about the ME/CFS Biobank project is available from the London School of Hygiene and Tropical Medicine's website [8].

The Post Mortem Tissue Archive

The rationale for setting up a post mortem tissue archive for ME/CFS is to create an opportunity to study neurological and other tissues from people with the disease, in order to investigate underlying disease processes. ME/CFS has rarely been studied in post-mortem examinations, despite evidence of abnormalities from neuroimaging. Post mortem tissue archives have been established and function effectively in other neurodegenerative diseases, and one for ME/CFS exists in the USA.

A feasibility study was undertaken in 2009, with the aim of ascertaining the feasibility of developing a national post-mortem ME/CFS tissue bank in the UK. The research took the form of a case study, involving key informant interviews, focus group of people with ME/CFS, and a workshop involving experts. The results suggested that a post-mortem tissue bank was desirable, feasible, and acceptable to possible tissue donors [9].

Since then, a detailed protocol for the operation of a post mortem tissue archive has been developed. This has recently been published [10]. The Medical Research Council has shown an interest in supporting this project, and discussions are beginning with this purpose in mind.

The National ME/CFS Disease Register

The ME/CFS Disease Register was developed initially as part of the Observatory project [1], and will maintain a close link with both the Biobank project and the post mortem tissue archive. This will enable biochemical and other characteristics of samples collected upon recruitment to the Biobank and subsequently to be correlated with longitudinal clinical histories compiled through the follow-up of ME/CFS patients recruited to the Disease Register. A similar link with the post mortem tissue archive could aid recruitment to the latter, as the Disease Register could seek advance declarations of willingness to donate tissue post mortem from disease register participants.

Medical Research Council Initiatives

The Medical Research Council (MRC) has moved a long way from its previous position of supporting very little in the way of ME/CFS research. It had supported the PACE project, a multi-centre ran-

domised controlled trial comparing treatment regimes involving cognitive behaviour therapy, graded exercise, pacing, and what the trial organisers termed standard medical care [11]. However, problems over the interpretation of the data led to widespread scepticism concerning the findings [12].

Since then, the MRC, following the report of an Expert Group, has awarded more than £1.6m for research into ME/CFS, with the intention of investigating the mechanisms and underlying biological processes involved in the illness, which could eventually lead to better diagnosis and the development of more effective treatments.

Five projects were funded. These are listed in table:

Table — MRC Funded Projects, 2012

Project Title	Institution	Principal Investigator	Project Ails
Identifying the biological fingerprints of fatigue	Newcastle University	Dr Wan Ng	To improve understanding of the mechanisms of fatigue by: •analysing the immune systems of > 500 patients with primary Sjögren syndrome; • identifying immune system abnormalities in these patients; in order to help identify the "biological fingerprints" of fatigue, hopefully leading to: • new treatments; • a clinical diagnostic test for CFS/ME
Understanding the pathogenesis of autonomic dysfunction in chronic fatigue syndrome and its relationship with cognitive impairment	Newcastle University	Professor Julia Newton	To explore the causes of autonomic nervous system dysfunction (→ dizziness and light-headedness in 90% of PWME), • using fMRI to measure changes in brain blood flow to the brain; • relating this to cognition and nervous system dysfunction, in order to lay the foundations for: o new diagnostic tools; o better understanding of nervous system abnormalitie; o development of targeted treatments
Modulation of aberrant mitochondrial function and cytokine production in skeletal muscle of patients with CFS by supplementary polyphenols	Universities of Liverpool & Leeds	Professor Anne McArdle	To use a newly-developed technique to study muscle mitochondria, in order to learn more about how CFS/ME develops and becomes chronic
Can enhancing slow wave sleep SWS improve daytime function in patients with CFS?	Imperial College London	Professor David Nutt	To study sleep disturbance in CFS/ME. To measure the effect of drug-induced deep restorative sleep in CFS/ME patients on brain function while awake. To increase understanding of the impact of sleep disturbance CFS/ME sufferers, in order to develop new treatments
Persistent fatigue induced by interferon-alpha: a new immunological model for chronic fatigue syndrome	King's College London	Dr Carmine Pariante,	To study patients undergoing IFN-alpha treatment for Hepatitis C [NB IFN-alpha induces fatigue] To identify resultant biological changes, hopefully leading to: • a check-list of blood measures to predict who will develop CFS/ME; • identification of new targets for therapy

Overall, a number of common themes underlie the projects being funded under this programme. These are:

• analogies with other illnesses;

• the need to start from the symptoms of the disease;

• giving priority to exploration of underlying disease mechanisms

• the development of new diagnostic tests &/or treatments, based on improved understanding of pathology.

The other major initiative being coordinated by the MRC is the development of a **UK ME/CFS Collaborative**. This brings together patient organisations, academic research groups in universities, and funding organisations, within a common framework, in order to achieve better coordination of research activities on a nationwide basis.

The UK ME/CFS Collaborative was formed to continue the work done by the MRC Expert Group on research into ME/CFS between 2008 and 2011. Its overriding purpose is to promote the highest quality basic and applied research that is evidence based and peer reviewed. The collaborative identified the following initial tasks:

• in consultation with constituent groups and others, update the national strategy for ME/CFS research that was first developed by the MRC expert group;

• promote the need for world class research into ME/CFS;

• facilitate translational research in ME/CFS medicine;

• facilitate investment in the essential research infrastructure;

• continue working to raise the profile of ME/CFS research in the UK;

• raise awareness of the need for a good career structure for ME/CFS researchers;

• promote conditions in which more research can take place in NHS settings;

• work to increase the funding for ME/CFS research in the UK;

• raise awareness of the amount that has been achieved by the ME/CFS research community;

• liaise with UK agencies and funders to share information, respond to consultations where an united response would be helpful, and to work jointly towards the shared aim of improved patient care.

Other Initiatives

As well as developing our own programmes in the UK, we are very conscious that we are part of a much wider international endeavour, and that many of the difficult research questions posed by ME/CFS cannot be answered within any one country acting alone. For example, we are aware that it will take a long time for a UK-based post mortem tissue archive to accumulate a critical mass of specimens sufficient for it to make a useful contribution to research. It may well be, therefore, that the effectiveness of such a development would be enhanced by its being expanded to operate at a pan-European level. We attach great importance to the development of our international links, and to working with colleagues in other countries. We would like to see an expansion of the role of EUROMENE, and we are very pleased, for example, to be involved in the REGPOT project orchestrated by our |Latvian colleagues.

Conclusions. From rather inauspicious beginnings, ME/CFS research in the UK is now becoming much better organised and better funded, and the objective of developing a significant infrastructure to support research is well on the way to achievement.

References

1. A Disease Register for ME/CFS : Report of a Pilot Study / D. Pheby [et al.] // BMC Res. Notes. — 2011. — Vol. 4. — P. 139–146.

2. The functional status and well being of people with myalgic encephalomyelitis/ chronic fatigue syndrome and their carers / L.C. Nacul [et al.] // BMC Pub. Health. — 2011. — Vol. 11. — P. 402–412.

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. — 2011. — Vol. 9. — P. 91.

4. The self-expressed needs of people with Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis: A systematic review / M. Drachler [et al.] // BMC Pub. Health. — 2009. — Vol. 9. — P. 458–472.

5. Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis (CFS/ME) in adults: a qualitative study of perspectives from professional practice / S.M.C. Horton [et al.] // BMC Family Pract. — 2010. — Vol. 11. — P. 89.

6. Social Support Needs For Equity In Health And Social Care: A thematic analysis of experiences of people with chronic fatigue syndrome/ myalgic encephalomyelitis / J.C.D.C. Leite [et al.] // Int. J. Equity in Health. — 2011. — Vol. 10. — P. 4.

7. Use of an online survey to explore positive and negative outcomes of rehabilitation for people with CFS/ME / P.W. Gladwell [et al.] // Disability and Rehabilitation (2013). Posted online on June 4, 2013. (doi:10.3109/09638288.2013.797508).

8. CURE-ME / Creating clinical and biomedical Understanding through Research Evidence – For the ethical study of ME/CFS // London School of Hygiene & Tropical Medicine [Electronic resource]. — Mode of access: http://www.lshtm.ac.uk/itd/crd/research/cure-me/index.html. — Date of access: 22.07.2014.

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.

10. Considerations in establishing a post-mortem brain and tissue bank for the study of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: a proposed protocol / N. Nacul [et al.] // BMC Res. Notes. — 2014. — Vol. 7. — P. 370-378. DOI: 10.1186/1756-0500-7-370.

11. Recovery from chronic fatigue Recovery from chronic fatigue syndrome after treatments given in the PACE trial / P.D. White [et al.] // Psycholog. Med. — 2013. — P. 1–9. —— Available on CJO doi:10.1017/S0033291713000020.

12. Pheby, D. Getting PACE into Perspective / D. Pheby // InterAction. — 2011. — Vol. 76. — P. 5.

РАЗВИТИЕ ИЗУЧЕНИЯ МИАЛГИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛИТА/СИНДРОМА ХРОНИЧЕСКОЙ УСТАЛОСТИ В ВЕЛИКОБРИТАНИИ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Феби Д.

Бакингемширский новый университет, Аксбридж, Великобритания

Реферат. Описаны последние разработки в изучении миалгического энцефалита/синдрома хронической усталости (ME/CFS) в Великобритании. Они включают Биобанк, связанный с Регистром Заболевания, который является частью национального проекта мониторинга ME/CFS и предполагает наличие постмортального архива тканей. Медицинский исследовательский совет также проявляет интерес, учредив экспертную группу по ME/CFS, профинансировав пять научно-исследовательских проектов на основе его рекомендаций, а также учредив национальный Коллаборатив в целях координации исследований этой еще малоизученной болезни.

Ключевые слова: синдром хронической усталости, организационные мероприятия.

Поступила 30.07.2014

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОТРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ПОЛИОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Амвросьева Т.В., Богуш З.Ф., Поклонская Н.В., Дедюля К.Л., Барановская Н.Н., Землянский В.А.
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Статья посвящена отработке технологии генодиагностики полиомавирусной инфекции на основе разработки дизайна нуклеотидных последовательностей праймеров и зондов для индикации и дифференциации полиомавирусов методом ПЦР в режиме реального времени с последующей их апробацией на клиническом материале реципиентов почки и гемопоэтических стволовых клеток.

Ключевые слова: полиомавирусная инфекция, ВК-вирус, JC-вирус, полимеразная цепная реакция, дифференциальная диагностика.

Введение. Полиомавирусная инфекция (ПВИ) человека в настоящее время относится к малоизвестным и недостаточно изученным в нашей стране вирусным заболеваниям. Ее этиология связана с 10 описанными в научной литературе возбудителями рода *Polyomavirus*, среди них ВК, JC, KI, WU, MC-вирусы, полиомавирусы 6, 7, 9, TS и MW полиомавирусы. Из данного перечня наиболее полно изучены ВК и JC-вирусы.

Полиомавирусы (ПВ) являются ДНК-содержащими вирусными агентами, способными к интеграции в генетический материал клетки с пожизненной персистенцией в них [1]. По зарубежным данным, антитела к ПВ присутствуют у 30–80% взрослого населения, что свидетельствует об их широкой распространенности в человеческой популяции [2].

Первичное инфицирование ПВ происходит в молодом возрасте, обычно оно протекает бессимптомно и переходит в латентную форму инфекции. Известными мишенями персистенции вирусов служат клетки почек, лимфоциты и глиальные клетки центральной нервной системы. Как правило, активация ПВ наблюдается у пациентов с иммунодефицитом, которая может привести к развитию тяжелых, угрожающих жизни, заболеваний. К таким иммунодефицитным пациентам относятся реципиенты органов и клеток, длительно получающие иммуносупрессивные средства, а также онкологические пациенты, ВИЧ-инфицированные и др. Развившаяся полиомавирусная инфекция (ПВИ) может стать причиной нефропатии, геморрагического цистита, асимптоматической гематурии, уретрального стеноза и интерстициального нефрита. Как известно, у реципиентов органов данные патологии создают серьезный риск потери трансплантата [3–5]. Отдельные представители ПВ являются этиологическими агентами менингитов, менингоэнцефалитов, прогрессивной мультифокальной энцефалопатии, гематологических заболеваний, болезней кожи и даже злокачественных новообразований (карцинома клеток Меркеля) [6, 7]. С учетом накопленных данных об этиологической роли ПВ в соматической патологии особую актуальность при обследовании пациентов вышеуказанных категорий имеет дифференциальная лабораторная диагностика, направленная на установление этиологии заболевания, что имеет исключительно важное значение для своевременного назначения этиотропного лечения и/или коррекции применяемых схем иммуносупрессивной терапии (уменьшение доз, изменение спектра препаратов и т. д.).

В связи с тем, что ПВИ является относительно малоизученной инфекцией (первые возбудители были открыты в 70-е гг. и их перечень постоянно пополняется), ее дифференциальная генодиагностика разработана далеко неполно. Что касается нашей страны, то ПЦР-исследования в отношении данной инфекции до недавних пор не проводились вовсе. Диагностика ВК вирусной инфекции, имеющей особое значение для реципиентов почки в плане риска отторжения трансплантата, осуществлялась эпизодически цитологическим методом — по обнаружению морфологически измененных «decoy» клеток в осадке мочи пациентов. Данный метод является морально устаревшим, имеет крайне низкую прогностическую ценность и в развитых странах практически не используется. Визуальная оценка морфологии клеток характеризуется низкой специфичностью и высокой субъективностью. Кроме того, результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что выяв-

ление «decoy» клеток в осадке мочи у пациентов слабо коррелирует с вероятностью развития у них ПВ-ассоциированной нефропатии и не позволяет проводить адекватную коррекцию терапии для ее предотвращения. Аналогичная ситуации складывается и в отношении JC ПВИ, генодиагностика которой в практических лабораториях страны не проводится до сих пор, несмотря на ее известную по зарубежным данным роль в вирусной патологии, особенно у иммунодефицитных пациентов.

Цель работы — экспериментальная отработка технологии генодиагностики ПВИ на основе разработки дизайна нуклеотидных последовательностей праймеров и зондов для индикации и дифференциации ПВ методом ПЦР в режиме реального времени с последующей их апробацией при исследовании клинического материала.

Материалы и методы. Исследовано 2 образца крови и 41 образец мочи от 41 пациента с клиническими признаками ПВИ (ВК-ассоциированная нефропатия, геморрагический цистит), которые были получены из РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я городская клиническая больница» (37 пациентов), отделения пересадки костного мозга УЗ «9-я городская клиническая больница» (1 пациент), РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии (3 пациента).

Образцы мочи перед выделением нуклеиновых кислот разводили транспортной средой для проб клинического материала в соотношении 1:1 («Амплисенс», РФ).

Образцы цельной крови инкубировали 1 ч при температуре 37°С, затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин, после чего отбирали сыворотку.

Для выделения вирусных нуклеиновых кислот из образцов сывороток крови и мочи применяли коммерческие наборы «РИБО-преп» («Амплисенс», РФ).

Детекцию ВК- и JC-вирусов осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени. Использовали Taq-полимеразу, 10x реакционный буфер и раствор $MgCl_2$ («PrimeTech», Беларусь), смесь дезоксинуклеотидов («Fermentas», Литва). Амплификацию проводили с применением разработанных нами (PMVuni+, PMVuni-, PMVp, таблица 2) и взятых из литературных источников (PM2+, PM2-, BKVp, JCVp) праймеров и зондов [8], синтезированных фирмой Sintol (РФ).

Постановку ПЦР в реальном времени осуществляли на амплификаторах RotorGene 3000 и 6000 (Corbett Life Sciences, Австралия) и CFX 96 Real-Time System (Bio-Rad, США).

Результаты и их обсуждение. ПВ являются ДНК-содержащими вирусами, геном которых представлен кольцевой двухцепочечной ДНК длиной порядка 5000 пар оснований, вирионы небольшие, диаметр 40–50 нм, икосаэдрической формы, не покрыты липидной оболочкой. Белки вирусов разделяются на ранние — регуляторные (большой Т-антиген, малый Т-антиген) и поздние — структурные (VP1, VP2, VP3, агнопротеин).

Для подбора универсального комплекта праймеров, позволяющего обнаруживать ДНК различных ПВ, а также специфичных комплектов праймеров для идентификации наиболее клинически значимых ПВ (ВК- и JC-вирусов) был проведен компьютерный анализ мультигеномного выравнивания, содержащего 25 нуклеотидных последовательностей. В результате были выбраны два комплекта праймеров и зондов (регион большого Т-антигена, таблица 1). Первый комплект праймеров и гибридизационного зонда (PMVuni+, PMVuni-, PMVp) является универсальным для выявления представителей всего рода *Polyomavirus*. Второй включает универсальные праймеры (PM2+, PM2-) и два специфических зонда (BKVp, JCVp для ВК и JC-вирусов соответственно) и позволит использовать его для проведения дифференциальной лабораторной диагностики ПВИ.

Апробацию комплектов праймеров, подобранных для универсальной генодиагностики ПВИ, а также идентификации ВК и JC-вирусов, проводили на 2 выборках проб клинического материала (таблица 2), забранного от пациентов с клиническими признаками ПВИ (ВК-ассоциированная нефропатия, геморрагический цистит и др.). В первую группу вошли пробы (n = 18, 16 образцов мочи и 2 крови), забранные от 16 пациентов с лабораторно подтвержденной ВК вирусной инфекцией при использовании ПЦР в реальном времени с одновременным введением в реакционную смесь двух пар праймеров и двух меченых зондов [9] (в них была обнаружена ДНК ВК-вируса). Вторая группа состояла из образцов клинического материала (n = 25, 25 образцов мочи), забранных от 25 пациентов с подозрением на ПВИ, но отрицательных на наличие ДНК ВК-вируса.

Таблица 1 — Схема праймеров и зондов для лабораторной диагностики ПВИ и типирования BK и JC-вирусов

Наименование олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность	Ориентация, метка	Регион генома	Примечание
PM2+	GCWGAMACTCTATGYCTRTGTGG	Прямой	Большой Т-антиген	Универсальный
PM2-	GGTAGAAGACCCYAARGACTTTCC	Обратный	-//-	Универсальный
BKVp	CCAGCACACATGTGTCTACT	Зонд, FAM	-//-	Специфический для BK-вируса
JCVp	GCTTGACTGAGGAATGCATGCAG	Зонд, ROX	-//-	Специфический для JC-вируса
PMVuni+	TGAAGACAGTGTAGACGGGAAA	Прямой	-//-	Универсальный
PMVuni-	GCAGCAGCAGCCTCAGA	Обратный	-//-	Универсальный
PMVp	CTWGCACTTTTGGGGGACCTAGTTGC	Зонд, ROX	-//-	Универсальный

Исходя из собственного опыта, имеющихся литературных данных и расчетной температуры отжига выбранных праймеров и зондов, отработаны следующие параметры и условия постановка реакции. Температурный профиль реакции состоял из 45 циклов денатурации при 95°C в течение 15 с и объединенной стадии отжига-элонгации при 55°C в течение 40 с. В состав реакционной смеси входили 10x буфер для Taq-полимеразы, содержащий 6 mM $MgCl_2$, смесь дезоксинуклеотидов 200 мкмоль, 2,5 ед. Taq-полимеразы, по 10 pmol прямого и обратного праймеров, по 5 pmol соответствующих гибридизационных зондов.

Таблица 2 — Апробация подобранных комплектов праймеров и зондов для диагностики ПВИ и идентификации BK и JC-вирусов на образцах клинического материала пациентов

Группа клинического материала	Кол-во образцов	Результаты ПЦР с использованием универсальных праймеров (PMVuni+, PMVuni-, PMVp)	Результаты ПЦР с использованием праймеров для типирования (PM2+, PM2-, BKVp, JCVp	
		ДНК ПВ	ДНК BK-вируса	ДНК JC-вируса
BK-вирус «+»	18	18	18	3
BK-вирус «–»	25	12	0	9

При исследовании первой выборки положительных на BK-вирус проб клинического материала с использованием универсальных праймеров и зонда (PMVuni+, PMVuni-, PMVp) для выявления ДНК ПВ все образцы клинического материала регистрировались как положительные (таблица 2). Использование комплекта праймеров и зондов для дифференциальной генодиагностики BK и JC-вирусов (PM2+, PM2-, BKVp, JCVp) позволило помимо 100% идентификации BK-вируса в 3 из 18 исследованных проб (16,7%) выявить ДНК JC-вируса (рисунок 1).

При исследовании второй выборки проб клинического материала (отрицательных на наличие ДНК BK-вируса) и использовании комплекта праймеров и зонда для универсальной генодиагностики ПВИ полиомавирусная ДНК была детектирована в 12 из 25 образцов мочи (48,0%). На данном этапе исследований учитывались все образцы со значением Ct ≤40 (таблица 2, рисунок 2).

В процессе типирования BK и JC-вирусов (дифференциации обнаруженных ПВ) в 9 из 12 позитивных образцов (75,0%) была выявлена ДНК JC-вируса. Три образца (25,0%) оказались отрицательными как в отношении BK, так и JC-вируса, что может указывать на присутствие в них нуклеиновой кислоты других представителей рода *Polyomavirus* (рисунки 2, 3).

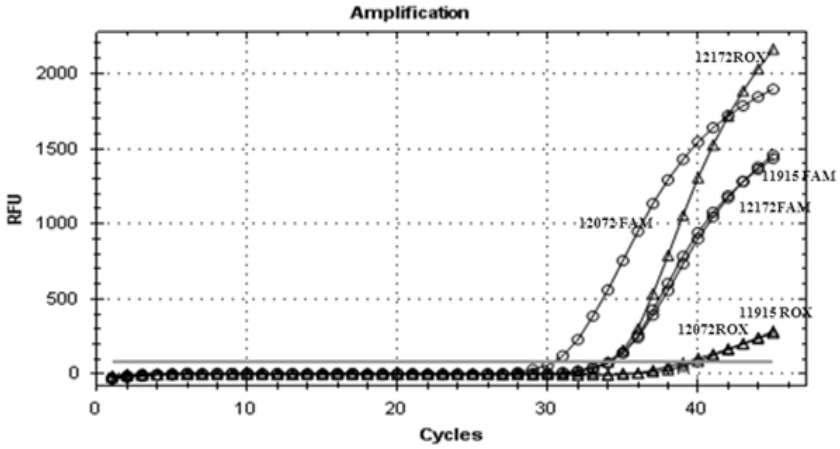


Рисунок 1 — Результаты исследования проб мочи (№№ 12172, 12072, 11915) с помощью ПЦР в реальном времени с использованием праймеров для типирования ВК и JC-вирусов (JC-вирус — ROX, BK-вирус — FAM)

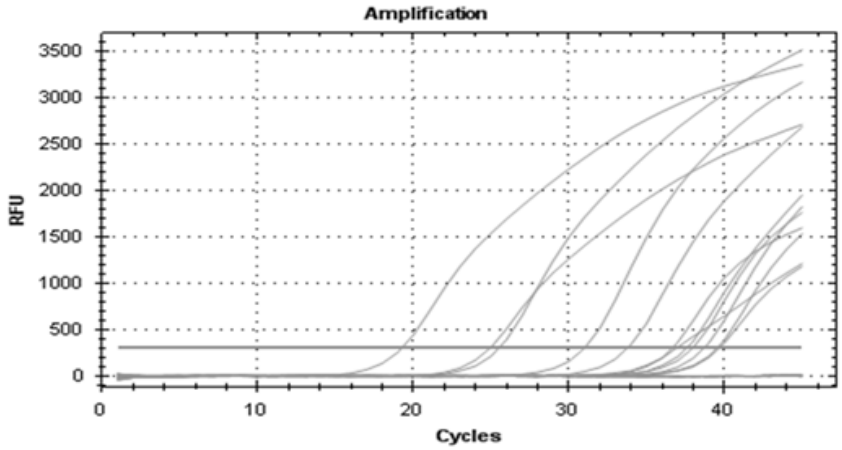


Рисунок 2 — Результаты исследования отрицательных на ВК-вирус проб мочи с использованием универсальных праймеров

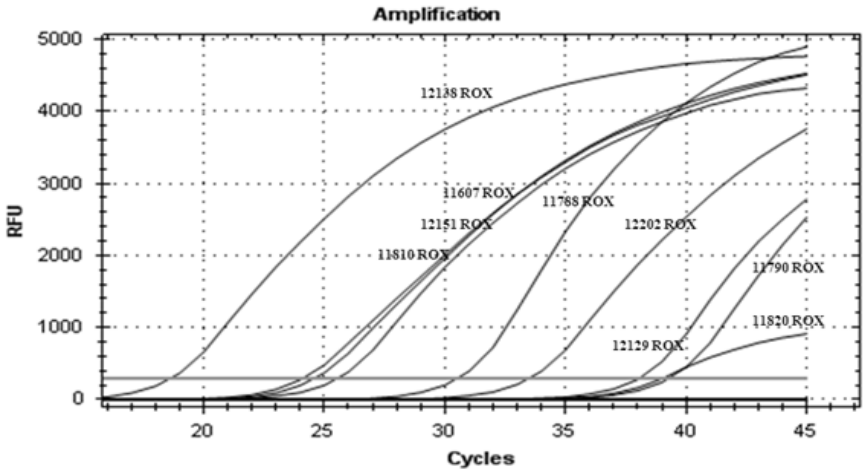


Рисунок 3 — Результаты дифференциального типирования 12 проб мочи, позитивных при использовании универсальных праймеров (JC-вирус — ROX, BK-вирус — FAM)

В целом при использовании разработанного универсального комплекта праймеров и зонда (PMVuni+, PMVuni-, PMVp) общий уровень выявления генетических маркеров ПВИ в клиническом материале (n = 43) пациентов с лабораторно подтвержденной ВК вирусной инфекцией и с подозрением на ПВИ составил 69,8% (n = 30). При исследовании этих же образцов клинического материала только на ВК-вирус [9] уровень детекции позитивных проб составил 41,9% (18 положительных образцов из 43 исследованных). Таким образом, результативность исследований клинического материала возросла примерно в 1,7 раза.

При использовании разработанного комплекта праймеров и зондов для дифференциальной генодиагностики ПВИ (PM2+, PM2-, BKVp, JCVp) ДНК ВК-вируса определялась в 34,9% (15/43), ДНК JC-вируса — в 20,9% (9/43), в 7,0% случаев детектировалась смесь ДНК JC-вируса + ДНК ВК-вируса (3/43) и в таком же проценте (7,0%) — ДНК других ПВ (рисунок 4).

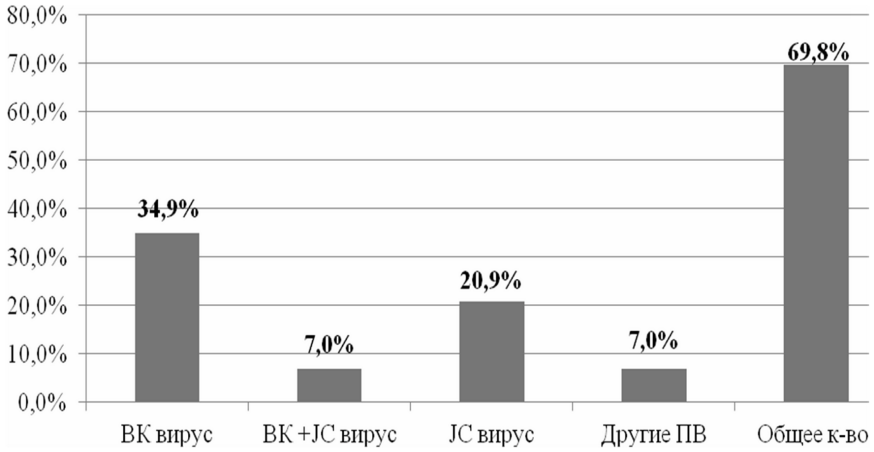


Рисунок 4 — Результаты детекции ПВ в клиническом материале пациентов с лабораторно подтвержденной ВК вирусной инфекцией и с подозрением на ПВИ

Заключение. Результаты исследований подтверждают возможность использования предлагаемой технологии ПЦР в режиме реального времени и подобранных комплектов праймеров с соответствующими зондами для осуществления ПЦР-исследований клинического материала от пациентов с подозрением на ПВИ с целью выявления генетических маркеров полиомавирусных возбудителей и последующего типирования двух наиболее клинически значимых их представителей — ВК и JC-вирусов.

Литература

1. Weber, T. Progressive multifocal leukoencephalopathy: molecular biology, pathogenesis and clinical impact / T. Weber, E.O. Major // Intervirology. — 1997. — Vol. 40, № 2–3. — P. 98–111.

2. Thorner, A.R. Progressive multifocal leukoencephalopathy / A.R. Thorner, J.T. Katz // Curr. Infect. Dis. Rep. — 2001. — Vol. 4, № 3. — P. 352–359.

3. Hirsch, H.H. Polyomavirus BK / H.H. Hirsch, J. Steiger // Lancet Infect. Dis. — 2003. — Vol. 3, № 10. — P. 611–623.

4. Association of BK virus with failure of prophylaxis against hemorrhagic cystitis following bone marrow transplantation / A. Bedi [et al.] // J. Clin. Oncol. — 1995. — Vol. 13. — P. 1103–1109.

5. Association between a high BK virus load in urine samples of patients with graft-versus-host disease and development of hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation / G. Bogdanovic [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42. — P. 5394–5396.

6. Chesters, P.M. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues / P.M. Chesters, J. Heritage, D.J. McCance // J. Infect. Dis. — 1983. — Vol. 147. — P. 676–684.

7. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40 / W.A. Knowles [et al.] // J. Med. Virol. — 2003. — Vol. 71. — P. 115–123.

8. Development and validation with clinical samples of internally controlled multiplex real-time PCR for diagnosis of BKV and JCV infection in associated pathologies / A. Bárcena-Panero [et al.] // Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 35, № 2. — P. 173–179.

9. Marked variability of BK virus measurement using quantitative real-time PCR among commonly used assays / N.G. Hoffman [et al.] // J. Clin. Microbiology. — 2008. — Vol. 46, № 8. — P. 2671–2680.

EXPERIMENTAL TECHNOLOGY DEVELOPMENT OF POLYOMAVIRUS INFECTION DIFFERENTIAL GENE DIAGNOSIS

Amvrosieva T.V., Bohush Z.F., Paklonskaya N.V., Dziadziulia K.L., Baranouskaya N.N., Zemlianski V.A.
Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

Paper presents the results of the development of the polyomavirus infection diagnosis technology on the basis of the design of nucleotide sequences primers and probes for the detection and differentiation of polyomaviruses by PCR in real time with their subsequent approbation on clinical material of recipient's kidney and hematopoietic stem cells.

Keywords: polyomavirus infection, BK virus, JC virus, polymerase chain reaction, differential diagnosis.

Поступила 24.06.2014

ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ НЕКОТОРЫХ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ В ГРУППАХ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ И ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ

Анищенко Е.В., Красавцев Е.Л.
Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Реферат. В работе приведены данные о частоте встречаемости маркеров некоторых оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных детей, инфицированных вертикальным путем, находящихся на учете в областном консультативно-диспансерном кабинете ВИЧ/СПИД Гомельской областной инфекционной клинической больницы, и в группе здоровых детей.

Определялись маркеры наиболее часто встречаемых оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных детей.

У ВИЧ-инфицированных детей достоверно чаще при сравнении с группой здоровых детей встречалась ДНК вируса Эпштейна–Барр (43%, у здоровых детей — 26%, p = 0,008). В группе здоровых детей достоверно чаще выявлялись IgG к цитомегаловирусу (50%, у ВИЧ-инфицированных детей — 12%, p = 0,02).

ДНК вируса простого герпеса 1 и 2 типа в группах обследуемых детей не выявлялась. Также у детей не были выявлены IgM к антигенам токсоплазмы, цитомегаловируса, вируса простого герпеса 1 и 2 типов.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, дети, оппортунистические инфекции.

Введение. Наиболее частыми и тяжелыми клиническими проявлениями ВИЧ-инфекции являются оппортунистические инфекции. Их клиническая манифестация связана с прогрессирующей иммуносупрессией, о чем свидетельствует снижение в крови числа основных клеток-мишеней вируса — Т хелперов (CD4+-лимфоцитов). Следует отметить, что у взрослых больных прослеживается четкая зависимость между уровнем CD4+-лимфоцитов и спектром оппортунистических инфекций [1]. У детей, инфицированных ВИЧ вертикальным путем, не всегда имеет место соответствие между уровнем иммуносупрессии и спектром оппортунистических инфекций [2].

Оппортунистическими инфекциями у ВИЧ-инфицированных детей являются чаще инфекции, вызванные вирусами простого герпеса, цитомегаловирусом, вирусом Эпштейн–Барра, грибами рода *Candida*. Токсоплазмоз является редким поражением ЦНС у ВИЧ-инфицированных детей [3].

Поверхностный кандидоз — самая частая грибковая инфекция у ВИЧ-инфицированных детей. Возбудителем является, как правило, *Candida albicans*; иногда другие грибки рода *Candida*. Чаще всего встречается кандидозный стоматит, даже у детей с высоким числом лимфоцитов CD4 [4].

Поскольку основную роль в борьбе с герпесвирусами играет клеточный иммунитет, у ВИЧ-инфицированных с глубоким иммунодефицитом возможны тяжелые, угрожающие жизни, инфекции. Между ВИЧ и герпесвирусами существуют сложные и неоднозначные взаимодействия [5]. У больных с иммунодефицитами, в т. ч. у ВИЧ-инфицированных детей, первичные инфекции, вызываемые герпесвирусами, протекают тяжелее, чем у остального населения. Реактивация герпесвирусов у ВИЧ-инфицированных детей происходит чаще, чем у здоровых, и вызывает более тяжелые последствия [2].

Цитомегаловирусная инфекция — самая частая из вирусных оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных. Частота заражения цитомегаловирусом во внутриутробном периоде и во время родов у ВИЧ-инфицированных новорожденных превышает аналогичные показатели для не инфицированных ВИЧ новорожденных — как подвергшихся риску заражения ВИЧ, так и рожденных здоровыми матерями [2]. Согласно данным некоторых исследований, у ВИЧ-инфицированных детей под действием цитомегаловируса прогрессирование ВИЧ-инфекции ускоряется [6].

Подобно другим представителям семейства *Herpesviridae*, вирус Эпштейна–Барр широко распространен среди населения всего мира. Он стимулирует пролиферацию В-лимфоцитов; у лиц с иммунодефицитом он вызывает лимфопролиферативный синдром. На фоне ВИЧ-инфекции этот вирус тоже служит причиной лимфопролиферативных заболеваний, из которых у детей чаще всего встречаются лимфоидная интерстициальная пневмония и лимфомы [2].

Токсоплазмоз является редким поражением ЦНС у ВИЧ-инфицированных детей. Токсоплазменный энцефалит развивается только примерно у 1% ВИЧ-инфицированных детей. Однако токсоплазменный энцефалит нужно исключать у всех ВИЧ-инфицированных детей с вновь появившимися неврологическими нарушениями. У детей с латентной инфекцией, вызванной *Toxoplasma gondii*, титры IgG бывают разными, а IgM обнаруживаются редко. Хотя сероконверсия и 4-кратное повышение титра антител IgG возможны, нередко диагностика активной инфекции затруднена из-за иммуносупрессии. IgM обычно исчезают через несколько месяцев после заражения, однако иногда остаются повышенными в течение года и более, что также затрудняет дифференциальную диагностику острой и перенесенной инфекции [7].

Цель работы — выявление частоты встречаемости маркеров некоторых оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных детей, инфицированных вертикальным путем, находящихся на учете в областном консультативно-диспансерном кабинете ВИЧ/СПИД Гомельской областной инфекционной клинической больницы, и сравнение их с частотой встречаемости в группе не ВИЧ-инфицированных детей.

Материалы и методы. Были изучены данные 117 медицинских карт ВИЧ-инфицированных детей, взятых и состоящих на учете в областном консультативно-диспансерном кабинета ВИЧ/СПИД Гомельской областной инфекционной клинической больницы. Достигли возраста 15 лет и наблюдаются как взрослые 17 детей.

Дети были обследованы согласно протоколам «Оптимизация подходов к наблюдению и лечению детей с ВИЧ/СПИДОМ (инструкция по применению)» [8] и регламентирующим документам Министерства здравоохранения.

Для оценки стадий ВИЧ-инфекции использовалась клиническая классификация ВИЧ-инфекции у детей до 15 лет (ВОЗ, 2006) [9]. В настоящее время 10 детей (10%) находятся в 1-й клинической стадии, 34 ребенка (34%) — во 2-й клинической стадии, в 3-й стадии — 48 детей (48%) и 8 детей (8%) — в 4-й стадии заболевания. Дети, достигшие возраста 15 лет (17 человек), наблюдаются согласно протоколам взрослых.

После установления диагноза ВИЧ-инфекции всем детям согласно протоколам обследования определялись ДНК возбудителей группы оппортунистических инфекций (цитомегаловирус, вирус простого герпеса, вирус Эпштейн–Барра, токсоплазмоз). Наборами реагентов «АмплиСенс CMV-FL, EBV-FL, TOX-Fl, HSV 1, 2 –FL» выявляли ДНК цитомегаловируса (CMV), ДНК вируса Эпштейна–Барр (EBV), ДНК токсоплазмоза (TOX), ДНК вируса простого герпеса 1 и 2 типов (HSV 1, 2) путем амплификации специфического фрагмента ДНК данных вирусов методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Также пациенты обследовались на наличие специфических IgG и IgM к цитомегаловирусу (CMV), токсоплазмозу (TOX), вирусу простого герпеса 1 и 2 типов (HSV 1, 2) (набор реагентов ХОПиБОХ). В мазке из слизистой полости рта методом микологического посева на питательные среды (Сабуро, агар Никерсона) скопически определялись грибы рода *Candida* (в диагностически значимых титрах).

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

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

Для сравнения выбрана группа здоровых детей, возраст которых не имел статистических отличий от группы ВИЧ-инфицированных детей.

Результаты исследований проанализированы с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, USA) с использованием данных непараметрической статистики. Качественные показатели представлялись в виде абсолютного числа наблюдений и доли (%) от общего числа пациентов в соответствующей группе. Дальнейший анализ проводился с использованием непараметрических методов статистической обработки: для сравнения частот в квадратах 2×2 использовался точный критерий Фишера, $\chi 2$. Статистически значимыми считались различия при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Результаты выявления маркеров некоторых оппортунистических инфекций в сравниваемых группах детей представлены в таблице.

Таблица — Частота выявления маркеров оппортунистических инфекций в группах ВИЧ-инфицированных и здоровых детей

Маркеры оппортунистических инфекций	ВИЧ-инфицированные дети	Здоровые дети	Уровень P
ДНК TOX, n = 88	1 (1%)	0	0,9
IgG к TOX, n = 57	5 (10%)	3 (33%)	0,06
ДНК CMV, n = 191	7 (6%)	1 (1%)	0,08
IgG к CMV, n = 41	4 (12%)	4 (50%)	0,02
IgG к HVS1/2, n = 42	8 (24%)	4 (50%)	0,1
ДНК EBV, n = 220	48 (43%)	29 (26%)	0,008
Грибы рода *Candida*, n = 221	38 (38%)	42 (35%)	0,6

У 80 ВИЧ-инфицированных детей определялась ДНК TOX методом ПЦР. Она была выявлена только у одного (1%) ребенка на первом году жизни. Ему была установлена 4-я клиническая стадия ВИЧ-инфекции с тяжелым уровнем иммунодефицита (CD4+ — 10,3%, уровень вирусной нагрузки составил 800000 копий/мл). У ребенка диагностирован врожденный токсоплазмоз с поражением головного мозга и глаз. В группе здоровых обследованных детей ДНК TOX не выявлялась. IgM TOX также ни у одного ребенка из обеих обследованных групп не регистрировались.

IgG TOX определялись у 5 человек (10%) из 48 обследованных ВИЧ-инфицированных детей при установлении ВИЧ-статуса. У одного ребенка (20%) они выявлялись на первом году жизни и у 4 человек (80%) в возрасте старше одного года. В большинстве случаев у детей наблюдался уровень тяжелого иммунодефицита (60%), и они находились во 2-й клинической стадии заболевания (60%). Средний уровень вирусной нагрузки — 328441±192530 тыс. коп./мкл. В группе здоровых детей IgG TOX выявлялись несколько чаще — в 33% случаев ($p = 0,06$).

У 111 ВИЧ-инфицированных детей определялась ДНК CMV методом ПЦР. Она выявлялась у 7 детей (6%). Клинически выраженные формы цитомегаловирусной инфекции отмечались у 3 детей (43%) в виде генерализованной формы (2 ребенка, 29%) и врожденной формы с поражением головного мозга (1 ребенок, 14%). У 3 детей (43%) ДНК CMV выявлялась на первом году жизни. Все дети этой группы находились в состоянии тяжелого иммунодефицита. Средний уровень вирусной нагрузки составил 328441±192530 тыс. коп./мкл. У здоровых детей ДНК CMV выявлялась только у 1 ребенка (1%) из 80 обследованных детей без клинических проявлений заболевания.

IgM к CMV ни у одного ребенка в обеих сравниваемых группах не выявлялись. IgG к CMV при установлении ВИЧ-статуса определялись у 4 человек (12%) из 33 ВИЧ-инфицированных детей в возрасте старше одного года. В большинстве случаев дети находились в 3-й клинической стадии заболевания (70%). Средний уровень вирусной нагрузки — 386839±215475 тыс. коп./мкл. В группе здоровых детей IgG CMV выявлялись достоверно чаще (50%, $p = 0,02$) и только у одного ребенка (25%) в возрасте до одного года.

ДНК HSV1/2 методом ПЦР определялась у 131 ребенка из обеих сравниваемых групп и во всех случаях она не выявлялась. Также ни у одного ребенка не регистрировались IgM к HSV1/2.

Клинически выраженных проявлений герпетической инфекции на момент установления ВИЧ-статуса у ВИЧ-инфицированных детей выявлено не было.

IgG к HSV1/2 при установлении ВИЧ-статуса определялись у 8 ВИЧ-инфицированных детей (24%) из 34 обследованных. У всех детей они выявлялись в возрасте старше одного года. В 38% случаев (по 3 человека) дети находились в состоянии незначительного и умеренного иммунодефицита во 2-й клинической стадии заболевания. Средний уровень вирусной нагрузки — 492854,9±134726,5 тыс. коп./мкл.
В группе здоровых детей IgG HSV1/2 встречались чаще (50%, p = 0,1).

ДНК EBV методом ПЦР определялась у 111 ВИЧ-инфицированных детей и у 48 детей (43%) она выявлялась. Только у 4 детей (8%) она выявлялась на первом году жизни. Клинически выраженных признаков заболевания, вызванных EBV, на момент установления диагноза ВИЧ-инфекции у детей выявлено не было. Большая часть детей этой группы (20 человек, 42%) находилась в 3-й клинической стадии заболевания. Уровень тяжелого иммунодефицита был у 14 детей (29%). Средний уровень вирусной нагрузки составил 395293,5±62921,06 тыс. коп./мкл. У здоровых детей выявляемость ДНК EBV была достоверно меньшей (26%, p = 0,008).

В мазке из слизистой полости рта методом микологического посева определялись грибы рода *Candida* (в диагностически значимых титрах) у 38 ВИЧ-инфицированных детей (38%) из группы 101 ребенка, которым данное исследование проводилось. На первом году жизни из этой группы было 8 человек (21%). В большинстве случаев (35 детей, 92%) у детей с выделением из слизистой полости рта грибов рода *Candida* были выявлены клинические проявления орофарингеального кандидоза. Большая часть детей этой группы (28 человек, 74%) находилась в 3 клинической стадии заболевания. Уровень тяжелого иммунодефицита был у 21 ребенка (55%). Средний уровень вирусной нагрузки составил 592254±102921 тыс. коп./мкл. В группе здоровых детей выявление в мазке из слизистой полости грибов рода *Candida* было приблизительно одинаковым (35%, p = 0,6).

Заключение. У ВИЧ-инфицированных детей достоверно чаще встречаются ДНК EBV (43%, p = 0,008) при сравнении с группой здоровых детей (26%). В группе здоровых детей статистически чаще выявлялись IgG к CMV (50%, у ВИЧ-инфицированных 12%, p = 0,02). ДНК HSV1/2 в группах обследуемых детей не выявлялась. Также у детей не были выявлены IgM к TOX, CMV, HSV1/2.

Полученные результаты необходимо использовать при первичной профилактике оппортунистических инфекций у детей.

Литература

1. Бартлетт, Дж. Клинические аспекты ВИЧ-инфекции. 2009–2010 / Дж. Бартлетт, Дж. Галлант, П. Фам. — М.: Р. Валент, 2010. — 490 с.

2. Textbook of pediatric HIV care / S. Zeichner [et al.]. — Cambrige, 2005. — 784 p.

3. Рахманова, А.Г. ВИЧ-инфекция у детей / А.Г. Рахманова, Е.Е. Воронин, Ю.А.Фомин. — СПб.: Питер, 2003. — 448с.

4. Incidence of opportunistic and other infections in HIV-infected children in the HAART era / P. Gona [et al.] // J. Am. Med. Assoc. — 2006. — Vol. 296, № 3. — P. 292–300.

5. Heng, M.C. Co-infection and synergy of human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus-1 / M.C. Heng, S.Y. Heng, S.G. Allen // Lancet. — 1994. — Vol. 343. — P. 255–258.

6. Rapid progression of HIV disease in children with cytomegalovirus DNAemia / G. Nigro [et al.] // AIDS. — 1996. — Vol. 10. — P. 1127–1133.

7. Montoya, J.G. Toxoplasma gondii / J.G. Montoya, J.S. Remington // Principles and Practice of Infectious Diseases / Ed. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. — Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. — P. 2858–2888.

8. Оптимизация подходов к наблюдению и лечению детей с ВИЧ/СПИДом: инструкция по применению: утв. МЗ Респ. Беларусь 10.09.2008. — Минск, 2008. — 100 с.

9. Report of the technical consultation on clinical staging of HIV/AIDS and HIV/AIDS case definition for surveillance [Electronic resource]. — Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2005. — Mode of access: http://www.euro.who.int/document/E87956.pdf. — Date of access: 19.06.2013.

DETECTION OF OPPORTUNISTIC INFECTIONS MARKERS IN HIV-INFECTED AND HEALTHY CHILDREN

Anischenko E.V., Krasavtsev E.L.

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

The paper presents data on some opportunistic infections markers frequency in HIV-infected children infected by vertical route. Children were registered in the HIV/AIDS outpatients department of Gomel

Regional infectious clinical hospital, their data compared with the group of healthy children. Markers of the most common opportunistic infections in HIV-infected children were identified. In HIV-infected children EBV DNA (43%) were significantly more common compared with a group of healthy children (26%, p = 0.008). In the group of healthy children CMV IgG was significantly more prevalent (50 vs. 12% in HIV-infected, p = 0.02). HSV1/2 DNA in the study groups of children could not be detected. Also in children have not been identified IgM TOX, CMV, HSV1/2.

Keywords: HIV infection, children, opportunistic infections.

Поступила 19.06.2014

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭКТОМЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Антоневич Н.Г.[1], Гончаров А.Е.[1], Квачева З.Б.[2], Чекан В.Л.[3], Сидоренко И.В.[3], Петрова Л.Г.[3]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;

[2]Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск;

[3]Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Реферат. В оптимизированных условиях культивирования эктомезенхимальных стволовых клеток обонятельного эпителия (ЭМСК ОЭ) человека не отмечается повышения риска злокачественной трансформации клеток, связанного с нарушением кариотипа и абберантным метилированием регуляторной области гена-онкосупрессора *RARb*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу генетической стабильности культивируемых ЭМСК ОЭ человека и указывают на безопасность их использования в клеточной терапии.

Ключевые слова: эктомезенхимальные стволовые клетки, обонятельный эпителий, культивирование, клеточная терапия человека.

Введение. Как показали многочисленные доклинические испытания, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) имеют значительный терапевтический потенциал. Разработка протоколов лечения с применением биомедицинских клеточных продуктов на основе культивируемых МСК в будущем может стать альтернативой или дополнением к традиционным методам в терапии повреждений кожных покровов, дегенеративных заболеваний нервной системы, аутоиммунных заболеваний и др. [1–4]. Несмотря на достигнутые успехи в области клеточных технологий, по-прежнему остается открытым вопрос безопасности использования МСК, которые с целью накопления биомассы подвергаются длительному культивированию. Одним из рисков применения МСК в клинике является их способность к спонтанной злокачественной трансформации в условиях культуры и приобретение ими туморо- и онкогенного потенциала [5–7]. Существует две гипотезы относительно того, что является причиной малигнизации МСК. Первая объясняет появление трансформированных клеток в культуре их изначальным присутствием в ткани донора, из которой они получены, и позитивной селекцией таких клеток в процессе культивирования по сравнению с нормальными за счет более высокой пролиферативной активности [8, 9]. Вторая гипотеза указывает на приобретенный характер генетической нестабильности, которую может вызвать ряд внешних факторов: способ выделения МСК, состав применяемых ростовых сред и подложек для адгезии, плотность посева клеток, концентрации кислорода, значении pH и другие параметры. Причем увеличение сроков культивирования и манипуляций, которым подвергаются клетки, повышает вероятность возникновения генетических и эпигенетических дефектов [8]. Одним из наиболее часто наблюдаемых отклонений является изменение нормального числа хромосом (кариотипа) культивируемых клеток: анеуплоидия, полиплоидия. Возникновение хромосомных аномалий является предиктором запуска многостадийного процесса трансформации, одним их этапов которого может быть инактивация генов-онкосупрессоров или амплификация онкогенов. При анализе культур МСК, полученных из различных тканей, довольно часто выявляется анеуплоидия, тем не менее данное явление не всегда сопровождается злокачественным перерождением клеток. С другой стороны, имеются данные, что при

видимости сохранения нормального кариотипа, МСК высоких пассажных уровней, имели многочисленные хромосомные мутации (транслокации и делеции), что также является предпосылкой к малигнизации [10–12]. Несмотря на то, что геномные и хромосомные аномалии, выявляемые у стволовых клеток, не всегда приводят к злокачественной трансформации, прежде чем использовать в клинической практике биомассу МСК, накопленную *in vitro*, необходимо проводить цитогенетический анализ стабильности генома клеток для того чтобы уменьшить риски возникновения посттрансплантационных осложнений у реципиента.

Еще одним важным критерием контроля функциональной стабильности является изучение эпигенетического метилирования ДНК в МСК, характер которого может изменяться под воздействием различных факторов в процессе культивирования. Появление гипо- или гиперметилированных участков (абберантное метилирование) в регуляторных областях некоторых генов (онкосупрессоров, онкогенов) может изменять их экспрессию и являться причиной развития онкологических заболеваний *in vivo* и трансформации *in vitro* [13, 14]. Показано, что перевиваемые культуры, полученные из опухолей человека, сохраняют абберантный тип метилирования и в условиях культивирования. Наиболее часто отмечается гиперметилирование регуляторных областей генов онкосупрессоров (*BRCA1, BRCA2, CDKN2A, RASSF1A, RARb, SEPT9b, IGFBP3, CEBPD, MGMT, DAPK1* и др.), следствием которого является изменение многих процессов в клетках и запуск начальных стадий канцерогенеза [15–18]. В связи с этим оценка эпигенетической стабильности ДНК культивируемых МСК и исключение культур клеток с абберантным метилированием регуляторных областей онкосупрессоров в совокупности с другими критериями может повысить безопасность проведения клеточной терапии.

В настоящее время для решения задач регенеративной медицины применяют широкий спектр тканеспецифичных МСК. Относительно новым и перспективным с терапевтической точки зрения клеточным материалом являются эктомезенмимальные стволовые клетки обонятельного эпителия (ЭМСК ОЭ) человека [19–21]. Ранее нами была оптимизирована технологии накопления биомассы ЭМСК ОЭ, достаточной для клеточной терапии [21]. К настоящему моменту относительно полно описаны особенности роста и морфофункциональные свойства ЭМСК ОЭ [22, 23]. Тем не менее, исследования генетической и эпигенетической стабильности ЭМСК ОЭ ранее не осуществлялись. Проводить такие исследования необходимо для оценки онко- и туморогенного потенциала ЭМСК ОЭ и гарантии их безопасности.

Цель работы — оценка стабильности кариотипа и изучение эпигенетического статуса метилирования регуляторной области гена-онкосупрессора *RARb* (ген рецептора ретиноевой кислоты β), культивируемых ЭМСК ОЭ человека.

Материалы и методы.

1. Получение культур ЭМСК ОЭ, условия культивирования. Первичные культуры и субкультуры ЭМСК ОЭ человека получали по ранее разработанной технологии [21]. Проводили оценку культур клеток ОЭ на соответствия паспортным данным (морфология — фибробластоподобная; жизнеспособность — не менее 95%; фенотип — не менее 90% $CD90^+$, $CD105^+$, нестин$^+$, $CD45^-$, микробиологическая чистота). В экспериментах использовали 8 восстановленных из криоконсервации культур, а также накопленные в присутствии факторов роста (EGF и bFGF) клетки.

2. Определение иммунофенотипа клеток. Фенотипирование клеток методом проточной цитометрии проводили по стандартной методике с использованием антител к молекулам CD90 (FITC), CD105 (PE), CD45 (PE-Cy7), нестину (FITC). Флуоресценцию регистрировали на проточном цитофлуориметре «FACSCalibur» (BD Biosciences, США).

3. Кариотипирование культур ЭМСК ОЭ. Для получения метафазных пластин культуры ЭМСК ОЭ высевали на флаконы площадью 75 см^2 в концентрации 5000 кл./см^2. На 2–3-и сут культивирования, когда наблюдалось максимальное число митозов, за 2 ч до фиксации клеток в культуральную среду вносили раствор колхицина в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Затем клетки отделяли от поверхности флакона раствором 0,125% трипсина в 0,02% ЭДТА. Далее проводили их гипотоническую обработку в 10 мл раствора 0,056 М KCl в течении 20 мин. Клетки отмывали центрифугированием в DPBS и фиксировали в 3 мл смеси метанола и ледяной уксусной кислотой (3:1) на протяжении 10 мин при –20ºС. Центрифугировали, осадок снова ресуспензировали в 3 мл фиксирующей смеси и оставляли на 30 мин при –20ºС. Центрифугировали пробирки с клетками, фиксирован-

ные клетки ресуспензировали в 0,5 мл 96º этанола. Полученную суспензию раскапывали на охлажденные влажные стекла. Хромосомы окрашивали раствором безбензимида с концентрацией 0,01 мкг/мл в течение 15 мин в темноте, промывали стекла дистиллированной водой. Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Nikon TE2000-E (×1000) с применением полосового фильтра 470/20 нм, подсчитывая для каждой культуры 50–100 метафазных пластин. Анализировали распределение клеток по числу хромосом.

4. Оценка статуса метилирования регуляторной области гена RARB. Выделение ДНК из клеточных культур проводили с использованием TriReagent согласно рекомендациям производителя. Осуществляли гидролиз 5 мкг ДНК при помощи 100 ед. акт. TaqI в 100 мкл реакционной смеси в буферном растворе, указанном производителем, при 65°C в течение 2 ч. Затем проводили спиртовую очистку ДНК. Осадок ДНК растворяли в необходимом количестве буфера TE (10 mM Трис-HCl pH 8,0; 1mM ЭДТА) так, чтобы ее концентрация составляла 0,1 мкг/мкл. Каждый из образцов Taq-обработанной ДНК в количестве 0,1 мкг затем расщепляли в 20 мкл реакционной смеси, 10 ед. акт. FatI (положительный контроль рестрикции для гена *RARB*), либо 16 ед. акт. BlsI (сайт узнавания 5'-Pu(5mC)GCNG(5mC)GPy-3'/3'-PyG(5mC)GNCG(5mC)Pu-5'), либо 16 ед. акт. GlaI (сайт узнавания 5'-Pu(5mC)GPy-3'/3'-PyG(5mC)Pu-5) в реакционном буфере, рекомендованном производителем, при температуре 37°C (для HaeIII), 55°C (для FatI) и 30°C (для BlsI и GlaI) в течение 2 ч (все реагенты производства НПО «СибЭнзим»). По окончании инкубации 1 мкл каждой реакционной смеси использовали для последующей амплификации с соответствующими праймерами. Амплификацию проводили с использованием набора для GC-ПЦР и HotStart Taq ДНК-полимеразы (производства НПО «СибЭнзим»). Праймеры для гена *RARB*: прямой-5' CCG GGT AGG GTT CAC CGA AAG TTC ACT CGC 3' и обратный-5' TCA GCA AAG GGA ATC AAT ATG CAT GCC AGC 3'; Профиль амплификации: 95°C — 5 мин, далее 40 циклов 95°C — 30 с, 68°C — 20 с, 72°C — 50 с; завершение реакции 72°C — 1 мин [17, 18]. После окончания амплификации проводили гель-электрофорез с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием в УФ-свете. После обработки ДНК ферментами BlsI и GlaI и последующим проведением ПЦР при наличии на электрофореграмме ампликонов размером 823 п.н. при анализе участка промоторной области и первого экзона гена *RARB*, отсутствии ампликона в положительном контроле рестрикции и наличие ампликона в отрицательном контроле рестрикции, биологический материал считается прошедшим контроль на отсутствие повышенного риска злокачественной трансформации клеток, связанного с эпигенетическим сверхметилированием регуляторной области гена-онкосупрессора *RARB*.

Результаты и их обсуждение. Проведено кариотипирование культивируемых ЭМСК ОЭ человека. В результате оценки культур 8–15 пассажей установлено, что на протяжении длительных сроков культивирования в клетках сохраняется диплоидный кариотип (46). Ни в одном из исследованных образцов (8) при подсчете 50–100 метафазных пластин не обнаружено отклонений от нормального числа хромосом (рисунок 1).

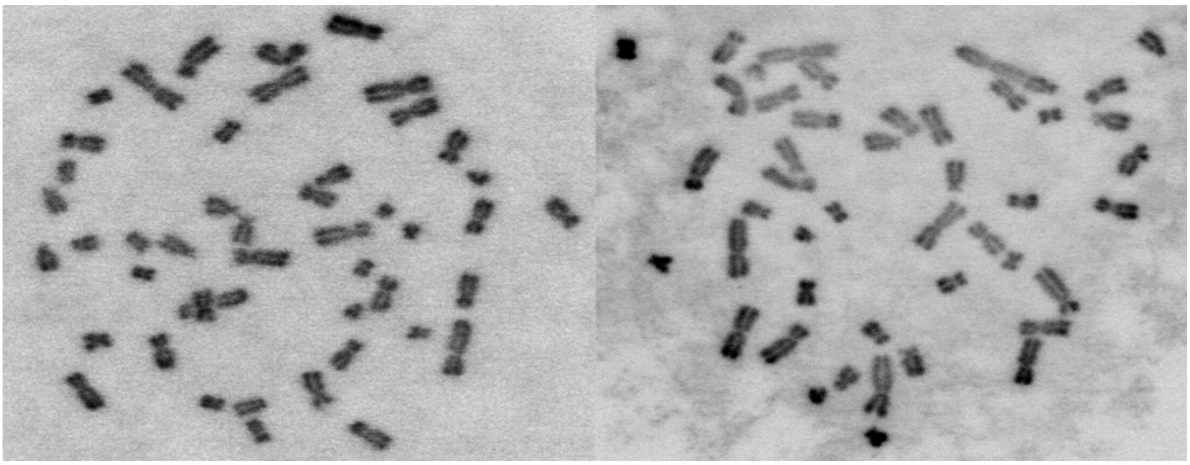


Рисунок 1 — Метафазные хромосомы культивируемых ЭМСК ОЭ (15 пассаж). Флуоресцентная микроскопия (×1000)

Полученные данные свидетельствуют в пользу стабильности кариотипа культивируемых СПК ОЭ в оптимизированных условиях.

Вторым этапом данной работы стало изучение статуса метилирования регуляторного участка гена *RARb* размером 823 п.н., который включал промотор гена и часть первого экзона. Данный ген был выбран в качестве объекта исследования в связи с тем, что является онкосупрессором и вовлечен в многочисленные сигнальные пути, контролирующие регуляцию клеточного цикла, пролиферации, дифференцировки и старения клеток. Продуктом гена *RARb* является рецептор ретиноевой кислоты β (RARb) — ядерный лиганд-зависимый транскрипционный фактор, который относится к рецепторам стероидных и тиреоидных гормонов. В норме ген находится в активном состоянии и его регуляторные области не имеют сайтов дополнительного метилирования. Показано, что появление в исследуемом участке гиперметилирования ведет к инактивации гена. Следствием молчания гена может стать злокачественная трансформация клетки, что подтверждается рядом исследований [13, 14, 17, 18, 24, 25]. Таким образом, выявление сайтов гиперметилирования в регуляторном участке гена *RARb* может быть важным маркером начальных стадий малигнизации в клетках, в т. ч. в ЭМСК ОЭ. Данный подход может применяться для оценки потенциального риска туморо- и онкогенности культивируемых стволовых клеток.

Для выявления абберантного эпигенетического метилирования использовали хорошо зарекомендовавший себя и относительно простой в исполнении метод Bls I и Gla I ПЦР-анализа. Метод заключается в обработке ДНК метилзависимыми эндонуклеазами GlaI или BlsI и последующей амплификацией исследуемого фрагмента ДНК при проведении ПЦР (Гончар Д.А., 2010; Акишев А.Г., 2011). В исследуемом участке *RARb* имеется 4 сайта 5’-PuCGPy-3’, которые могут быть метилированы ферментами Dnmt3a и Dnmt3b [17, 18] и распознаны рестриктазой Gla I. При этом в исследуемом участке нет комбинации сайтов, когда две последовательности 5’-PuCGPy-3’ разделены одним нуклеотидом, и соответственно даже при наличии метилирования BlsI ПЦР-анализ покажет отрицательный результат рестрикции, тем не менее BlsI ПЦР-анализ также проводили для дополнительного внутреннего контроля.

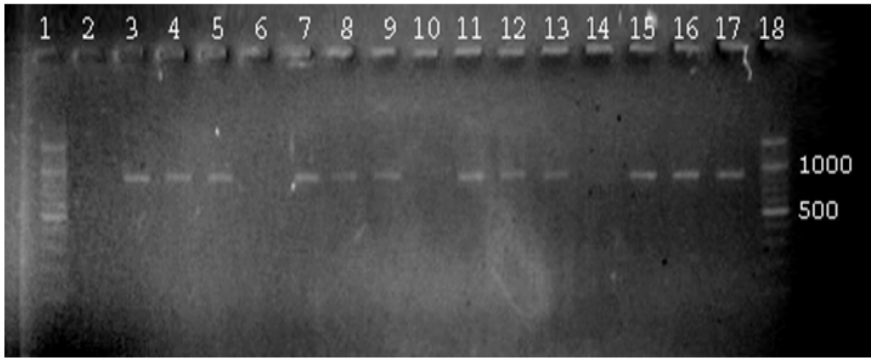


Рисунок 2 — Электрофореграмма продуктов Bls I и Gla I ПЦР-анализа метилирования промотора гена *RARb*: дорожка 1, 18 — ДНК-маркер; дорожки 2, 6, 10 ,14 — положительный контроль рестрикции эндонуклеазой HaeIII (нет продукта ПЦР); дорожки 5, 9, 13, 17 — отрицательный контроль рестрикции, эндонуклеазы не добавлялись (есть ПРЦ-продукт, размер 823 п.н).; дорожки 2–5 — № 1, 3-й пассаж, культивирование после криоконсервации (FatI, GlaI, BlsI, без добавления рестриктаз); дорожки 6–9 — № 2, 4-й пассаж, культивирование после криоконсервации (FatI, GlaI, BlsI, без добавления рестриктаз); дорожки 10–13 — № 2, 3-й пассаж, культивирование с факторами роста — EGF, bFGF (FatI, GlaI, BlsI, без добавления рестриктаз); Дорожки 14–17 – №3, 4-й пассаж, культивирование с факторами роста — EGF, bFGF (FatI, GlaI, BlsI, без добавления рестриктаз)

В результате проведения Bls I и Gla I ПЦР-анализа метилирования регуляторного участка гена-онкосупрессора *RARb* в культурах ЭМСК ОЭ, рекультивированных после криоконсервации и накопленный в присутствии факторов роста, установлено, что во всех случаях образовывался ПЦР-продукт — отрицательный результат рестрикции (рисунки 1 и 2). Это свидетельствует о том, что в

изучаемых CpG-участках регулярторной области онкосупрессора отсутствовали сайты узнавания для метил-зависимых рестриктаз Bls I и Gla I, т. е. ген находится в активном состоянии.

В случае обработки клеточной ДНК рестриктазой, сайт узнавания которой присутствует в ограниченной праймерами области (рестриктаза FatI), после проведения ПЦР искомый ампликон не детектировался на электрофореграмме — положительный контроль рестрикции. В образцах ДНК, не обработанных рестриктазами, в процессе прохождения реакции накапливался ПЦР-продукт — отрицательный контроль рестрикции. На электрофореграмме видно, что в отрицательном контроле интенсивность свечения полосы с продуктом амплификации такая же, как и в случае Bls I и Gla I ПЦР-анализа.

Заключение. Установлено, что в процессе культивирования и накопления биомассы культур ЭМСК ОЭ человека не отмечается повышения риска злокачественной трансформации клеток, связанного с нарушением кариотипа и абберантным метилированием регуляторной области гена-онкосупрессора RARb. Вышеизложенные результаты свидетельствуют в пользу генетической стабильности культивируемых ЭМСК ОЭ в условиях, оптимизированных для накопления их биомассы, и указывают на безопасность использования ЭМСК ОЭ человека в клеточной терапии.

Литература

1. Mesenchymal stem cells in tissue repair [Electronic resource] / A.M. Dimarino [et al.] // Front Immunol. — 2013. — Vol. 4. — doi: 10.3389/fimmu.2013.00201. — Mode of access: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3761350/pdf/fimmu-04-00201.pdf. — Date of access: 07.07.2014.
2. Mesenchymal Stem Cell treatment for autoimmune diseases: a critical review / E. Fernando [et al.] // Biol. Res. — 2012. — Vol. 45, № 3. — P. 269–277.
3. The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth / Z. Han [et al.] // Cell & Bioscience. — 2012. — Vol. 2. — P. 8–15. — doi: 10.1186/1756-8722-5-19. — Mode of access: http://www.jhoonline.org/content/pdf/1756-8722-5-19.pdf. — Date of access: 07.07.2014.
4. Wang, S. Clinical applications of mesenchymal stem cells / S. Wang, X. Qu, R. C. Zhao [Electronic resource] // J. Hematol. & Oncol. — 2012. — Vol. 5.
5. Robert M. Safety in mesenchymal stem cell transplantation / M. Robert // Biomed. Res. Therapy. — 2014. — Vol. 1. — P. 21–24.
6. Herberts C.A. Risk factors in the development of stem cell therapy / C.A. Herberts, M. Kwa, H. Hermsen // J. Translat. Med — 2011. — Vol. 9. — P. 29–43.
7. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application [Electronic resource] / Y. Wang [et al.] // Stem Cells Int. — 2012. — Vol. 2012. — article ID 652034. — Mode of access: http://dx.doi.org/10.1155/2012/652034P. — Date of access: 07.07.2014.
8. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture / Y. Wang [et al.] // Cytotherapy. — 2005. — Vol. 7. — P. 509–519.
9. Цитогенетическое исследование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека в процессе культивирования / Н.П. Бочков [и др.] // Мед. генетика. — 2009. — № 12. — С. 3–6.
10. Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum / J.A. Dahl [et al.] // Int. J. Dev. Biol. — 2008. — Vol. 52. — P. 1033–1042.
11. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center / T. Borgonovo [et al.] // Rev. Bras. Hematol. Hemoter. — 2014. — Vol. 36, № 3. — P. 202–207.
12. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation / Y Wang [et al.] // Cell Death Dis. — 2013. — Vol. 4. — P. 480–491.
13. Esteller, M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism / M. Esteller // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. — 2005. — Vol. 45. — P. 629–656.
14. DNA methylation changes during in vitro propagation of human mesenchymal stem cells: implications for their genomic stability? [Electronic resource] / A. Bentivegna [et al.] // Stem Cells Int. — 2013. — Article ID 192425, 9 p. — Mode of access: http://dx.doi.org/10.1155/2013/192425. — Date of access: 07.07.2014.
15. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma / H. Noushmehr [et al.] // Cancer Cell. — 2010. — Vol. 17, № 5. — P. 510–522.
16. Assessment of DNA methylation for the detection of cervical neoplasia in liquid-based cytology specimens / J.H. Kim [et al.] // Gynecol. Oncol. — 2010. — Vol. 116, № 1. — P. 99–104.
17. Гончар, Д.А. BlsI- и GlaI- ПЦР анализ — новый метод исследования метилированных участков ДНК / Д.А. Гончар, А.Г. Акишев, С.Х. Дегтярев // Вестн. биотехн. и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2010. — Т. 6, № 1. — С. 5–12.
18. Эпигенетическое типирование малигнантных клеточных линий человека с помощью BlsI- и GlaI ПЦР-анализа / А.Г. Акишев [и др.] // Вестн. биотехн. и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7, № 3. — С. 5–16.
19. Tome, M. Identification of nonepithelial multipotent cells in the embryonic olfactory mucosa / M. Tome // Stem Cells. — 2009. — Vol. 27, № 9. — P. 2196–2208.
20. Mackay-Sim, A. Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa / A. Mackay-Sim // Arch. Ital. Biolog. — 2010. — Vol. 148. — P. 47–58.
21. Стволовые и прогениторные клетки обонятельной выстилки человека: условия выделения и накопления в культуре, морфофункциональная и фенотипическая характеристика / Н.Г. Антоневич [и др.] // Клеточные культуры: информ. бюл. — СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2012. — Вып. 28. — С. 27–36.

22. Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions / N. Nivet [et al.] // J. Clin. Investig. — 2011. — Vol. 121, № 7. — P.2808–2820.
23. Functional Effects of Adult Human Olfactory Stem Cells on Early-Onset Sensorineural Hearing Loss / S. Pandit [et al.] // Stem Cells. — 2011. — Vol. 6. — P. 670–677.
24. Methylation of Retinoic Acid Receptor, Beta (RARB) Gene Increases Risk for Prostate Cancer in African-American Men Cancer Epidemiol Biomarkers / B. Rybicki [et al.] // J. Urol. — 2011. — Vol. 20. — P. 317–324.
25. Methylation of the RARB gene increases prostate cancer risk in black Americans. / D. Tang [et al.] // J. Urol. — 2013. — Vol. 190, № 1. — P. 317–324.

EVALUATION OF GENETIC STABILITY OF CULTURED HUMAN OLFACTORY EPITHELIUM-DERIVED ECTOMESENCHYMAL STEM CELLS

Antonevich N.G.[1], Hancharou A.Y.[1], Kvacheva Z.B.[2], Chekan V.L.[3], Sidorenko I.V.[3], Petrova L.G.[3]

[1]Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk;

[2]Institute of Biophysics & Cellular Engineering of NAS of Belarus, Minsk;

[3]Belarusian State Medical Academy of Postdegree Education, Minsk, Belarus

Increased malignant transformation risk of cultured human olfactory epithelium-derived ectomesenchymal stem cells (OE-eMSC) associated with karyotype abnormality and epigenetic hypermethylation in *RARB* promoters was not detected. Observed genetic stability give evidence that OE-eMSC-based cell therapy is safe for human.

Keywords: ectomesenchymal stem cells, human olfactory epithelium, culture, cell therapy.

Поступила 24.06.2014

ОСТРЫЕ РЕСПИРАТОРНЫЕ ИНФЕКЦИИ, ПЕРИНАТАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ И ДРУГИЕ ФАКТОРЫ РИСКА В ГЕНЕЗЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

Вальчук И.Н., Чистенко Г.Н., Дронина А.М.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Реферат. Установлена взаимосвязь между частотой случаев заболевания острыми респираторными инфекциями и относительным риском развития бронхиальной астмы. Определено сочетанное влияние некоторых патологических состояний у новорожденных и их матерей в период беременности и высокой частоты случаев заболевания детей острыми респираторными инфекциями в год как факторов риска последующего развития бронхиальной астмы у детей.

Ключевые слова: бронхиальная астма, дети, острые респираторные инфекции, перинатальные нарушения, патология беременных.

Введение. В структуре аллергических заболеваний проблема бронхиальной астмы (БА) у детей занимает одно из ведущих мест. Это связано с увеличением частоты заболеваемости и утяжелением течения этой формы респираторного аллергоза [1, 2].

БА является хроническим мультифакторным заболеванием, ее развитие тесно связано с воздействием генетических и внешнесредовых (экологических) факторов. Наряду с изучением основного механизма развития БА в настоящее время стали привлекать внимание факторы, усугубляющие риск развития болезни при воздействии причинного фактора. К ним относятся острые респираторные инфекции (ОРИ), перинатальные нарушения, патологическое течение беременности у матери ребенка и другие [1, 3]. Механизмы воздействия этих факторов необычайно сложны и многообразны. Владение точными количественными характеристиками приведенного спектра факторов риска и всесторонний анализ их взаимосвязи с БА является очевидным и необходим для совершенствования эффективности системы профилактики астмы [4, 5].

Цель работы — определение сочетанного влияния патологических состояний у новорожденных и их матерей в период беременности и высокой частоты случаев заболевания детей ОРИ в год как факторов риска последующего развития бронхиальной астмы.

Материалы и методы. Повозрастную динамику доли детей, болеющих ОРИ 4–6 раз и более в год, изучали у 337 детей, заболевших БА в 4, 5, 6, 7 и 8–11 лет. В процессе исследования за каж-

дый год жизни до заболевания БА определяли удельный вес детей, переносивших 4–6 и более случаев заболевания ОРИ в течение года.

Относительный риск развития заболевания БА под влиянием кратности заболевания ОРИ (4–6 раз в год, 7–10 раз в год) определяли в каждой возрастной группе заболевших БА (0–4 года, 5–7 лет, 8–11 лет) с использованием четырехпольной таблицы. Полученные результаты (отношение шансов) оценивали с использованием критерия $\chi 2$ для четырехпольной таблицы с одной степенью свободы.

Влияние патологических состояний в период новорожденности на развитие заболеваний БА изучали у 238 новорожденных детей, которые заболели БА в возрасте 0–4 года. Группу сравнения составили 248 детей того же возраста. С этих же позиций изучено влияние патологических состояний в период беременности у матерей, дети которых в последующем заболели БА в возрасте 0–4 лет. Группу сравнения составили матери здоровых детей. При обработке материала использован метод «случай-контроль»[6]. Статистическая обработка материала производилась с использованием компьютерных программ Microsoft Excel и Epi Info [6].

Результаты и их обсуждение. *Частота случаев заболевания ОРИ и относительный риск развития БА.* Предварительный анализ материала позволил определить, что развитие БА в наибольшей мере ассоциируется с двумя частотными параметрами, характеризующими заболеваемость детей ОРИ:

1) наличие у ребенка 4–6 эпизодов ОРИ в течение года;

2) наличие у ребенка 7 и более эпизодов ОРИ в течение года.

При таком подходе установлено, что у детей, страдающих БА (заболевание возникло в возрасте 3 и 4 года), распространенность заболеваний ОРИ с числом случаев 4–6 раз в течение года до заболевания их БА была существенно выше, чем у детей, не болеющих астмой (группа контроля). Показатель отношения шансов заболевания БА при наличии указанного фактора составлял в различные возрастные периоды жизни этих пациентов 1,92–2,69 ($p<0,01$–$0,001$). В качестве примера для расчета показателя отношения шансов (ОШ) приводим данные о распространенности случаев с числом заболеваний ОРИ 4–6 раз в год у детей в возрасте 3-х лет (год, предшествовавший возникновению бронхиальной астмы), которые заболели БА в возрасте 4-х лет (таблица 1).

Таблица 1 — Распространенность случаев с числом заболеваний ОРИ 4–6 раз в год у больных БА

Группы наблюдения	Наличие предполагаемого фактора риска (число заболеваний ОРИ 4–6 раз в год)	Отсутствие предполагаемого фактора риска (число заболеваний ОРИ 4–6 раз в год)	Сумма
Исследуемая (больные БА)	28 *(a)*	50 *(b)*	78
Контроль (здоровые)	78 *(c)*	356 *(d)*	434
Сумма	106	406	512

Показатель отношения шансов рассчитывался по формуле:

$$\text{ОШ} = \frac{a \times d}{b \times c}.$$

Оценка полученного результата (ОШ = 2,56; ДИ 1,46–4,45; $p<0,001$) показала его высокую степень достоверности.

Еще более значимым фактором риска в возрастной группе детей, которые заболели астмой в возрасте 3 и 4 года, явилась частота случаев заболевания ОРИ в течение года 7–10 раз и более. Параметры отношения шансов при воздействии этого фактора риска в возрасте 1–3 лет составили 7,93–12,13; $p<0,01$–$0,001$.

Анализ частоты случаев заболевания ОРИ у детей, которые заболели БА в возрасте 5–7 лет, показал, что устойчивая ассоциация между частотой случаев заболеваний респираторными инфекциями в год и развитием астмы выявлена, начиная с возраста:

а) 1 год — у заболевших БА в 5 лет;

б) 4 года — у заболевших БА в 6 лет;

в) 3 года — у заболевших БА в 7 лет.

Параметры отношения шансов заболевания БА при частоте ОРИ в год 4–6 раз составили 1,93–11,17; p<0,05–0,001.

Распространенность ОРИ с числом случаев заболеваний 7–10 раз и более в год в предастматические годы у детей, заболевших астмой в возрасте 5 и 6 лет, была выше, чем в группе сравнения, начиная с трех лет, у заболевших в возрасте 7 лет — начиная с 4-х лет. Отношение шансов составляло 7,74–53,43; p<0,001.

В группе детей, заболевших БА в возрасте 8–11 лет, эпизоды с числом заболеваний ОРИ 4–6 раз в год встречались во всех возрастных группах, однако в возрастном интервале 0–3 года такая частота заболеваний не может рассматриваться как фактор риска, т. к. ее распространенность в группе детей, которым диагноз БА впоследствии был установлен в 8–11 лет, существенно не отличалась от распространенности в группе сравнения. Начиная с возраста 4 года и до 7-ми лет отношение шансов заболевания БА у детей, у которых встречался данный фактор (4–6 эпизодов ОРИ в год), в сравнении с группой контроля составляло 1,80–5,87; p<0,05–0,001.

Среди детей, у которых заболевание астмой развилось в возрасте 8–11 лет, распространенность эпизодов с числом заболевания респираторными инфекциями 7–10 раз и более в течение года была низкой, и это воздействие не может рассматриваться как фактор риска.

Таким образом, в группе детей, которые заболели БА в младшем возрасте (3 и 4 года), частота заболеваний ОРИ 4–6, 7–10 раз и более в год являются факторами риска развития БА во все возрастные периоды (1–3 года).

В группе детей, заболевших БА в возрасте 5–7 лет, указанные факторы риска проявляют свое воздействие, начиная с 3–4-летнего возраста и до заболевания астмой.

В группе детей, у которых БА диагностирована в возрасте 8–11 лет, значимый фактор риска представляют заболевания ОРИ с частотой 4–6 случаев в год в возрастной период 4–7 лет.

Таким образом, результаты наших исследований согласуются с большинством современных научных данных о том, что рецидивирующие респираторные инфекции способствуют развитию атопической предрасположенности еще в раннем детстве с последующим развитием аллергических заболеваний [2, 4, 5].

Патологические состояния у новорожденных и их матерей в период беременности, ассоциирующиеся с заболеваниями детей БА. В современной научной литературе обсуждается влияние целого спектра перинатальных нарушений как потенциальных факторов, определяющих риск возникновения и характер последующего течения БА у детей. Гестозы 1 и 2-й половины беременности, угроза преждевременных родов, острые инфекционные заболевания, обострение хронической патологии и другие осложнения течения беременности наблюдаются у 60–70% матерей, чьи дети страдают астмой [3, 7]. Кроме того, исследователи приводят в качестве перинатальных факторов риска: курение матери во время беременности, воздействие профессиональных вредностей, лекарственную терапию, избыточный прием высокоаллергенных продуктов, возраст матери, социальный статус семьи, родоразрешение путем кесаревого сечения, низкую массу тела при рождении, окружность головки более 37 см, проведение после рождения ИВЛ и др. [3, 5].

Необходимость систематизации приведенного спектра перинатальных факторов риска и всестороннего анализа их взаимосвязи с БА является очевидной. Владение точными количественными характеристиками перинатальных факторов риска необходимо для совершенствования эффективности системы профилактики астмы.

На следующем этапе работы были изучены патологические состояния у новорожденных и их матерей в период беременности, которые могли иметь ассоциацию с заболеваниями детей БА. Распространенность патологических состояний изучена у 238 новорожденных детей, которые заболели астмой в возрасте 0–4 лет. Группу сравнения составили 248 детей того же возраста, что и в исследуемой группе. Патологические состояния в период беременности изучены у всех матерей детей обеих групп.

Среди патологических состояний новорожденных, которые могли иметь определенную патогенетическую связь с последующим развитием заболевания БА, на первом этапе были отобраны 5 групп нарушений:

- нарушения церебрального статуса *(ишемия мозга, церебральная депрессия, церебральная возбудимость, нарушение со стороны мозга неутонченное)*;

- геморрагические и гематологические нарушения *(анемия; гемолитическая болезнь новорожденного (ГБН); неонатальная желтуха, обусловленная чрезмерным гемолизом и другими причинами)*;

- состояния, вовлекающие наружные покровы новорожденного *(неонатальная токсическая эритема)*;

- инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода *(инфекции различной этиологии, приобретенные внутриутробно или во время родов)*;

- обвитие новорожденного пуповиной.

Статистическое испытание гипотезы о влиянии патологических состояний новорожденных на развитие заболевания БА проводили на основании метода «случай-контроль». Из пяти патологических состояний новорожденных две группы имели достоверную связь с последующим развитием заболевания БА. К этим состояниям относились геморрагические и гематологические нарушения и заболевания наружных покровов новорожденных. Однако следует отметить также существенную роль инфекционных заболеваний новорожденного как факторов риска БА (относительный риск составил 2,48) (таблица 2).

Таблица 2 — Частота патологических состояний у новорожденных, заболевших впоследствии БА в возрасте 0–4 года

Патологические состояния у новорожденных	Распространенность патологических состояний				Относительный риск	95% ДИ
	Исследуемая группа (n = 238)		Группа контроля (n = 248)			
	абс.	на 100 детей	абс.	на 100 детей		
Нарушения церебрального статуса новорожденного	44	18,49±2,22	31	12,5±2,10	1,48 *χ^2 = 2,89* *p>0,05*	0,94–2,69
Геморрагические и гематологические нарушения новорожденного	**28**	**11,76±2,09**	**15**	**6,05±1,51**	**2,07** ***χ^2 = 4,24*** ***p<0,0395***	**1,03–4,19**
Инфекционные заболевания новорожденного	**16**	**6,72±1,62**	**7**	**2,82±1,05**	**2,48** ***χ^2 = 3,28*** ***p>0,05***	**0,94–6,79**
Заболевания наружных покровов новорожденного	**28**	**11,76±2,09**	**12**	**4,84±1,36**	**2,62** ***χ^2 = 6,82*** ***p<0,009***	**1,24–5,62**
Обвитие новорожденного пуповиной	25	10,5±1,99	18	7,26±1,65	1,50 *χ^2 = 1,21* *p>0,05*	0,76–2,96

Анализ данных о частоте случаев заболевания ОРИ у детей с патологическими состояниями в период новорожденности показал, что в год, предшествовавший заболеванию БА, подавляющее большинство детей (62,5–71,4%) переносило 4–6 и более случаев заболевания ОРИ.

Очевидно, что оба нарушения в состоянии здоровья новорожденных в раннем возрасте создавали благоприятный фон для развития последующих заболеваний ОРИ. Высокая частота респираторных инфекций в дальнейшем приводила к развитию заболевания БА. На возможную роль отдельных перинатальных нарушений в развитии заболевания БА указывают проф. Л.М. Огородова, проф. Н.Г. Астафьева.

Течению беременности уделяется особое внимание для определения факторов, которые могут помочь предсказать развитие астмы и обструктивных заболеваний нижних отделов респираторного тракта.

Анализ частоты патологических состояний во время беременности матерей, дети которых впоследствии заболели БА, показал, что из пяти разновидностей таких состояний достоверная ассоциация установлена для гестозов и хронической экстрагенитальной патологии (таблица 3).

Таблица 3 — Частота патологических состояний в период беременности у матерей, дети которых, заболели БА в возрасте 0–4 года

Патологические состояния у новорожденных	Распространенность патологических состояний				Относительный риск	95% ДИ
	Исследуемая группа (n = 238)		Группа контроля (n = 248)			
	абс.	на 100 детей	абс.	на 100 детей		
Кесарево сечение	41	17,23±2,45	31	11,69±2,04	1,57 *χ^2 = 2,58 p>0,1*	0,91–2,71
Угроза прерывания беременности	58	24,37±2,73	53	21,37±2,60	1,19 *χ^2 = 0,46 p>0,497*	0,76–1,85
Гестозы	**51**	**21,42±2,65**	**30**	**12,10±2,07**	**1,98 *χ^2 = 6,96 p<0,008***	**1,18–3,34**
Хроническая экстрагенитальная патология	**41**	**17,23±2,45**	**23**	**9,27±1,84**	**2,04 *χ^2 = 6,04 p<0,014***	**1,14–3,64**
Раннее отхождение околоплодных вод	52	21,85±2,68	41	16,53±2,36	1,41 *χ2 = 1,89 p>0,05*	0,87–2,28

У детей, родившихся от матерей, перенесших гестозы беременности и страдающих хронической экстрагенитальной патологией, в структуре частоты случаев заболевания ОРИ в год превалировали состояния с 4–6 и более случаями заболевания. Доля детей, родившихся от матерей с гестозами беременности и болевших ОРИ 4–6 раз и более в год, предшествовавший заболеванию БА, составляла 42,9–73,3%. Среди детей, которые родились от матерей, страдающих хронической экстрагенитальной патологией, удельный вес лиц, переносивших 4–6 и более случаев респираторных инфекций в год, предшествовавший развитию заболевания БА, составлял 41,7–73,3%.

Исследования Л.Г. Садовничьей с соавторами подтверждают патогенетическую значимость выявленных нами патологических состояний беременности в развитии последующей патологии новорожденных детей, в частности в развитии заболевания БА.

Таким образом, нами выявлены патологические состояния новорожденных (геморрагические и гематологические нарушения, заболевания наружных покровов, а также инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода) и матерей в период беременности (гестозы, хроническая экстрагенитальная патология), на фоне которых возникают частые заболевания ОРИ (4–6 раз и более в год). В свою очередь, частые ОРИ инициируют возникновение и развитие заболевания БА. Следовательно, патологические состояния новорожденных (геморрагические и гематологические нарушения, заболевания наружных покровов, а также инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода) и матерей в период беременности (гестозы, хроническая экстрагенитальная патология) и высокая частота случаев заболевания ОРИ в год являются сочетанными факторами риска последующего развития заболевания детей БА.

Выводы:

1. В младшей возрастной группе детей от 0 до 4 лет частота заболеваний ОРИ 4–6, 7–10 раз и более в год является фактором риска развития БА во все возрастные периоды этой группы (0–4 года).

2. У детей в возрасте от 5 до 7 лет указанные факторы риска отчетливо проявляют свое воздействие, начиная с 3-летнего возраста.

3. Среди детей в возрасте 8–11 лет значимый фактор риска развития БА представляют заболевания ОРИ с частотой 4–6 случаев в год в возрастном периоде 4–7 лет.

4. Патологические состояния новорожденных (геморрагические и гематологические нарушения, заболевания наружных покровов, а также инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода) и их матерей в период беременности (гестозы, хроническая экстрагенитальная патоло-

гия) в сочетании с высокой частой случаев заболевания детей ОРИ в год (4–6 раз и более) следует рассматривать как сопряженные факторы риска последующего развития заболевания БА у детей.

Литература

1. Бронхиальная астма у детей: учеб.-метод. пособие / Л.Г. Садовничья [и др.]. — Ростов н/Д: Феникс, 2007. — 176 с.
2. Кондюрина, Е.Г. ОРВИ и бронхиальная астма / Е.Г. Кондюрина, Т.Н. Елкина, В.В. Зеленская // Леч. врач. — 2005. — № 9. — С. 28–32.
3. Избранные лекции по педиатрии / под ред. А.А. Баранова, Р.Р. Шилява, Б.С. Копанока. — М.: Издат. дом «Династия», 2005. — 640 с.
4. Респираторные заболевания у детей [Электронный ресурс] // Медицинский справочник болезней и лекарств. — 2009. — Режим доступа: http://lekmed.ru/info/literatyra/respiratornye-zabolevaniya-y-detei-17.html. — Дата доступа: 27.04.2009.
5. Факторы риска развития бронхиальной астмы [Электронный ресурс] // Медицинский справочник. — 2010. — Режим доступа: http://med-tutorial.ru/med-books/book/47/page/3-chast-iii-detskie-bolezni/216-bronhialnaya-astma. — Дата доступа: 23.08.2010.
6. Эпидемиологическая диагностика: учеб. пособие / Г.Н. Чистенко [и др.]; под ред. Г.Н. Чистенко. — Минск, 2007. — 148 с.
7. Новорожденные высокого риска / под ред. В.И. Кулакова, Ю.И. Барашнева. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 528 с.

ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS, PERINATAL DISORDERS AND OTHER RISK FACTORS IN THE DEVELOPMENT OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN

Valchuk I.N., Chistenko G.N., Dronina A.M.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The relationship between the frequency of cases of acute respiratory infections and the relative risk of developing asthma. In the group of children who became ill with asthma at a younger age (0–4 years), the incidence of acute respiratory infections 4–6 times and 7–10 times or more per year are risk factors for asthma in all age periods of the group. In childhood asthma at the age of 5–7 years, these risk factors exert their effects, ranging from 3 years of age. Among the children who are sick with asthma aged 8–11 years, represent a significant risk factor for acute respiratory infections diseases with a frequency of 4–6 events per year in the age period 4–7 years. Defined by a combined effect of pathological conditions in the newborn (haemorrhagic and haematological disorders, diseases of the integument, infectious diseases, and specific to the perinatal period) and their mothers during pregnancy (gestosis, chronic extragenital pathology) and high frequency of cases of children with acute respiratory infections in a year risk factors for subsequent development of asthma.

Keywords: asthma, children, acute respiratory infections, perinatal disorders, pathological pregnancy.

Поступила 09.09.2014

СУБПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ, ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ

Гончаров А.Е.[1], Давидович Г.М.[1,2], Романова И.В.[1], Дуж. Е.В.[1]

[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;

[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Реферат. В исследовании определяли относительное и абсолютное содержание минорных субпопуляций лейкоцитов периферической крови у пациентов с инфекционным мононуклеозом в сравнении с группой здоровых добровольцев: плазмацитоидных дендритных клеток, $CD1c^+$ и $CD141^+$ субпопуляций миелоидных дендритных клеток, моноцитов крови и миелоидных супрессорных клеток моноцитарного и гранулоцитарного ($CD15^+$ и $CD33^+$) происхождения. У пациентов с инфекционным мононуклеозом выявлено изменение соотношения субпопуляций миелоидных дендритных клеток в сторону $CD141^+$ клеток, что, вероятно, указывает на их участие в этиопатогенезе заболева-

ния. Установлено многократное снижение содержания плазмацитоидных ДК, что дает возможность предположить миграцию пДК в лимфоидную ткань либо избирательную гибель клеток. Также выявлено уменьшение пула миелоидных супрессорных клеток моноцитарного происхождения, указывающее на гиперстимуляцию клеток иммунной системы, что выражается в усилении экспрессии молекулы HLA-DR клетками.

Ключевые слова: инфекционный мононуклеоз, иммунный статус, ВЭБ-инфекция, дендритные клетки, моноциты, миелоидные супрессорные клетки.

Введение. Инфекционный мононуклеоз (ИМ) — острое доброкачественное лимфопролиферативное заболевание человека, вызванное вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), характеризующееся наличием у пациента лихорадки, лимфоаденопатии, поражения селезенки и печени, характерными изменениями гемограммы [1].

Первичная ВЭБ-инфекция проявляется в виде респираторной инфекции (40% случаев) или в виде ИМ (около 20%), а также может протекать бессимптомно [2, 3]. В настоящее время у 80–90% населения земного шара выявлена персистенция этого вируса. Рост заболеваемости ИМ отмечается во всех регионах. В Республике Беларусь заболеваемость постепенно возросла с 3,73 случая на 100 тыс. населения в 1991 г. до 64,2 случая на 100 тыс. населения в 2011 г. [4].

Клиническая значимость ИМ обусловлена вовлечением в патологический процесс иммунной, сердечно-сосудистой, пищеварительной, мочевыделительной, нервной и эндокринной систем. Хронизация ВЭБ может привести к неблагоприятным последствиям в виде: Х-связанного лимфопролиферативного синдрома, В-лимфопролиферативных заболеваний (включая посттрансплантационные и ВИЧ-ассоциированные лимфомы — связь с ВЭБ до 90%), лимфомы Беркитта (связь с ВЭБ до 97–100%, а у пациентов с ВИЧ — до 100%), Ходжкинской болезни (связь с ВЭБ до 80%), Т-клеточной лимфомы, синдрома хронической усталости, ВЭБ-ассоциированного гемофагоцитарного синдрома и ряда других заболеваний [1].

В настоящее время имеются данные о связи ВЭБ с развитием острых, хронических и аутоиммунных гепатитов. Особое значение придается связи персистенции ВЭБ с развитием опухолей, поражающих эпителий: волосатой лейкоплакии языка (до 100% у больных с ВИЧ-инфекцией), назофарингеальной карциномы, карциномы желудка [1, 4].

ВЭБ способен вызывать значительные нарушения в иммунном статусе человека: изменение количества и свойств отдельных популяций лимфоцитов и гранулоцитов, нарушение функциональной активности моноцитов, дисбаланс продукции цитокинов. Известно, что ВЭБ обладает тропностью к Т-, В-лимфоцитам и другим иммунокомпетентным клеткам, длительно персистирует в латентном состоянии в В-лимфоцитах. В результате развивается вторичная иммунная недостаточность с выраженной депрессией клеточного иммунитета. В то же время сведения о роли клеточного и гуморального иммунного ответа в иммунопатогенезе ИМ довольно противоречивы. Помимо этого до сих пор не известны клинико-лабораторные критерии, которые позволили бы прогнозировать исход острой ВЭБ-инфекции [3, 5–8].

В последние годы основную роль в модуляции иммунного ответа отводят минорным субпопуляциям лейкоцитов крови. К таким клеткам относят субпопуляции моноцитов, дендритных клеток (ДК), миелоидных супрессорных клеток (МЛСК), истощенных и анергичных Т-лимфоцитов, регуляторных $CD8^+$ и $TCR\gamma\delta^+$ Т-клеток и др. Роль этих субпопуляций в патогенезе ИМ не изучена или изучена недостаточно.

Цель работы — анализ содержания моноцитов, ДК и МЛСК в периферической крови у пациентов с острым ИМ.

Материалы и методы. *Объекты исследований.* Объектами для *in vitro* исследований служили 12 образцов периферической крови пациентов с ИМ (Городская клиническая инфекционная больница г. Минска), а также 10 здоровых добровольцев (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Медианный возраст пациентов составил 21,0 (18,0–23,5) год, а здоровых добровольцев — 24 (26,0–28,0) года.

Определение иммунофенотипа клеток крови. Иммунофенотип лейкоцитов определяли методом проточной цитометрии. Использовали следующие моноклональные антитела: CD1c (APC, клон AD5-8E7), CD3 (FITC, клон UCHT1), CD11b (APC, клон MEM-174), CD11c (PE-Cy7, клон B-ly6), CD14 (FITC, клон RMO52), CD15 (PE, клон MEM-158), CD16 (FITC, клон ICO-116), CD16 (APC, клон ICO-116), CD19 (FITC, клон J3-119), CD33 (PerCP-Cy5.5, клон WM53), CD123 (PE, клон

SSDCLY107D2), CD141 (PE, клон 1A4), HLA-DR (PE-Cy7, клон Immu-357), HLA-DR (BD Horizon™ V500, клон G46-6). Образец крови в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами на протяжении 15 мин при температуре 4ºС. Лизировали эритроциты раствором хлорида аммония, осаждали клетки центрифугированием, удаляли супернатант, суспендировали клетки в фосфатно-солевом буферном растворе. Учет проводили на проточных цитофлюориметрах «FACSCalibur» и «FACSCanto II». Для корректной настройки параметров компенсации готовили неокрашенные и «single-stained» контроли.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрических методов (U-критерий Манна–Уитни, коэффициент корреляции Спирмана). Значения показателей преимущественно представлены в виде медианы с интерквартильным размахом в виде 25 и 75-й процентилей. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Анализ выбранных нами субпопуляций представляет определенную сложность. Это вызвано прежде всего отсутствием специфических маркеров к изучаемым субпопуляциям и, соответственно, необходимостью использовать в исследовании панели со несколькими антителами одновременно. Помимо этого многие исследуемые антигены отличаются невысокой плотностью экспрессии на клетке, соответственно, требуется использование антител, конъюгированных с наиболее яркими флуорохромами, и учет результатов на цитофлуориметре с высокой чувствительностью для получения хорошего разделения между позитивным и негативным сигналом. Принимая во внимание невысокое содержание субпопуляций клеток, которое редко достигает 1%, необходимо учитывать значительное число событий, как правило, не менее 200 тыс. на опыт, а также иметь возможность дискриминации конгломератов (doublets) клеток по параметрам прямого светорассеяния («FSC-Area» vs «FSC-Height»).

В связи с вышеизложенным анализ гранулоцитарных МЛСК (G-MDSC) и миелоидных ДК (мДК) крови осуществляли на более совершенном цитофлуориметре «FACSCanto II», в то время как субпопуляции моноцитов учитывали на проточном цитометре «FACSCalibur».

ДК крови представляют собой профессиональные антигенпредставляющие клетки, обеспечивающие инициацию и направленность адаптивного иммунного ответа. ДК человека по происхождению разделяют на 2 группы: мДК и плазмацитоидные ДК (пДК), дифференцированные из лимфоидных клеток-предшественников [9–11]. По экспрессии ряда молекул и выполняемым функциям можно выделить множество субпопуляций ДК. Так, мДК крови разделяют на 2 крупные субпопуляции: DC1, экспрессирующие молекулу CD1c (BDCA-1), и DC2 ДК, которые экспрессируют молекулу CD141 (BDCA-3), и функционально схожи с $CD8^+$ ДК мышей [11]. пДК также разделяют на CD303 $(BDCA\text{-}2)^+$ и CD304 $(BDCA\text{-}4)^+$ клетки. ДК не экспрессируют популяционные (линейные) маркеры Т-, В- лимфоцитов, естественных киллеров, моноцитов и гранулоцитов, т. е. CD3, CD19, CD14, CD34, CD66b, CD56. Выполняемые ДК функции захвата антигена и его представления на мембране Т-клеток обуславливает широкий спектр поверхностных молекул, к которым относят патогенраспознающие рецепторы, молекулы ГКС II класса, костимуляторные и коингибиторные молекулы, молекулы клеточной адгезии, хемокиновые рецепторы.

Ранее выполненные исследования в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии показали важную роль ДК в иммунопатогенезе инфекционных заболеваний, в частности вирусных гепатитов В и С и туберкулеза [11].

В процессе анализа мДК вначале исключали на цитограмме FSC-Area/FSC-Height конгломераты (doublets) из учета, затем визуально формировали регион лейкоцитов, в котором последовательно определяли границы региона мононуклеарных клеток (рисунок 1).

В полученном регионе анализировали экспрессию молекулы HLA-DR и популяционных маркеров (lin): CD3, CD14, CD16 и CD19. Учитывая, что ДК экспрессируют молекулы комплекса гистосовместимости II класса при отсутствии экспрессии маркеров других клеточных популяций, выделяли соответствующим образом регион, содержащий ДК. В данном регионе анализировали экспрессию молекулы CD11c — основного маркера мДК. Подсчитывали относительное число $CD11c^+$ мДК среди лейкоцитов. Далее в регионе $HLA\text{-}DR^+lin^-$ учитывали число клеток, экспрессирующих молекулы CD11c и CD1c, а также CD11c и CD141hi.

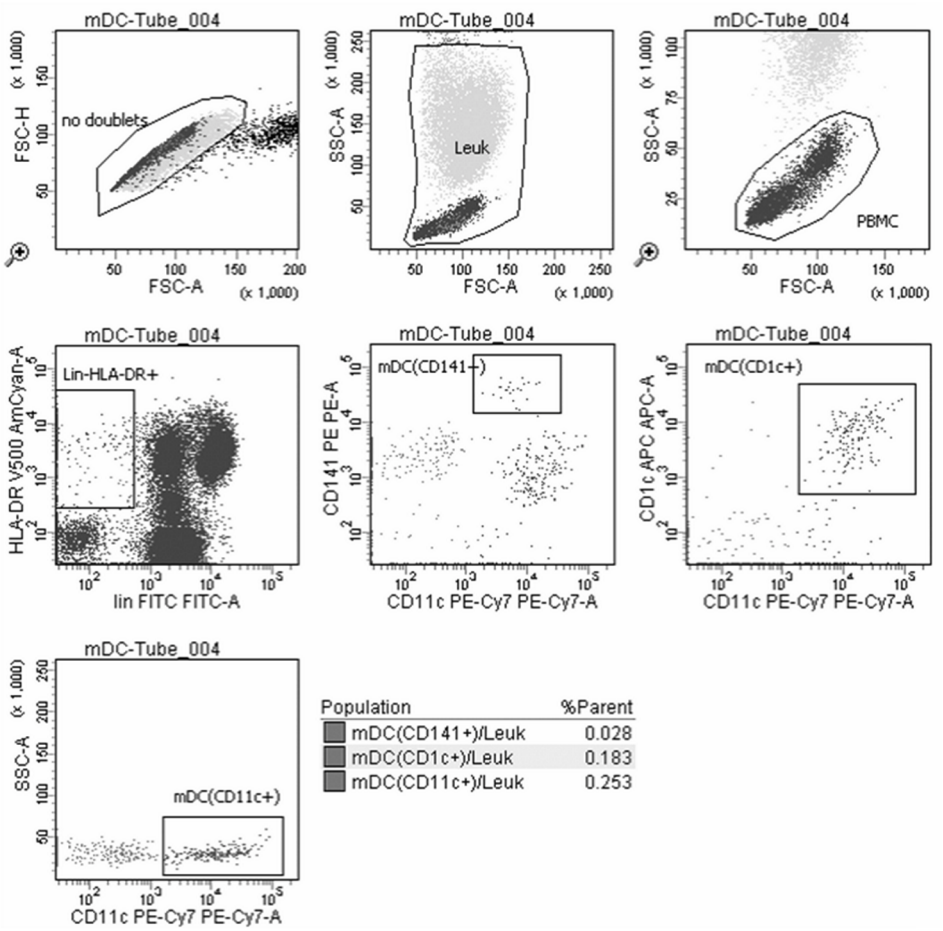


Рисунок 1 — Анализ содержания мДК в периферической крови

Анализ содержания мДК показал уменьшение относительного количества CD11c$^+$ мДК (p = 0,001) в периферической крови пациентов с ИМ (таблица).

Абсолютное содержание всей фракции мДК оставалось в пределах контрольных значений (p = 0,366). Однако при этом относительное содержание CD1c$^+$ субпопуляции ДК было уменьшено в 3 раза (p = 0,001), а абсолютное — в 2 (p = 0,002). В то же время и относительное, и абсолютное содержание CD141+ мДК было достоверно увеличено.

Соотношение CD1c+ мДК/CD141+ мДК составило 1,9 (1,4–2,6) у пациентов с ИМ и 6,2 (5,6–7,3) в группе здоровых добровольцев (p = 0,00013). Принимая во внимание результаты расчета данного соотношения, можно сделать вывод о том, что у пациентов с ИМ имеет место перераспределение BDCA-1 и BDCA-3 субпопуляций в сторону клеток с фенотипом BDCA-3. Данное наблюдение, по всей видимости, подтверждает ранее показанный факт вовлеченности CD141$^+$ субпопуляции ДК в презентацию вирусных антигенов после поглощения фрагментов мертвых клеток, содержащих вирусные частицы, и указывает на участие BDCA-3$^+$ мДК в иммунном ответе против ВЭБ [12].

Таблица — Содержание минорных субпопуляций клеток периферической крови у пациентов с ИМ

Субпопуляция лимфоцитов	Пациенты с ИМ (n = 12)	Здоровые добровольцы (n = 10)	p
CD15$^+$ G-MDSC, % (от числа лейкоцитов)	0,041(0,024–0,069)	0,022 (0,007–0,048)	0,099
CD15$^+$ G-MDSC, ×10^6/мл	0,003 (0,003–0,006)	0,001 (0,001–0,004)	0,052
CD33$^+$ G-MDSC, % (от числа лейкоцитов)	0,053 (0,040–0,084)	0,021 (0,018–0,026)	0,448
CD33$^+$ G-MDSC, ×10^6/мл	0,005 (0,004–0,009)	0,003 (0,001–0,006)	0,277
M-MDSC, % (от числа лейкоцитов)	0,075 (0,05–0,135)	0,32 (0,23–0,37)	0,011
M-MDSC, ×10^6/мл	0,006 (0,005–0,014)	0,018 (0,016–0,026)	0,0027

Окончание таблицы

CD11c^{+} мДК, % (от числа лейкоцитов)	0,134 (0,113–0,195)	0,255 (0,224–0,360)	0,001
CD11c^{+} мДК, ×10^{6}/мл	0,014 (0,012–0,016)	0,016 (0,012–0,021)	0,366
CD1c^{+} мДК, % (от числа лейкоцитов)	0,042 (0,030–0,056)	0,142 (0,106–0,156)	0,001
CD1c^{+} мДК, ×10^{6}/мл	0,004 (0,003–0,005)	0,009 (0,006–0,012)	0,002
CD141^{+} мДК, % (от числа лейкоцитов)	0,022 (0,016–0,044)	0,021 (0,018–0,026)	0,553
CD141^{+} мДК, ×10^{6}/мл	0,002 (0,002–0,004)	0,001 (0,001–0,002)	0,023
пДК, % (от числа лейкоцитов)	0,04 (0,02–0,11)	0,400 (0,250–0,520)	0,000001
пДК, ×10^{6}/мл	0,003 (0,002–0,01)	0,022 (0,013–0,032)	0,00017
«Классические» моноциты, % (от суммарного числа CD14^{+} клеток)	89,95 (87,62–92,10)	86,3 (82,4–88,4)	0,032
«Классические» моноциты, ×10^{6}/мл	0,513 (0,347–0,630)	0,368 (0,298–0,429)	0,199
«Промежуточные» моноциты, % (от суммарного числа CD14^{+} клеток)	5,63 (3,39–7,19)	3,4 (1,9–5,4)	0,07
«Промежуточные» моноциты, ×10^{6}/мл	0,031 (0,023–0,048)	0,016 (0,006–0,022)	0,016
«Неклассические» моноциты, % (от суммарного числа CD14^{+} клеток)	1,64 (0,41–2,19)	5,1 (0,9–7,0)	0,093

Миелоидные супрессорные клетки представляют собой крайне гетерогенную популяцию активированных незрелых клеток миелоидного происхождения, которая обладает способностью подавлять эффекторный иммунный ответ [13–15].

МЛСК человека имеют моноцитарное либо гранулоцитарное происхождение. Известно, что G-MDSC являются незрелыми миелоидными клетками, не несущими популяционных маркеров зрелых гранулоцитов и молекул II класса ГКС, но экспрессирующими молекулы CD11b, CD33 и/или CD15 [13]. Наиболее часто иммунофенотип G-MDSC описывают как lin^{-}HLA-DR^{-}CD33^{+}CD11b^{+}CD15^{+}, а иммунофенотип МЛСК моноцитарного происхождения (M-MDSC) как lin^{-}HLA-DR^{-}CD14^{+}. В то же время ряд авторов под МЛСК понимает CD33^{+}HLA-DR^{-} клетки, под G-MDSC — CD66b^{+}/CD33int/HLA-DR^{-}, CD11b^{+}VEGFR1^{+}CD66b^{+}, CD62L$^{lo/neg}$CD16$^{lo/neg}$, CD33^{+}HLA-DR^{low}HIF1α^{+}/STAT3^{+} или CD11b^{+}HLA-DR^{low}C/EBPβ^{+} клетки, а под M-MDSC — CD33^{+}/CD14^{+}/HLA-DR^{low}, причем этот список можно было бы существенно пополнить. Тем не менее ни одни из предложенных вариантов до сих пор не получил широкого распространения, и несмотря на многочисленные исследования, популяция МЛСК продолжает оставаться относительно слабо охарактеризованной.

К настоящему времени накоплена информация о роли МЛСК в иммунопатогенезе рака. Показано значительное увеличение доли G-MDSC и M-MDSC у пациентов, страдающих раком разной локализации, преимущественно на поздних стадиях болезни [13, 15]. Учитывая выявленную способность МЛСК подавлять пролиферацию и вызывать анергию Т-клеток, в т. ч. CD8^{+} лимфоцитов, стимулировать формирование Т-регуляторных клеток, ингибировать функциональную активность АПК, в последние годы предположено, что МЛСК играют важную роль в хронизации вирусных инфекций [16]. Так, в ряде работ развернулась дискуссия о роли G-MDSC в патогенезе хронического гепатита С. Показано, что CD33^{+} клетки после культивирования с гепатоцитами, зараженными HCV или HCV core-белком, приобрели иммунофенотип характерный для супрессорных клеток (CD14+CD11b$^{+/low}$HLA-DR$^{-/low}$) и отличались способность подавлять активацию Т-клеток [17].

В настоящем исследовании гейтирование G-MDSC осуществляли следующим образом. На точечной цитограмме, построенной в координатах FSC-Area и FSC-Height, выделяли регион, не содержащий клеточные конгломераты (рисунок 2).

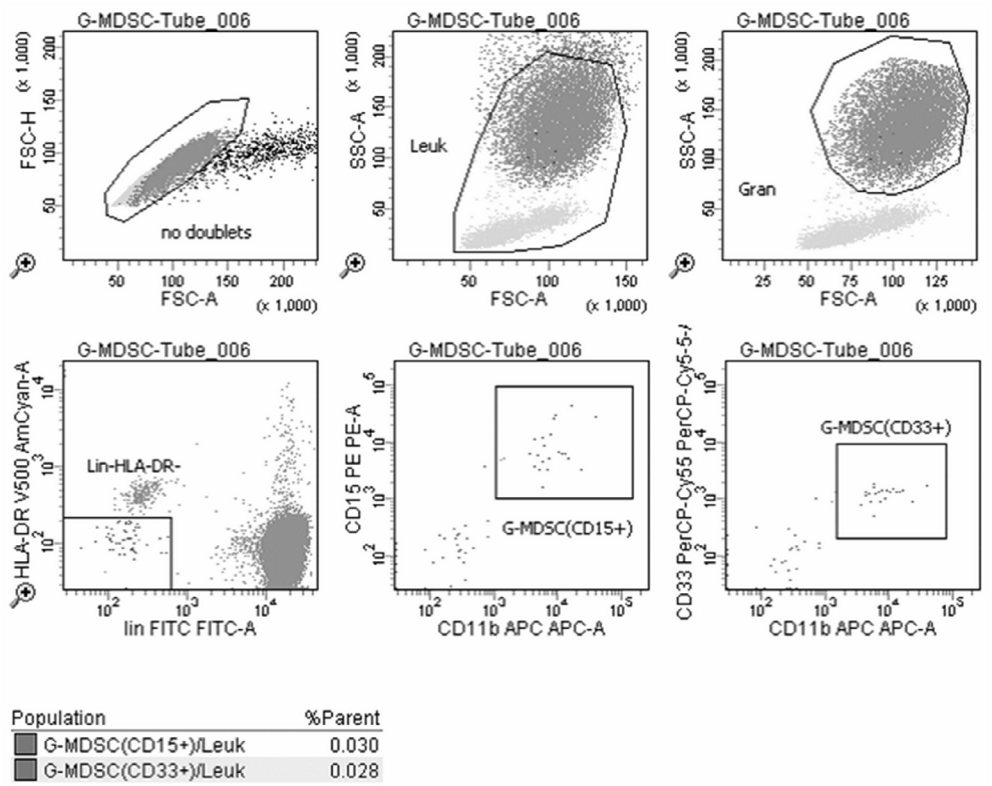


Рисунок 2 — Анализ содержания МЛСК гранулоцитарного происхождения в периферической крови

В полученном регионе на цитограмме светорассеяния отграничивали регион лейкоцитов, а затем нейтрофилов. В регионе, содержащем нейтрофилы, анализировали экспрессию молекулы HLA-DR и популяционных маркеров. Выделяли регион клеток, не экспрессирующих HLA-DR и lin-маркеры. Клетки в данном регионе проецировали на цитограммы в координатах CD11b/CD15 и CD11b/CD33. G-MDSC определяли как клетки, ко-экспрессирующие два маркера: $CD11b^+CD15^+$ и $CD11b^+CD33^+$.

Результаты наших исследований показывают, что у пациентов с ИМ выявлена тенденция к увеличению относительного ($p = 0,099$) и абсолютного ($p = 0,052$) содержания $CD15^+$ G-MDSC (таблица).

В то же время статистически достоверных изменений количества $CD33^+$ G-MDSC выявлено не было.

Следует обратить внимание на значительную вариабельность содержания G-MDSC как у пациентов с ИМ, так и у здоровых добровольцев. Так, у пациентов с ИМ медианное количество $CD15^+$ G-MDSC составило 0,041 (0,024–0,069)% (минимальное значение — 0,01%, максимальное — 0,22%). У здоровых добровольцев — 0,022 (0,007–0,048)% (минимум — 0,004%, максимум — 0,167%).

Что касается количества $CD33^+$ G-MDSC, то минимальное содержание у пациентов, страдающих ИМ, составило 0,02%, а максимальное — 0,238%; в группе сравнения минимальное значение — 0,012%, максимальное — 0,192%, т. е. значения показателя отличаются в 12–16 раз.

Следует отметить, что количественные показатели G-MDSC, полученные в настоящем исследовании, значительно ниже, чем показано в некоторых работах. Ответ на данный вопрос заключается, как мы считаем, в стратегии гейтирования. Полученный опыт показывает, что в процессе анализа G-MDSC следует выделять только регион гранулоцитов. В ряде работ авторы выполняли поиск G-MDSC среди всех лейкоцитов, включая мононуклеарные клетки [13, 14]. На наш взгляд, такой

подход к гейтированию некорректен, т. к. не позволяет исключить из подсчета базофилы — клетки с небольшими размерами и гранулярностью (FSClo SSClo), не экспрессирующие HLA-DR, и популяционные маркеры CD3, CD14, CD19, слабо экспрессирующие молекулу CD16 и характеризующиеся высокой экспрессией миелоидных маркеров — CD11b, CD15 и особенно CD33. Таким образом, содержание G-MDSC в некоторых исследованиях завышено за счет включения базофилов.

Моноциты крови являются предшественниками антигенпредставляющих клеток: макрофагов, клеток Лангерганса, интерстициальных ДК и др. [18, 19]. Моноциты в настоящее время рассматривают как гетерогенную популяцию клеток. По степени экспрессии молекул CD14 и CD16 охарактеризованы основные 3 субпопуляции: 1) классические (classical) моноциты $CD14^{++}CD16^{-}$; 2) промежуточные (intermediate) моноциты $CD14^{++}CD16^{+}$; 3) неклассические (non-classical) моноциты $CD14^{+}CD16^{++}$ [19].

В процессе жизненного цикла классические моноциты по всей видимости дифференцируются в промежуточные и неклассические моноциты. Дискутируется роль промежуточных и неклассических моноцитов при различных патологических состояниях. Так, увеличение доли неклассических и промежуточных моноцитов установлено у пациентов с сепсисом, РА, тяжелым течением бронхиальной астмы [9, 20].

Используемая нами панель антител позволяет выполнять одновременно определение субпопуляций моноцитов, пДК и M-MDSC (рисунок 3).

Выполняется последовательное гейтирование лейкоцитов, мононуклеаров, а затем $CD14^{+}$ и $CD14^{-}$ клеток. В регионе, содержащем CD14+ моноциты, анализируется интенсивность экспрессии молекул CD14 и CD16 на двухмерных цитограммах. По интенсивности экспрессии вышеуказанных молекул моноциты могут быть разделены на 3 субпопуляции: «классические» моноциты, «промежуточные» и «неклассические» моноциты. Проводится расчет процентного содержания данных субпопуляций от числа всех CD14+ моноцитов крови. Регион, содержащий $CD14^{-}$ клетки, проецируют на двухмерную цитограмму экспрессии CD123 и HLA-DR. Выделяют регион пДК — $CD123^{hi}$ $HLA\text{-}DR^{+}$ клеток. Затем визуализируют $CD14^{+}$ клетки на цитограмме CD14/HLA-DR. Формируют регион $CD14^{+}HLA\text{-}DR^{-/lo}$ клеток, которые являются M-MDSC. Рассчитывают число M-MDSC среди лейкоцитов.

Общегрупповое относительное содержание фракции пДК среди лейкоцитов крови было достоверно снижено у пациентов с ИМ в 10 раз ($p = 0{,}000001$), а абсолютное — в 7 раз ($p = 0{,}00017$) по сравнению с аналогичными показателями в группе здоровых добровольцев, что, вероятно, указывает на вовлеченность пДК (одних из основных продуцентов ИНФ-альфа) в иммунопатогенез ИМ.

Из литературных источников известно, что ВЭБ инициирует апоптоз моноцитарных ДК человека и нарушает процессы созревания ДК [21]. В то же время влияние ВЭБ на пДК изучено недостаточно. Описаны лишь эксперименты по стимуляции выделенных из крови пДК вирусом Эпштейна–Барр, которые показали усиление продукции клетками интерферона-α [22].

Результаты наших экспериментов позволяют предположить как миграцию пДК в лимфоидную ткань, так и избирательную гибель клеток в результате инфицирования вирусом или вследствие других причин. В связи с этим требуются дальнейшие эксперименты для уточнения причины значительного снижения содержания пДК у пациентов с ИМ.

Учитывая тот факт, что снижение числа пДК ниже 0,1% выявлено у 7 пациентов из 12 (58,3±14,2%), представляет интерес дальнейшее наблюдение за пациентами с целью выявления ассоциации содержания пДК в периферической крови и исхода заболевания (выздоровление, затяжное течение, хронизация и др.).

Анализ содержания моноцитов показал наличие тенденции к увеличению относительного числа «промежуточных» моноцитов в общей фракции моноцитов ($p = 0{,}07$). Установлено достоверное увеличение абсолютного числа этой субпопуляции в 2 раза ($p = 0{,}016$). Также выявлено увеличение содержания «классических» моноцитов у пациентов с ИМ (ИМ – 89,95 (87,62–92,10)%, контроль — 86,3 (82,4–88,4)%, $p = 0{,}032$).

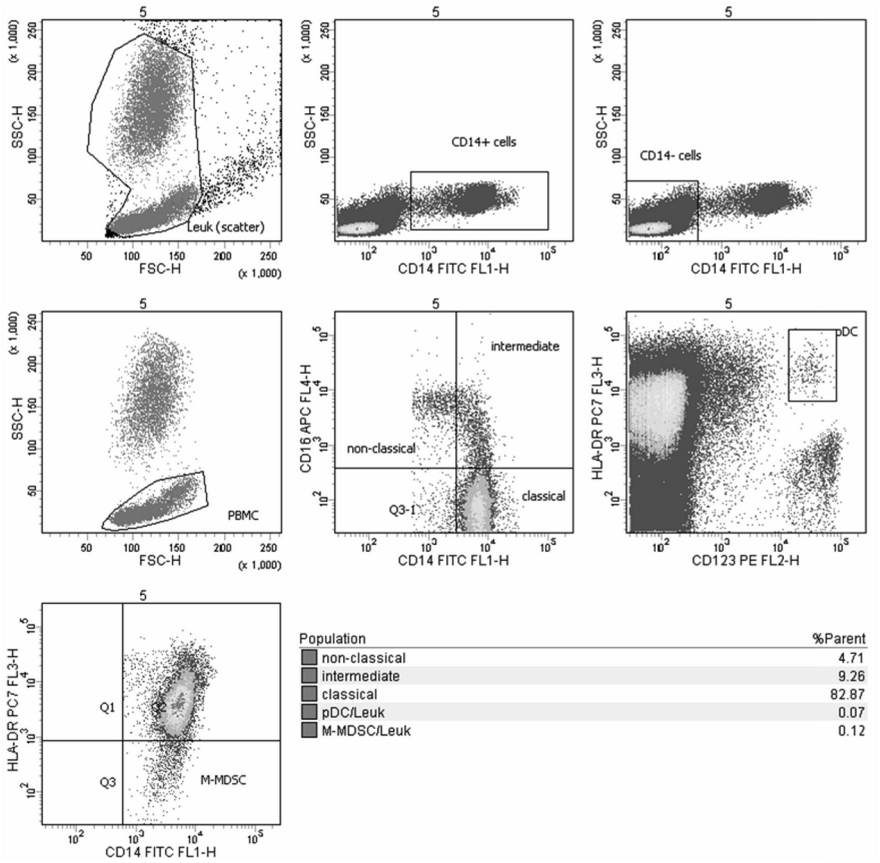


Рисунок 3 — Гейтирование моноцитов, пДК и M-MDSC

Содержание «неклассических» и «промежуточных» моноцитов сильно варьировало как у пациентов, так и у здоровых добровольцев. Минимальное содержание «неклассических» моноцитов составило 0,18%, а максимальное — 10,6%, «промежуточных»: минимальное — 0,54%, а максимальное — 6,26%. Подобная вариабельность затрудняет общегрупповой анализ данных даже с учетом использования непараметрических методов статистической обработки данных.

Были выявлены различные коррелятивные взаимосвязи между субпопуляциями моноцитов и ДК. Из представляющих интерес можно отметить отрицательную корреляцию между относительным число $CD11c^+$ мДК и «неклассической» фракции моноцитов ($R = –0,7$; $p = 0,01$), между абсолютным содержанием CD11c+ мДК и «промежуточной» фракции моноцитов ($R = –0,6$; $p = 0,04$), а также положительную корреляцию между абсолютным числом «неклассических «и «промежуточных» моноцитов ($R = 0,7$; $p = 0,01$).

У пациентов с ИМ установлено снижение относительного ($p = 0,011$) и абсолютного ($p = 0,0027$) числа M-MDSC, что, вероятно, указывает на значительную стимуляцию иммунокомпетентных клеток ВЭМ и усиление ими экспрессии молекулы HLA-DR.

Заключение. В результате исследований у пациентов с ИМ выявлено статистически достоверное снижение числа $CD1c^+$ мДК и увеличение содержания $CD141^+$ мДК, что указывает на участие $BDCA\text{-}3^+$ мДК в иммунном ответе против ВЭБ. В то же время установлено многократное снижение содержания пДК среди лейкоцитов крови пациентов с ИМ, что может указывать как на миграцию пДК в лимфоидную ткань, так и избирательную гибель клеток.

Содержание M-MDSC было снижено, что, вероятно, указывает на стимуляцию $CD14^+$ клеток ВЭМ и усиление ими экспрессии молекулы HLA-DR. В то же время у пациентов с ИМ выявлена тенденция к увеличению относительного и абсолютного содержания $CD15^+$ G-MDSC.

Следует отметить, что установлена значительная вариабельность в содержании субпопуляций МЛСК и моноцитов крови как в группе пациентов с ИМ, так и у здоровых добровольцев.

Таким образом, результаты исследования указывают на существенные изменения в содержании субпопуляций МДСК, моноцитов и ДК у пациентов с ИМ и требуют дальнейших исследований для установления роли этих субпопуляций в этиопатогенезе болезни и возможности использования количественных показателей в рутинной клинической практике.

Литература

1. Краснов, В.В. Инфекционный мононуклеоз: клиника, диагностика / В.В. Краснов, А.И. Шипенок, Л.А. Кузенкова. — СПб.; Н.Новгород, 2003. — С. 1–4.

2. Крамарев, С.О. Эпштейна–Барр вирусная инфекция у детей / С.О. Крамарев, Н.Г. Литвиненко, Л.О. Палатная // Современная педиатрия. — 2004. — Т. 4, № 5. — С. 105–109.

3. Шестакова, И.В. Современные подходы к лечению Эпштейна-Барр-вирусной инфекции у взрослых / И.В. Шестакова, Н.Д. Ющук // Леч. врач. — 2011. — № 2. — С. 98–100.

4. Баннова, С.Л. Возрастные клинико-иммунологические аспекты инфекционного мононуклеоза Эпштейна–Барр вирусной этиологии на современном этапе: автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.01.09; 14.03.09 / С.Л. Баннова. — СПб., 2010. — 21 с.

5. Acute infectious mononucleosis: characteristics of patients who report failure to recover / D.S. Buchwald [et al.] // Am. J. Med. — 2000. — Vol. 109, № 7. — P. 531–537.

6. Predictors of fatigue following the onset of infectious mononucleosis / B. Candy [et al.] // Psychol. Med. — 2003. — Vol. 33, № 5. — P.847–855.

7. Cameron, B. Prolonged Illness after Infectious Mononucleosis Is Associated with Altered Immunity but Not with Increased Viral Load / B. Cameron [et al.] // J. Infect. Dis. — 2006. — Vol. 193. — P. 664–671.

8. Chronic fatigue syndrome following infections in adolescents / B.Z. Katz [et al.] // Curr. Opin. Pediatr. — 2013. — Vol. 25, № 1. — P. 95–102.

9. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells / F. Geissmann [et al.] // Sci. — 2010. — Vol. 327, № 5966. — P. 656–661.

10. An 11-color Flow Cytometric Assay for Identifying, Phenotyping, and Assessing Endocytic Ability of Peripheral Blood Dendritic Cell Subsets in A Single Platform / J.E. Wang [et al.] // J. Immunol. Meth. — 2009. — Vol. 341, № 1–2. — P. 106–116.

11. Состояние системы мононуклеарных фагоцитов (моноцитов, дендритных клеток) у пациентов с разными формами лекарственно-устойчивого туберкулеза легких / А.Е. Гончаров [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. — 2012. — № 4. — С. 4–15.

12. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens / S.L. Jongbloed [et al.] // J. Exp. Med. — 2010. — Vol. 207, № 6. — P. 1247–1260.

13. Khaled, Y.S. Increased levels of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood and tumour tissue of pancreatic cancer patients [Electronic resource] / Y.S. Khaled, B.J. Ammori, E. Elkord // J. Immunol. Res. — 2014. — Vol. 2014. — doi: 10.1155/2014/879897. — Mode of access: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3987936/pdf/JIR2014-879897.pdf. — Date of access: 22.05.2014.

14. Comparative analysis of monocytic and granulocytic myeloid-derived suppressor cell subsets in patients with gastrointestinal malignancies / A. Duffy [et al.] // Cancer Immunol. Immunother. — 2013. — Vol. 62. — P. 299–307.

15. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer / B. Almand [et al.] // J. Immunol. — 2001. — Vol. 166, № 1. — P. 678–689.

16. Goh, C. Myeloid-derived suppressor cells: the dark knight or the joker in viral infections? / C. Goh, S. Narayanan, Y.S. Hahn // Immunol. Rev. — 2013. — Vol. 255. — P. 210–221.

17. Myeloid suppressor cells induced by hepatitis C virus suppress T cell responses through the production of reactive oxygen species / R. Tacke [et al.] // Hepatol. — 2011. — Vol. 55. — P. 343–353.

18. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells / C. Auffray [et al.] // Ann. Rev. Immunol. — 2009. — Vol. 27. — P. 669–692.

19. Gordon, S. Monocyte and macrophage heterogeneity / S. Gordon, P.R. Taylor // Nat. Rev. Immunol. — 2005. — Vol. 5, № 12. — P. 953–964.

20. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans / P. Autissier [et al.] // Cytometry. Part A. — 2010. — Vol. 77A. — P. 410–419.

21. Effects of Epstein-Barr virus on the development of dendritic cells derived from cord blood monocytes: an essential role for apoptosis / J. Wang [et al.] // Braz. J. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 16, № 1. — P. 19–26.

22. Epstein-Barr Virus Promotes Interferon-α Production by Plasmacytoid Dendritic Cells / T.E. Quan [et al.] // Arthritis Rheum. — 2010. — Vol. 62, № 6. — P. 1693–1701.

SUBSETS OF PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES, DENDRITIC CELLS AND MYELOID-DERIVED SUPRESSOR CELLS IN THE PATIENTS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Hancharou A.Y., Davidovich G.M., Ramanava I.U., Duzh E.V.

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

In the current investigation relative and absolute count of minor leukocyte subsets was assayed: $CD1c^+$ and $CD141^+$ myeloid dendritic cells, $CD14^+/CD16^+$ blood monocytes and monocytic and granulocytic

(CD15$^+$ and CD33$^+$) myeloid-derived suppressor cells in the patients with infectious mononucleosis compared with healthy controls. In patients with infectious mononucleosis statistically significant myeloid dendritic cell subset redistribution was determined with the increase of CD141$^+$ cells, indicative of its role in the immunopathogenesis of the disease. The decrease of plasmacytoid dendritic cell count in the patients with mononucleosis was observed, suggesting migration to the lymphoid tissue or selective depletion. Monocytic myeloid-derived suppressor cell count was reduced in the patients with acute EBV-infection, explaining EBV-induced immune system hyperstimulation.

Keywords: infectious mononucleosis, immune status, dendritic cell, monocytes, myeloid-derived suppressor cells.

Поступила 10.07.2014

ТЯЖЕЛАЯ ВНЕБОЛЬНИЧНАЯ ПНЕВМОНИЯ: ПРИЧИНЫ, ФАКТОРЫ РИСКА, ПРОФИЛАКТИКА

Горбич О.А., Чистенко Г.Н.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Реферат. В настоящей работе проанализированы 12 параметров, оказывающих влияние на тяжесть течения клинической картины внебольничной пневмонии у детей. Представлены значимые факторы риска тяжелого течения внебольничной пневмонии среди госпитализированных в многопрофильную больничную организацию здравоохранения детей г. Минска.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, факторы риска, дети.

Введение. На протяжении многих лет пневмония остается одной из наиболее актуальных проблем современной педиатрии как в Республике Беларусь, так и в мире. По мнению ряда экспертов, 10% случаев пневмонии характеризуется тяжелым, жизнеугрожающим течением и требует госпитализации в отделение интенсивной терапии и реанимации. На международном уровне все усилия медицинских работников направлены на снижение детской заболеваемости и смертности. Так, согласно Глобальному плану действий по профилактике пневмонии, ВОЗ и ЮНИСЕФ установили целью сплочение усилий по профилактике и лечению пневмонии, а также улучшение доступа к таким спасающим жизни мероприятиям, как вакцинация, грудное вскармливание и адекватная терапия [1]. Следует отметить значительные экономические потери, которые несет государство, обусловленные пневмонией, т. к. на долю этого заболевания приходится основной объем назначения антибактериальных препаратов у пациентов [2–5].

Цель работы — установление причин и факторов, оказывающих влияние на тяжесть течения клинической картины внебольничной пневмонии в Республике Беларусь, учитывая разнообразие данных о причинах и факторах риска развития тяжелой внебольничной пневмонии у детей на территории разных стран.

Материалы и методы. В настоящее проспективное исследование были включены 282 пациента в возрасте от 9 мес. до 17 лет, находившихся на лечении в УЗ «3-я городская детская клиническая больница» г. Минска, с диагнозом внебольничной пневмонии (ВП) за период с декабря 2011 г. по декабрь 2012 г. Диагноз устанавливался на основании стандартного клинического, рентгенологического, лабораторного обследования. Все пациенты, включенные в исследование, были разделены на 2 группы: пациенты со среднетяжелой клинической картиной течения заболевания (медиана возраста составила 6,0 лет (25–75 процентили 3,0–11,0 лет)) и пациенты с тяжелой клинической картиной (медиана возраста составила 4,0 лет (25–75 процентили 2,0–8,5 лет)). Тяжелое течение заболевания отмечалось у 44 (15,6%) пациентов, среднетяжелое течение — у 238 (84,4%) человек. Достоверность различий между 2 группами оценивалась с использованием критерия хи-квадрат ($\chi 2$) для категориальных переменных и критерия Манна–Уитни (U) для количественных переменных. Различия между обеими группами были статистически значимыми ($p = 0,01$).

Для оценки факторов, оказывающих существенное влияние на тяжесть течения пневмонии, в 2 группах были проанализированы 12 параметров: возраст, пол, наличие физической активности, отсутствие грудного вскармливания, посещение организованного коллектива, количество членов семьи (скученность), количество детей в семье, вредные привычки родителей, наличие различных ви-

дов аллергии (в т. ч. бронхиальной астмы), наличие различных сопутствующих заболеваний, индекс массы тела, перенесенные острые респираторные инфекционные заболевания (ОРИ) за месяц до госпитализации, наличие вакцинации в отношении гриппа и пневмококковой инфекции. Переменные, по которым были установлены достоверные различия, были подвергнуты процедуре логистической регрессии (LR) для выявления факторов риска.

Обработка данных и анализ результатов исследования были проведены с использованием программы IBM SPSS Statistics 19.0 (StatSoft®, США) и Statistica 6.0 (StatSoft®, США). Для оценки нормальности распределения признака использовался метод Шапиро–Уилка (W). Статистически достоверными признавались результаты при значении $p<0,05$ и мощности критерия (Мк), превышающей 80%.

Результаты и их обсуждение. В ходе последовательного анализа 12 параметров для определения возможности их влияния на тяжесть течения клинической картины внебольничной пневмонии было установлено, что несмотря на ряд публикаций о предикторной роли пола в развитии неблагоприятного исхода пневмонии, в нашем исследовании подобная закономерность установлена не была ($p = 0,410$). Отсутствовало влияние на тяжесть клинической картины внебольничной пневмонии еще у 6 параметров: физическая активность (занятие в спортивной секции, $p = 0,154$), количество членов семьи (скученность, $p = 0,108$), количество детей ($p = 0,884$), вредные привычки родителей ($p = 0,808$), наличие сопутствующего заболевания ($p = 0,104$), индекс массы тела ($p = 0,163$).

При анализе принадлежности госпитализированных детей к организованному коллективу ($p = 0,015$) было установлено, что основная масса детей посещала разные организованные коллективы (89,7%), в то время как 10,3% пациентов являлись неорганизованными.

Изучение индекса массы тела в двух группах не выявило влияния нарушения этого показателя (избыток или недостаток массы тела) на тяжесть течения внебольничной пневмонии ($p = 0,163$). Нарушения веса наблюдались у 34,2% пациентов с тяжелой ВП и у 26,8% пациентов со среднетяжелой ВП.

При анализе наличия грудного вскармливания в 2 группах было установлено, что среди детей со среднетяжелым течением пневмонии грудное вскармливание получали 87,6%, с тяжелым течением — 71,4% ($p = 0,049$).

Нами было рассмотрено наличие аллергий разного генеза как возможного фактора, оказывающего влияние на тяжесть течения основного заболевания ($p = 0,041$).

При изучении перенесенных заболеваний за месяц до развития пневмонии удалось установить, что среди детей с тяжелым течением ВП у 36,4% отмечалось наличие острых респираторных инфекций, а среди со среднетяжелой клиникой основного заболевания — у 18,1% ($p = 0,006$).

Значимым фактором являлся возраст пациентов, включенных в исследование ($p = 0,08$).

При рассмотрении прививочного статуса пациентов из обеих групп в отношении гриппа и пневмококковой инфекции было установлено, что в 2 группах дети не подвергались иммунизации.

Процедуре логистической регрессии были подвергнуты 2 значимых фактора: возраст и перенесенные за месяц до развития внебольничной пневмонии ОРИ. Так, с каждым годом жизни ребенка риск тяжелого течения пневмонии среди госпитализированных пациентов снижался на 11,7% (LR = 0,883; 95% CI 0,803–0,971; $p = 0,011$). Перенесенные за месяц до возникновения ВП острые респираторные инфекции в 2,4 раза увеличивали риск развития в дальнейшем тяжелой клинической картины пневмонии (LR = 2,4; 95% CI 1,1–5,05; $p = 0,027$).

В соответствии с данными большого количества исследований можно утверждать, что в различных странах на тяжесть течения пневмонии оказывают влияние разные факторы, что с высокой степенью вероятности связано с возрастом, особенностями образа жизни, характером питания, условиями проживания, состоянием макроорганизма (наличием сопутствующих заболеваний), доступностью медицинской помощи в той или иной стране. Так, по результатам одного мета-анализа было выделено 7 статистически значимых факторов, влияющих на тяжесть течения пневмонии: низкий вес при рождении, отсутствие грудного вскармливания, скученность проживания (более 7 человек), неполная иммунизация, мальнутриция, ВИЧ-инфекция, загрязнение воздуха внутри помещения [6]. По данным исследования, проведенного в Непале, выявлена зависимость между наличием сопутствующей респираторно-синцитиальной инфекции и тяжелой клинической картиной течения пневмонии, кроме того, данный факт увеличивал период выздоровления, риск неудач при проведении терапии [7]. Скученность (более 4 детей в семье), наличие у родителей базового образования,

средний уровень дохода семьи, применение неадекватной терапии на догоспитальном этапе были факторами риска тяжелой пневмонии среди детей в Танзании [8]. Отсутствие грудного вскармливания как фактор риска тяжелой пневмонии подтвержден многими авторами. Так, K. Tiewsoh et al. установили, что отсутствие грудного вскармливания, скученность проживания приводили к развитию тяжелой пневмонии [9]. Согласно данным индийских исследователей, высокий риск возникновения и тяжелого течения пневмонии среди детей младшего возраста связан с имеющимися мальнутрицией, гиповитаминозом А, низким весом при рождении, отсутствием грудного вскармливания, наличием тяжелых инфекций дыхательных путей в анамнезе, неэффективностью предшествующей терапии [10].

Заключение. Таким образом, необходимо отметить, что улучшение исходов внебольничной пневмонии напрямую связано с оценкой тяжести ее течения и своевременным началом терапевтических мероприятий. В результате настоящего исследования выделены факторы риска тяжелого течения внебольничной пневмонии среди детской популяции г. Минска, к которым относятся возраст и перенесенные до возникновения пневмонии ОРИ. Использование полученных данных позволяет прогнозировать тяжесть течения внебольничной пневмонии, необходимость и место госпитализации, а также необходимость проведения иммунопрофилактики в отношении гриппа и пневмококковой инфекции особенно среди детей до 5 лет.

Литература

1. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries [Electronic resource] / I. Rudan [et al.] // J. Glob. Health. — 2013. —Vol. 3, № 1. — doi: 10.7189/jogh.03.010401. — Mode of access: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3700032/pdf/jogh-03-010401.pdf. — Date of access: 09.09.2014.

2. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011 [Electronic resource] / M. Harris [et al.] // Thorax. — 2011. — Vol. 66, suppl. 2. — ii1-23. — doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-200598. — Mode of access: http://thorax.bmj.com/content/66/Suppl_2/ii1.full.pdf+html. — Date of access: 09.09.2014.

3. Chahine, E.B. Update on the treatment and prevention of community-acquired pneumonia in children / E.B. Chahine, M.S. Mayberry // US Pharmacist. — 2012. — Vol. 37, № 3. — Hs-12-hs-15.

4. Remington, L.T. Community-acquired pneumonia / L.T. Remington, W.I. Sligl // Curr. Opin. Pulm. Med. — 2014. — Vol. 20, № 3. — P. 215–224.

5. Sligl, W.I. Severe community-acquired pneumonia / W.I. Sligl, T.J. Marrie // Crit. Care Clinics. — 2013. — Vol. 29, № 3. — P. 563–601.

6. Risk factors for severe acute lower respiratory infections in children: a systematic review and meta-analysis / S. Jackson [et al.] // Croat. Med. J. — 2013. — Vol. 54, № 2. — P. 110–121.

7. Clinical presentation and severity of viral community-acquired pneumonia in young Nepalese children / M. Mathisen [et al.] // Pediatr. Infect. Dis. J. — 2010. — Vol. 29, № 1. — E1–6.

8. Kahabuka, C. Factors associated with severe disease from malaria, pneumonia and diarrhea among children in rural Tanzania — a hospital-based cross-sectional study [Electronic resource] / C. Kahabuka, G. Kvåle, S. G. Hinderaker // BMC Infect. Dis. — 2012. – Vol. 12. — doi: 10.1186/1471-2334-12-219. — Mode of access: http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2334-12-219.pdf. — Date of access: 09.09.2014.

9. Factors determining the outcome of children hospitalized with severe pneumonia [Electronic resource] / K. Tiewsoh [et al.] // BMC Pediatrics. — 2009. — Vol. 9. — doi:10.1186/1471-2431-9-15. — Mode of access: http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2431-9-15.pdf. — Date of access: 09.09.2014.

10. Acute respiratory infection and pneumonia in India: a systematic review of literature for advocacy and action: UNICEF-PHFI series on newborn and child health, India / J.L. Mathew [et al.] // Indian Pediatr. — 2011. — Vol. 48, № 3. — P. 191–218.

SEVERE COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA: CAUSES, RISK FACTORS, AND PROPHYLAXIS

Gorbich O.A., Chistenko G.N.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Twelve parameters associated with the clinical picture severity of the community-acquired pneumonia in children were evaluated in the present work. Significant risk factors for severe course of community-acquired pneumonia in children admitted to the Minsk multidisciplinary hospital were established.

Keywords: community-acquired pneumonia, risk factors, children.

Поступила 09.09.2014

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНОГО СИНУСИТА, АССОЦИИРОВАННОГО С АДЕНОВИРУСОМ

Долина И.В.[1], Орлова С.В.[2]

[1]Белорусский государственный медицинский университет, Минск;

[2]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Обследованы две группы пациентов: основная (вирусный синусит) и группа сравнения (бактериальный синусит). В основную группу вошли пациенты с длительным течением заболевания, с наличием слизистых, слизисто-гнойных выделений из носа, безуспешно получавшие антибиотикотерапию. В группу сравнения вошли пациенты с наличием гнойных выделений из полости носа, получавшие антибиотикотерапию. С использованием маркеров аденовирусной инфекции установлено, что длительное сохранение клинических проявлений в виде гиперемии и отечности слизистой оболочки полости носа и безуспешность антибиотикотерапии являются клиническими особенностями острого аденовирусассоциированного синусита.

Ключевые слова: синусит, клинические проявления, аденовирус.

Введение. В последние десятилетия заболеваемость синуситами возросла почти в 5 раз, при этом наблюдается отчетливая тенденция к увеличению частоты рецидивирующих и хронических форм. По данным литературы, у пациентов с бактериальным синуситом, находящихся в ЛОР-отделении, существенно преобладают грамположительные микроорганизмы (49,1%), преимущественно *Staphylococcus aureus* (23,5%) и *Staphylococcus epidermidis* (13,7%). Среди пациентов с бактериальным синуситом, находящихся в ОРИТ и отделениях другого профиля, преобладает граммнегативная флора (61,5 и 52,4% соответственно), преимущественно *Pseudomonas aeruginosa* (24,7%). При раннем нозокомиальном синусите выделяются ассоциации микроорганизмов, а при позднем, как правило, один возбудитель. Характер течения синусита определяется биологическими свойствами возбудителя. По данным литературы наиболее тяжелое течение наблюдается на фоне ассоциации микроорганизмов с неферментирующими микроорганизмами (*P. aeruginosa*), длительное течение без эффекта от консервативной терапии на фоне *S. aureus*. Гиперпластический процесс характерен для ассоциации *S. aureus* и грибов рода *Candida*. Наиболее выраженные деструктивные изменения слизистой оболочки, зачастую некротического характера, наблюдаются при ассоциации *S. aureus* и анаэробов, стертая клиническая картина (отсутствии выраженного болевого и интоксикационного синдрома) — при ассоциации с бактериальной флорой [1, 2].

Роль респираторных вирусов состоит в увеличении антигенной нагрузки на слизистую оболочку верхних дыхательных путей (ВДП), что проявляется рецидивирующим характером течения заболеваний и приводит к хронизации воспалительных процессов. Вирусы, попадая на поверхность дыхательного эпителия, при определенных условиях вызывают нарушение мукоцилиарной функции слизистых оболочек верхних дыхательных путей, создают благоприятные условия для роста числа колоний условно-патогенной микрофлоры, персистирующей в верхних дыхательных путях [2, 4].

Спектр вирусов, являющихся этиологическими агентами заболеваний ВДП, достаточно широк, наиболее распространен аденовирус, который впервые был выделен из тканей миндалин и аденоидов (1953 г.). В настоящее время известно более 90 типов аденовирусов, из которых 28 патогенны для человека. Чаще всего у детей ОРЗ вызывают серотипы 1–3, 5, 6, у взрослых — 4 и 7. Серотипы аденовирусов 1, 2, 5, 6 способны сохраняться в латентном состоянии и длительное время персистировать в организме, наиболее тяжелое течение наблюдается при ко-инфекции. Респираторно-синцитиальный вирус и вирусы парагриппа также могут быть возбудителями инфекции. Вирусы осаждаются на эпителии клеток носа и гортани и проникают внутрь эпителиальных клеток, полностью разрушая клетки эпителия. В процессе прогрессирования заболевания ослабевают механизмы местной и общей иммунной защиты. Это создает благоприятные условия для активации собственной условно-патогенной флоры и инфицирования бактериальной флорой из окружающей среды. Как осложнения могут возникать синуситы, отиты, ангины. Такой широкий спектр вирусов, участвующих в развитии рецидивирующих и хронических форм заболеваний ВДП, обуславливает проведение дифференцированной вирусологической диагностики для выбора адекватной терапии и составление прогноза заболевания [3–5].

Вирусные заболевания при лор-патологии встречаются довольно часто, но редко или вообще не диагностируются. Таким образом, этиологическая роль вирусов при воспалительных заболеваний лор-органов не учитывается. В литературе мы не встретили описание особенностей клинического течения воспаления околоносовых пазух вирусной этиологии. Такая ситуация формирует неправильное представление о характере патологии и влечет за собой нерациональную терапию.

Цель работы — анализ особенностей течения острого верхнечелюстного синусита, ассоциированного с аденовирусом.

Задачи исследования:

- дать сравнительную характеристику течения острого бактериального верхнечелюстного синусита и ассоциированного с аденовирусом;
- определить уровень гуморальных антител класса M и G к аденовирусу у пациентов с длительным течением острого синусита.

Материалы и методы. Исследуемые пациенты были разделены на группы, в зависимости от клинических проявлений. Обследовано 18 пациентов с диагнозом «острый верхнечелюстной синусит» — основная группа (вирусный синусит) и 10 пациентов группы сравнения (бактериальный синусит). В основную группу вошли пациенты с длительным течением острого синусита, с наличием слизистых, слизисто-гнойных выделений из носа, безуспешно амбулаторно получавшие антибиотикотерапию. В группу сравнения вошли пациенты с наличием гнойных выделений из полости носа получавшие антибиотикотерапию.

Средний возраст пациентов основной группы — 35,4±10,59 года, пациентов группы сравнения — 29,4±8,73 года.

Критериями включения были: возраст 18–65 лет; клинически, лабораторно и инструментально верифицированный диагноз острого синусита.

Критериями исключения являлись: аномалии развития пазух, наличие анатомических изменений в полости носа, хирургические вмешательства в полости носа, наличие сопутствующих хронических заболеваний, онкологические заболевания, ВИЧ-инфекция.

Постановку ИФА осуществляли коммерческими тест-системами производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Беларусь). Индекс активности (ИА) рассчитывали на основании соотношения значений оптической плотности положительной пробы и отрицательного контроля. Положительным считается результат с ИА выше 2,1.

Постановка полимеразной цепной реакции. Выделение ДНК проводили в соответствии с инструкцией по применению комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс, РФ). При постановке ПЦР использовали стандартную реакционную смесь (0,5 ед Taq-polymerase, 1,5 mM $MgCl_2$,
100 мкмоль dNTP, 5 мкл ДНК, буфер и праймеры) с определенными вариациями в концентрациях солей буфера и праймеров. Реакцию выполняли в следующих условиях: после начальной денатурации ДНК (3 мин при 94°C) проводили 35 циклов с разной температурой и временными показателями амплификации. В последнем цикле амплификации элонгацию проводили в течение 5 мин.
В качестве контроля использовали набор «АмплиСенс Adenovirus-Eph» и смесь ПЦР-2-blue (АмплиСенс, РФ) [5].

Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере, pH 8,5 (0,04M трис-ацетат, 0,002M ЭДТА) с добавлением бромистого этидия (Invitrogen, Бельгия).

Результаты и их обсуждение.

1. Клиническая верификация острого верхнечелюстного синусита.

Клинические проявлений в виде гиперемии слизистой оболочки полости носа отмечались у всех пациентов (100%) основной группы. В группе сравнения отечность слизистой оболочки полости носа наблюдалась у 7 заболевших (70%). У пациентов основной группы в 3 (16,6%) случаях отмечались слизисто-гнойные выделения в полости носа, в остальных 15 (83,4%) случаях — слизистые выделения в среднем носовом ходе. При бактериальном синусите гнойные выделения в полости носа были у всех (100%) пациентов. При пункции у всех пациентах группы контроля был получен гной.

Таблица 1 — Характеристика острого верхнечелюстного синусита, ассоциированного с аденовирусом

Клинические критерии синусита	До антибиотикотерапии		После антибиотикотерапии	
	вирусный синусит, n = 18	бактериальный синусит, n = 10	вирусный синусит, n = 18	бактериальный синусит, n = 10
Возраст, годы	35,4±10,5		29,4±8,7	
Гнойные выделения в среднем носовом ходе, n□%	0/18 (0%)	10/10 (100%)	0/18 (0%)	1/10 (10,0%)
Слизисто-гнойные выделения в среднем носовом ходе, n□%	3/18 (16,6%)	0/10 (0%)	0/18 (0%)	0/10 (0%)
Отсутствие патологических выделений в полости носа, n□%	0/18 (100%)	0/10 (100%)	2/18 (11,1%)	9/10 (90,0%)
Слизистые выделения в среднем носовом ходе, n□%	15/18 (83,4%)	0/10 (0%)	16/18 (88,9%)	0/10 (0%)
Гиперемия слизистой оболочки носа	18/18 (100%)	10/10 (100%)	14/18 (77,7%)	1/10 (10%)
Отечность слизистой оболочки носа	18/18 (100%)	7/10 (70,0%)	12/18 (66,6%)	3/10 (30%)

При поступлении в стационар всем пациентам обеих групп назначалась антибактериальная терапия (цефтриаксон). Одинаковую схему лечения проводили как при слизистых выделениях из носа, т. е. с признаками вирусного синусита, так и при гнойных выделениях в среднем носовом ходе, т. е. с признаками бактериального синусита. В основной группе улучшение состояния после курса лечения наблюдали только у 2 (11,1%) пациентов, а у 16 (88,9%) антибиотикотерапия была безуспешной. Среди пациентов этой группы у 14 (77,7%) длительно сохранялись гиперемия и у 12 (66,6%) отечность слизистой оболочки носа.

Клиническое выздоровление после курса антибактериальной терапии у пациентов группы сравнения отмечали в 100% случаях. Лишь у 3 (30%) пациентов сохранялась отечность слизистой оболочки носа.

2. Маркеры аденовирусной инфекции.

В исследование были включены 18 пациентов с диагнозом «острый верхнечелюстной синусит». Наличие аденовирусной инфекции регистрировали по присутствию вируса в носоглоточных мазках, выявленного детекцией ДНК методом ПЦР. Кроме того, диагностировали аденовирусную инфекцию по определению М-антител, которые указывают на раннее заражение, являясь маркерами острой ранней инфекции. Определение G-антител свидетельствует также о наличии аденовирусной инфекции, но заражение, возможно, произошло раньше.

Таблица 2 — Присутствие маркеров аденовирусной инфекции в исследуемых группах

Маркеры аденовирусной инфекции	Вирусный синусит	Бактериальный синусит, n = 10
Средний возраст, годы	35,4±10,59	29,4±8,73
Антитела IgG, n, %	15 (83,3)	11 (61,1)
Антитела IgM, n, %	7 (38,8)	0
ДНК аденовируса, n, %	16 (88,8)	0 (0)
Длительность пребывания в стационаре (сут)	18–21	12–14

Исследовали уровень антител у пациентов с острым синуситом. Определяли маркеры ранней инфекции и антитела класса G. Присутствие антител класса G выявлено в 83,3% случаев, при вирусном синусите и у 11 пациентов при бактериальном. Положительная тенденция выздоровления после курса антибиотиков у пациентов группы сравнения позволяет считать, что аденовирус не являлся этиологическим фактором синусита, тем более что М-антител не выявлено. Что касается основной

группы, то присутствие M- и G-антител указывает на заражение аденовирусом. У всех пациентов с маркерами ранней инфекции имела место активная форма аденовирусной инфекции. ДНК аденовируса выявлялась в сыворотке крови при синусите вирусной этиологии в 88,8% случаев.

Показано, что при выявлении M-антител сохранялись клинические проявления в виде гиперемии и инфильтрации слизистой оболочки полости носа более длительное время. Длительность нахождения в стационаре этих пациентов составляла 18–21 сут.

Заключение. Предполагаемой особенностью острого верхнечелюстного синусита, ассоциированного с аденовирусной инфекцией, является:

1. Длительное сохранение клинических проявлений в виде гиперемии и отечности слизистой оболочки полости носа.

2. Безуспешность проводимой антибитикотерапии.

Небольшое количество наблюдений выявило разницу в клиническом течении бактериальных и вирусассоциированных синуситов, что требует дальнейшего изучения.

Литература

1. Сакович, А.Р. Острый синусит: анализ проблемных моментов / А.Р. Сакович // Актуальные вопросы оториноларингологии на современном этапе: тез. докл. 7-го съезда оториноларингологов Респ. Беларусь. — Минск, 2013. — С. 149–151.

2. Willet, L.R. Current diagnosis and management of sinusitis / L.R. Willet, J.L. Carson, J.W. Williams // J. Gen. Intern. Med. — 1994. — Vol. 9, № 1. — P. 38–45.

3. Носик, Н.Н. Лабораторная диагностика вирусных инфекций / Н.Н. Носик, В.М. Стаханова // Клинич. микробиол. антимикроб. химиотер. — 2000. — Т. 2, № 2. — С. 32–37.

4. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses / W.Y. Lam [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2007. — Vol. 45, № 11. — P. 3631–3640.

5. PCR analysis of Egyptian respiratory adenovirus isolates, including identification of species, serotypes and coinfections / M. Metzagar [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2005. — Vol. 43, № 11. — P. 5743–5752.

FEATURES OF COURSE OF ACUTE MAXILLARY SINUSITIS ASSOCIATED WITH ADENOVIRUS

Dolina I.V.[1], Orlova S.V.[2]

[1]Belarusian State Medical University Minsk;

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

Two groups of patients: main (viral sinusitis) and control (bacterial sinusitis) were examined. Patients with prolonged disease, with the presence of mucous, mucous-purulent nasal discharge, unsuccessfully treated with antibiotic therapy were included in the main group. Patients with purulent discharge from the nose treated with antibiotic therapy were included in the control group. It was established on the basis of determination of markers adenovirus infection that long-term preservation of clinical manifestations in the form of redness and swelling of the mucous membrane of the nasal cavity and the failure of antibiotic therapy are the clinical features of acute adenoviral sinusitis.

Keywords: sinusitis, clinical manifestations, adenovirus.

Поступила 30.07.2014

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АРМИРОВАННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КАЧЕСТВЕ КОНТРОЛЕЙ ДЛЯ ПЦР-ДЕТЕКЦИИ РНК-ВИРУСОВ

Землянский В.А., Дедюля К.Л., Амвросьева Т.В.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. В статье рассмотрена перспективная технология создания контролей для ПЦР с обратной транскрипцией на основе армированных нуклеиновых кислот — псевдовирусных частиц, содержащих фрагмент исследуемой РНК. Описаны ее преимущества и перспективы развития.

Ключевые слова: армированные нуклеиновые кислоты, РНК-вирусы, контроли, полимеразная цепная реакция.

Введение. В настоящее время полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) является распространенным способом детекции РНК-содержащих вирусов. Метод зарекомендовал себя как быстрый, высокоспецифичный и простой в проведении, благодаря чему он нашел широкое применение в клинических и научных исследованиях. Вместе с тем слабым местом ПЦР является сложность создания устойчивых положительных контролей и стандартных титров для количественных измерений. Контроли на основе живых вирусов потенциально опасны для персонала. Контроли на основе нативной вирусной РНК или искусственно транскрибированной вирусной РНК нестабильны при хранении и транспортировке, т. к. подвержены деградации РНКазами. В условиях широкого и повсеместного присутствия РНКаз в окружающей среде крайне сложно гарантировать отсутствие контаминации, несмотря на использование очищенных (RNase-free) реактивов, посуды и одноразовых перчаток. Контроли на основе комплементарной ДНК стабильнее и могут храниться длительное время. Однако они обеспечивают только контроль циклов амплификации, но не стадии обратной транскрипции. При таком подходе повышается риск получения ложноотрицательных результатов. В связи с этим существует потребность в контролях для ОТ-ПЦР, устойчивых к воздействию РНКаз.

Строение и получение армированных нуклеиновых кислот. Подходящим решением вышеуказанной проблемы является использование армированных нуклеиновых кислот — рекомбинантных генетических конструкций, содержащих участки РНК исследуемых вирусов и способных к упаковке в вирусные капсиды. Белковая оболочка предохраняет их от действия нуклеаз, в то же время она легко удаляется стандартными методами пробоподготовки. Упакованные в белковую оболочку фрагменты вирусных нуклеиновых кислот представляют собой искусственно созданные псевдовирусные частицы. Они могут храниться длительное время и позволяют контролировать все этапы исследования: выделение РНК, обратную транскрипцию и амплификацию.

Часто основой для таких конструкций выступает бактериофаг MS2, инфицирующий *Escherichia coli*. Икосаэдрический капсид MS2 состоит из 180 субъединиц, содержит одну молекулу матуразы и геном в виде одноцепочечной положительной РНК. Сборка капсида инициируется содержащимися в геноме сайтами упаковки, образующими шпилечные структуры. Простейшим способом создания контролей на основе фага является встраивание требуемой последовательности в геном и последующее размножение вируса в бактериальной культуре. Однако такой подход не нашел применения по ряду причин. Во-первых, репликаза бактериофага обладает низкой точностью, и встроенные последовательности быстро повреждаются делециями и точечными мутациями. Кроме того, использование полноценного фага повышает риск контаминации в лабораториях.

Более технологичным оказался метод клонирования генов фага и целевой последовательности в плазмидных векторах с последующей сборкой псевдовирусных частиц. Показано, что РНК может быть упакована в капсид фага, если она содержит специфический сайт упаковки, состоящий из девятнадцати нуклеотидов. Нуклеотидная последовательность, содержащая фрагмент исследуемого вируса, ген капсидного белка и сайт упаковки, клонируется в вектор, содержащий промотор лактозного оперона, и экспрессируется в клетках *Escherichia coli*. В последовательность также включен ген матуразы — белок связывается с РНК и способствует сборке капсида. Образующиеся псевдовирусные частицы не способны вызывать лизис бактериальных клеток и накапливаются в цитоплазме. Полученные нуклеопротеины полностью имитируют вирус в ходе ПЦР-анализа: лизируются и очищаются в ходе пробоподготовки, подвергаются обратной транскрипции и циклической амплификации. Схема экспрессии армированной РНК представлена на рисунке 1 [1].

Увеличение длины упаковываемого фрагмента. Описанный способ позволяет упаковывать фрагменты РНК, содержащие ~1700 пар нуклеотидов генов фага и до 1200 пар исследуемой последовательности, однако наиболее подходящий размер вставки — не более 500 пар [1, 2]. Это препятствует достоверной диагностике некоторых вирусов и затрудняет разработку универсальных контролей для нескольких реакций, что позволило бы удешевить производство. С целью расширения спектра применения методика была усовершенствована. Путем направленного мутагенеза были разработаны более эффективные по сравнению с природными сайты упаковки (рисунок 2) [3].

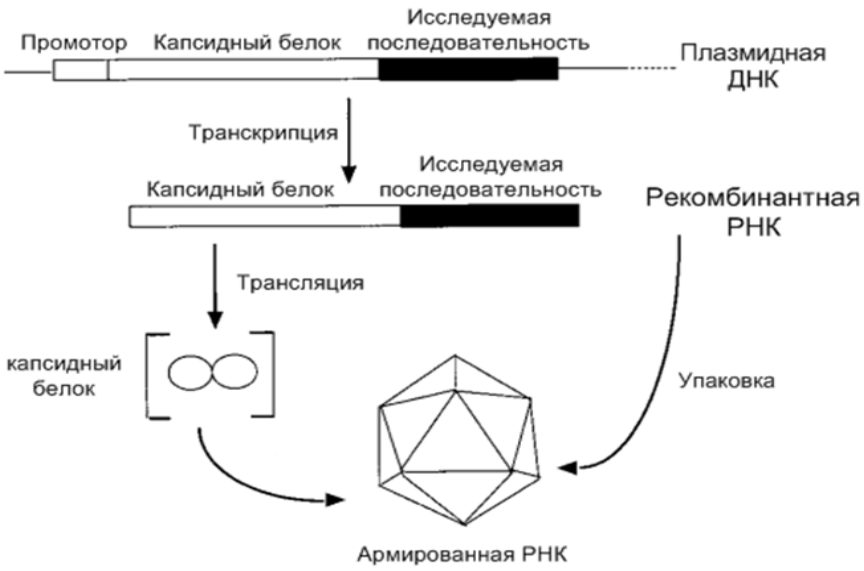


Рисунок 1 — Система упаковки армированной РНК

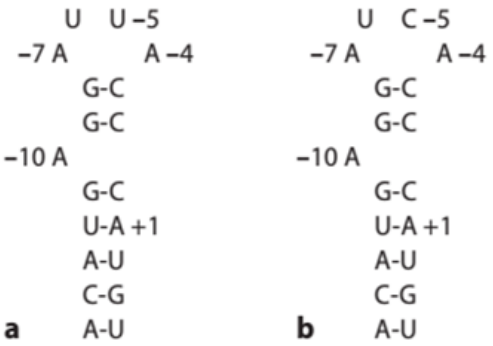


Рисунок 2 — Структура сайтов упаковки: a — сайт дикого типа; b — модифицированный сайт

Установлено также, что эффективность упаковки можно повысить путем включения в последовательность дополнительных ее сайтов [3]. Следующий шаг — разделение экспрессии генов фага и исследуемого фрагмента РНК. При этом РНК фага не содержит сайтов упаковки и не включается в состав нуклеопротеина, а внутри капсида высвобождается дополнительное пространство. Этого можно достичь путем экспрессии в двух различных плазмидах или в одной плазмиде с двумя промоторами. Системы с двойной экспрессией позволяют упаковывать РНК длиной более 3000 пар нуклеотидов. Теоретически возможна упаковка последовательности длиной не менее 3569 пар нуклеотидов, что соответствует длине генома фага MS2. Это открывает возможность создания на основе армированной РНК универсальных контролей для линеек диагностических тест-систем, а также мультиплексных систем на несколько возбудителей или несколько регионов одного возбудителя. Схема двойной экспрессии представлена на рисунке 3 [4].

Совершенствование методов очистки. Другим направлением развития технологии армированных нуклеиновых кислот является совершенствование методов их очистки. Для эффективного использования армированных РНК крайне важно очистить их от остаточной плазмидной ДНК. Первоначально очистка проводилась путем обработки нуклеазами и градиентного ультрацентрифугирования. Более простой и технологичный метод предполагает использование аффинной хроматографии. Показано, что поверхностные участки капсомеров могут быть модифицированы путем вставки в аминокислотную последовательность коротких пептидов без ущерба для сборки капсида. Меченные таким образом армированные РНК легко очищаются на хроматографических колонках с ионами кобальта (рисунок 4).

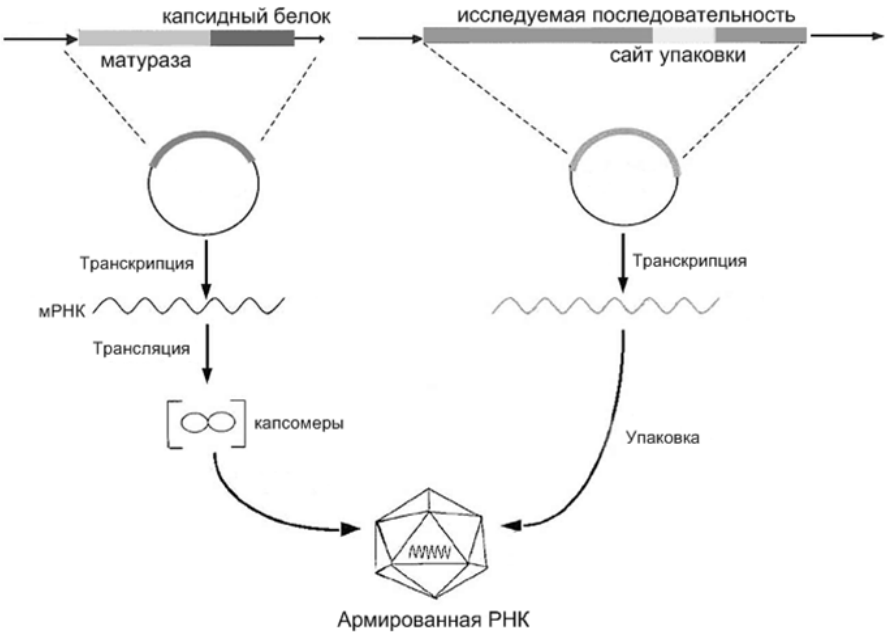


Рисунок 3 — Схема получения армированной РНК путем двойной экспрессии

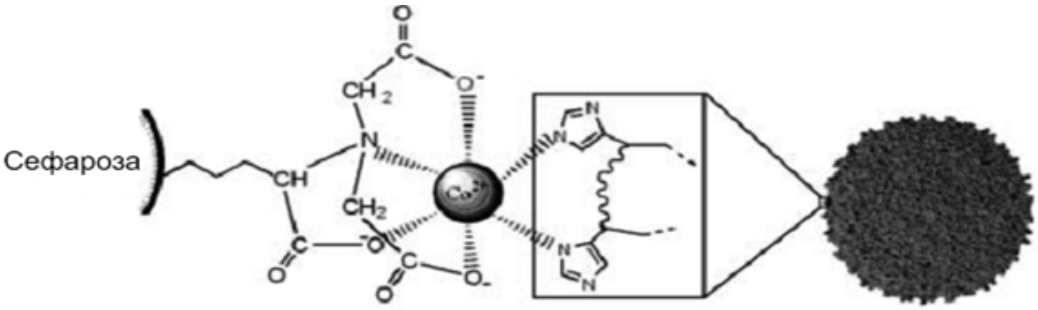


Рисунок 4 — Взаимодействие вирусного капсида с гистидиновыми метками с хроматографической колонкой

По сравнению с ультацентрифугированием такой метод очистки проще и доступнее для широкого круга лабораторий. Для него также показана наилучшая степень очистки (рисунок 5) [5].

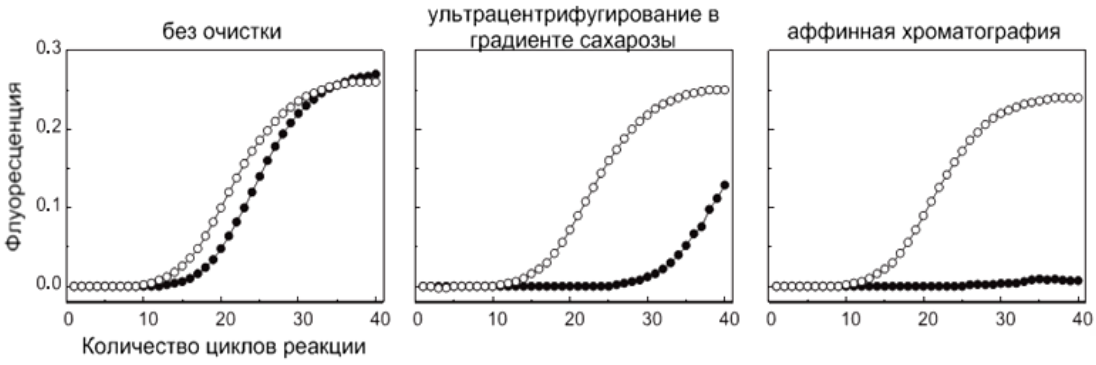


Рисунок 5 — Сравнение методов очистки армированной РНК: белые маркеры — ПЦР с обратной транскрипцией; черные маркеры — обычная ПЦР

Заключение. Технологии армированных нуклеиновых кислот постоянно развиваются и находят широкое практическое применение. Контроли на ее основе просты в производстве и пригодны

для длительного хранения, что делает их привлекательными для коммерческого использования. Они безопасны для обслуживающего персонала и позволяют достоверно проверять все этапы ОТ-ПЦР. В настоящее время успешно созданы такие контроли для диагностических тест-систем в отношении ряда возбудителей вирусных инфекций: ВИЧ [1, 6], вируса гепатита С [1, 7], различных штаммов вирусов гриппа [8, 9], коронавируса [2, 5, 9], вирусов Коксаки и других энтеровирусов [10], а также ряда вирусов животных [11].

Исследования по разработке технологии создания ОТ-ПЦР контролей на основе армированных нуклеиновых кислот сегодня активно проводятся в лаборатории инфекций с природным резервуаром в рамках создания набора универсальных контрольных образцов, предназначенных для оценки качества и эффективности проводимых санитарно-вирусологических исследований питьевой воды.

Литература

1. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards / B.L. Pasloske [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1998. — Vol. 36, № 12. — P. 3590–3594.

2. Preparation of a Chimeric Armored RNA as a Versatile Calibrator for Multiple Virus Assays / Q. Huang [et al.] // Clin. Chem. — 2006. — Vol. 52, № 7. — P. 1446–1448.

3. Construction of armored RNA containing long-size chimeric RNA by increasing the number and affinity of the pac sitein exogenous RNA and sequence coding coat protein of the MS2 bacteriophage / B. Wei [et al.] // Intervirology. — 2008. — Vol. 51. — P. 144–150.

4. Wei, Y. RNase-resistant virus-like particles containing long chimeric RNA sequences produced by two-plasmid coexpression system / Y. Wei // J. Clin. Microbiol. — 2008. — Vol. 46, № 5. — P. 1734–1740.

5. Preparation of His-tagged armored RNA phage particles as a control for real-time reverse transcription-PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus / Y. Cheng [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44, № 10. — P. 3557–3561.

6. Armored long RNA controls or standards for branched DNA assay for detection of human immunodeficiency virus type I / S. Zhan [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2009. — Vol. 47, № 8. — P. 2571–2576.

7. Ribonuclease-resistant RNA controls (armored RNA) for reverse transcription-PCR, branched DNA, and genotyping assays for hepatitis C virus / C.R. WalkerPeach [et al.] // Clin. Chem. — 1999. — Vol. 45, № 12. — P. 2079–2085.

8. Development of an internal positive control for rapid diagnosis of avian influenza virus infections by real-time reverse transcription-PCR with lyophilized reagents / A. Das [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44, № 9. — P. 3065–3073.

9. Preparation of His-tagged armored RNA phage particles as a control for real-time reverse transcription-PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus / X.-F. Yu [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44, № 10. — P. 3557–3561.

10. External quality assessment for enterovirus 71 and coxsackievirus A16 detection by reverse transcription-PCR using armored RNA as a virus surrogate / L. Song [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2011. — Vol. 49, № 10. — P. 3591–3595.

11. Armored RNA as virus surrogate in a real-time reverse transcriptase PCR assay proficiency panel / S.K. Hietala [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44, № 1. — P. 67–70.

USE OF ARMORED NUCLEIC ACIDS AS CONTROLS FOR PCR-DETECTION OF RNA-VIRUSES

Zemlianski V.A., Dziadziulia K.L., Amvrosieva T.V.

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

The widespread use of RT-PCR as effective method of RNA-viruses diagnostic has created a need for stable and relevant controls. Unfortunately, controls based on plasmids and vial viruses have several critical disadvantages. Technology of armored RNA shows ways to avoid this limitations. Armored RNA is a complex of MS2 bacteriophage coat protein and RNA produced in *Escherichia coli* by the induction of an expression plasmid that encodes the coat protein and an RNA control sequence. The RNA sequences are protected from RNase digestion within the pseudoviral complex. These particles can work as a control on every stage of PCR virus detection — lysis, purification, revert transcription and amplification.

Keywords: armored nucleic acids, RNA-viruses, controls, polymerase chain reaction.

Поступила 11.07.2014

ТЕЧЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ И РОДОВ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

Зновец Т.В.[1], Барановская Е.И.[2], Жаворонок С.В.[2]

[1]3-я городская клиническая больница им. Е.В. Клумова, Минск;

[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Реферат. Работа посвящена изучению особенностей течения беременности и родов у женщин с хроническим вирусным гепатитом С. Исследование показывает, что течение беременности на фоне вирусного гепатита часто осложняется угрозой ее прерывания, гестозом, фетоплацентарной недостаточностью, синдромом задержки роста плода, многоводием. Вирусный гепатит С оказывает неблагоприятное влияние на плод и новорожденного, проявляющееся в виде внутриутробной гипоксии, недоношенности.

Ключевые слова: вирусный гепатит С, беременность.

Введение. Вирусный гепатит С (HCV-инфекция) представляет собой одну из важнейших проблем современного здравоохранения в связи с частотой распространения, ростом заболеваемости, высоким риском трансформации в цирроз печени (ЦП) и развития гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Хронический гепатит С (ХГС) формируется у 50–75% инфицированных HCV людей. При этом у каждого пятого из них в течение жизни развивается ЦП, а у каждого двадцатого — ГЦК [1, 2]. Основными факторами риска заражения вирусом гепатита С являются переливание препаратов крови, пересадка органов, гемодиализ, применение наркотиков парентерально, многочисленные сексуальные контакты, наличие полового партнера с гепатитом С, профессиональные контакты с человеческой кровью.

По данным ВОЗ, в мире около 3% населения инфицированы вирусом гепатита С, что в 5–6 раз больше, чем живущих с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). ВОЗ прогнозирует дальнейший рост глобального распространения HCV-инфекции и числа неблагоприятных исходов ХГС в XXI в. Предполагается, что к 2015–2020 гг. число инфицированных HCV в мире удвоится [2, 3]. Считается, что 1–2,5% населения Республики Беларусь инфицированы вирусом гепатита С, из которых 10% имеют манифестные формы инфекции. Рост заболеваемости гепатитом С неизбежно приводит ко все большему вовлечению в эпидемический процесс женщин репродуктивного возраста, в т. ч. беременных.

Проблема вирусных гепатитов у беременных является общей для врачей-акушеров, инфекционистов, гепатологов, терапевтов и нуждается в выработке общей стратегии в отношении ведения беременности у таких женщин. Особое внимание уделяется течению вирусных гепатитов у беременных, т. к. в этот период нагрузка на печень возрастает: повышается белково-синтетическая и детоксикационная функции печени, а значительное увеличение концентрации эстрогенов усиливает воздействие стрессовых факторов на орган [4, 5]. Повышенное образование пластических веществ ведет к накоплению липидов в мембранах клетки, что снижает их проницаемость и уменьшает интенсивность процессов захвата, транспорта и экскреции различных веществ в гепатоците. Согласно рекомендациям ВОЗ и Европейской ассоциации по изучению печени, женщинам с вирусом гепатита С беременность не противопоказана, поскольку не оказывает отрицательного влияния на течение хронических вирусных гепатитов, не достигших стадии цирроза [4–6]. Исследованиями гепатологов установлено, что вирусный гепатит С и беременность оказывают взаимно отягощающее влияние, проявлениями которого являются высокий процент невынашивания, преждевременные роды, самопроизвольные выкидыши, кровотечения в раннем и позднем послеродовом периодах. Кроме того, создается угроза инфицирования ребенка данными вирусами с развитием вялотекущих форм хронического вирусного гепатита [7].

Цель работы — изучение особенностей течения беременности и родов у женщин с хроническим вирусным гепатитом С.

Материалы и методы. Обследовано 26 беременных, больных хроническим вирусным гепатитом С, на базе УЗ «3-я городская клиническая больница им. Е.В. Клумова» г. Минска. Диагноз вирусного гепатита устанавливался по совокупности клинико-эпидемиологических и лабораторных данных. Изучены анамнестические данные: особенности преморбидного фона, перенесенные опе-

ративные вмешательства, травмы. Особое внимание уделялось анализу репродуктивной функции пациенток, в т. ч. течению и исходу предыдущих беременностей, осложнениям абортов, родов и послеродового периода, состоянию новорожденных. Клинические исследования проводились по специально разработанной схеме, которая включала изучение общего и акушерского статуса и проведение комплекса клинико-лабораторных обследований. Всем беременным проведено УЗИ органов брюшной полости. Для оценки состояния фетоплацентарного комплекса и внутриутробного развития плода в динамике беременности проводили ультразвуковое исследование и кардиомониторное наблюдение. Статистическая обработка данных проведена с использованием пакета Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение. Средний возраст пациенток составил 30,12±4,41 года. Высшее образование имели 38,5% обследованных, среднее специальное — 42,3%, среднее — 19,2%; временно не работали или не имели определенной занятости — 15,4%, выполняли работу, не соответствующую полученному образованию, — 3,8%. В первичном браке состояли и проживали с семьей 69,23% обследованных, 19,23% — в повторном браке, 11,54% были не замужем.

Среди обследованных возраст менархе составил 13±1,3 года. Регулярные менструации установились сразу у 73,1% пациенток. Отклонения в становлении менструального цикла были зарегистрированы у 15,38%; из них регулярные менструации установились в течение 2–3 лет у 11,53% пациенток, в течение 4 лет — у 3,85%. Продолжительность менструального цикла составила 29,15±1,99 дня, продолжительность менструации — 5,05±0,41 дня. Умеренные менструальные выделения отмечали 70% женщин, скудные — 6%, обильные менструации выявлены у 24% женщин. Дисменорея выявлена у 46% обследованных. Средний возраст начала половой жизни составлял 17±1,9 года. Методами физиологической контрацепции пользовались 11,54% обследованных, барьерными — 50% женщин, гормональной — 15,38%, внутриматочной — 3,85% женщин, не предохранялись — 19,23%.

Первобеременными были 5 (19,23%) женщин, срочные роды в анамнезе имели 16 (61,54%) пациенток, из них одни роды зарегистрированы у 13 (50%) обследованных и двое родов — у 3 (11,54%). Медицинские аборты в анамнезе отмечены у30,78% женщин, у 3,84% случились самопроизвольные выкидыши, у 7,69% диагностировали неразвивающуюся беременность. Более 2 искусственных прерываний беременности зарегистрировано у 23% пациенток. Гинекологическая патология была выявлена у 38,46% обследованных: псевдоэрозия шейки матки зарегистрирована у 26,92% пациенток, кондиломатоз промежности — у 3,85%, рубцовая деформация шейки матки — у 3,85%, уреа- и микоплазмоз — у 3,85%. В анамнезе 15,38% женщин имели диатермокоагуляцию по поводу эрозии шейки матки, в 7,69% случаев отмечено нарушение менструального цикла, в 3,85% — острый бартолинит, в 3,85% — эндометриоидные кисты и в 3,85% — дисплазия шейки матки I степени. Инфекции, передающиеся половым путем, в анамнезе отмечают 13 (50%) пациенток: трихомониаз — 1 (3,85%) женщина, сифилис — 2 (7,69%), хламидиоз — 2 (7,69%), уреаплазмоз — 5 (19,23%), микоплазмоз — 2 (7,69%), гарднереллез — 1 (3,85%). Две (7,69%) пациентки с ХГС имели ВИЧ-инфекцию (I и III стадии), 1 (3,85%) — хронический вирусный гепатит В. Женщины с хроническим вирусным гепатитом С страдали бесплодием в 19,23% случаев.

Анализ вероятных путей заражения обследованных женщин показал, что у большинства беременных с ХВГС источник заражения так и остался неизвестным (73%). Обращает на себя внимание тот факт, что многие пациентки не имели в анамнезе существенных парентеральных вмешательств, которые могли бы привести к заражению ВГС. Употребление наркотиков признавало лишь 7,69% обследованных. Половой путь заражения ВГС удалось проследить у 7,69% пациенток. Переливание препаратов крови в анамнезе зарегистрировано у 7,69% обследованных. Одна пациентка связывала заболевание с профессиональными контактами (работала медсестрой). У большинства пациенток (76,9%) партнеры были анти-HCV-отрицательными, у 19,23% женщин статус по ВГС был неизвестен и только у 3,85% партнер страдал ХГС. Оценить сроки заражения ВГС представлялось затруднительным, т. к. у подавляющего большинства пациенток острая форма заболевания протекала стерто. У 38,46% женщин антитела к ВГС были выявлены впервые при постановке на учет и подтверждались в дальнейших исследованиях, у 19,23% пациенток диагноз ХГС был поставлен при предыдущих беременностях. Комбинированную противовирусную терапию до наступления настоящей беременности получали 11,54% женщин.

Курение до беременности отметили 8 (30,77%) женщин, во время беременности — 1 (3,85%), до беременности злоупотребляла алкоголем 1 (3,85%) пациентка и употребляли наркотики — 2 (7,69%).

Экстрагенитальная патология была выявлена у 84,6% пациенток. Среди экстрагенитальных заболеваний первое место занимали заболевания сердечно-сосудистой системы — 46,15% (артериальная гипертензия, вегето-сосудистая дистония, пролапс митрального клапана, варикозная болезнь), второе место (30,77%) — патологии желудочно-кишечного тракта (среди них были отмечены хронический гастродуоденит, дискинезия желчевыводящих путей, хронический панкреатит, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, грыжа пищеводного отверстия диафрагмы), третье место (15,38%) — эндокринная патология (аутоиммунный тиреоидит, диффузный токсический зоб, гипоплазия щитовидной железы). Хронический тонзиллит выявлен у 11,53% обследованных, хронический бронхит — у 3,85%, хронический пиелонефрит — у 3,85%.

На диспансерный учет в связи с беременностью в сроке до 12 недель взяты 25 женщин (96,15%). При анализе течения беременности в I и II триместрах наиболее часто встречалась угроза прерывания беременности (19,23 и 19,23% соответственно). У 3,85% пациенток диагностирована угроза преждевременных родов в сочетании с истмико-цервикальной недостаточностью. В III триместре гестоз встречался у 34,61% пациенток, угрожающие преждевременные роды — у 15,38%, фетоплацентарная недостаточность и синдром задержки роста плода — у 7,69%, многоводие — у 11,54%, маловодие — у 3,85%. С одинаковой частотой (3,85%) в III триместре наблюдались гестационный сахарный диабет, гиперкоагуляционный синдром и обострение хронического пиелонефрита. Анемия легкой степени во время беременности зарегистрирована у 19,23% пациенток (среднее значение гемоглобина 101,67±5,58 г/л), средней степени — у 3,85%. В акушерский стационар за время беременности госпитализировались 61,53% пациенток, причем 2 и более раза — 23,07% беременных. Среди основных показаний для госпитализации были угроза прерывания беременности, гестоз, фетоплацентарная недостаточность и синдром задержки роста плода, многоводие, обострение хронического пиелонефрита. Беременные с ХГС отличались высокой частотой неспецифического вагинита (46,15%) на протяжении всего срока гестации.

У обследованных нами беременных такие проявления гепатита, как ощущения тяжести и боли в правом подреберье, желтуха и тошнота беспокоили редко. Иногда отмечались немотивированная слабость и снижение аппетита. Кожный зуд зарегистрирован у 23% обследованных. Из объективной симптоматики у 15,38% пациенток имела место гепатомегалия, у 7,69% она сочеталась со спленомегалией. У 61,54% беременных с ХГС отмечалось повышенное содержание щелочной фосфатазы (514,47±63,23 ЕД/л), у 30,77% — повышение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) (232,22±45,4 ЕД/л), у 7,69% — повышение содержания билирубина (19,08±3,09 мкмоль/л), у 30,77% — повышенная активность аспартатаминотрансферазы (АСТ) (298,3±43,6 мкмоль/л). Снижение содержания сывороточного железа зарегистрировано у 34,61% пациенток (7,14±0,97 мкмоль/л), повышенное содержание — у 7,69% (35±5,68 мкмоль/л). У большинства пациенток (88,46%) была выявлена гипопротеинемия (общий белок 57,78±1,69 г/л).

Беременность завершилась своевременными родами у 88,46% женщин, преждевременными — у 3,85%, запоздалыми — у 7,69%. Преждевременное излитие околоплодных вод наблюдалось в 15,38% случаев. Родоразрешены через естественные родовые пути 66,67% пациенток, в 28,57% случаев произведено плановое кесарево сечение. Одни роды закончились вакуум-экстракцией плода по поводу начавшейся острой гипоксии плода в родах. Плановое кесарево сечение в 50% случаев было выполнено по поводу оперированной матки и неготовности родовых путей, в 33,33% — у женщин с ВИЧ-инфекцией и ХГС для снижения риска инфицирования плода, в 16,66% — по поводу хронической гипоксии плода, не поддающейся медикаментозной коррекции.

У 28,57% рожениц роды протекали без травм мягких тканей родовых путей. Разрыв промежности в родах произошел у 28,57% женщин, вульвы — у 21,43%, влагалища — у 14,28%, шейки матки — у 21,43%. Средняя длительность безводного промежутка при естественных родах составила 165±47 мин. Послеродовый период протекал с клиникой эндометрита у 14,28% пациенток.

Масса новорожденных варьировала от 2000 до 2499 г у 5,55%, от 2500 до 2999 г — у 11,11%, от 3000 до 3499 г — у 22,22%, от 3500 до 3999 г — у 38,9% и более 4000 г — у 22,22% пациенток. Длина тела при рождении составила 53,3±1,7 см. Оценка новорожденных по шкале Апгар на 1-й мин составила 6 баллов у 7,69% детей и 8 баллов у 92,31%, на 5-й мин — 8 баллов у 11,53% и 9 баллов у 88,47% детей. Основными осложнениями раннего неонатального периода у новорожденных являлась перинатальная гипоксия — 11,53%, незрелость — 7,69%, неонатальная желтуха — 7,69%.

У 1 ребенка выявлена внутриутробная пневмония. Выписаны домой в удовлетворительном состоянии 84,62% детей, переведены на второй этап выхаживания — 15,38%.

Выводы:

1. Средний возраст беременных с ХВГС составил 30,12±4,41 года. Путь заражения ВГС чаще всего оставался неизвестным (73%). Основную долю в социально-профессиональной структуре составили работающие женщины со средним специальным образованием. Из вредных привычек беременных обращает на себя внимание большая доля курящих до наступления беременности. У 30,78% женщин в анамнезе зарегистрированы медицинские аборты. У 38,46% обследованных была выявлена гинекологическая патология, среди которой ведущее место занимала псевдоэрозия шейки матки.

2. Из экстрагенитальных заболеваний первое место занимали заболевания сердечно-сосудистой системы (артериальная гипертензия, вегето-сосудистая дистония, пролапс митрального клапана, варикозная болезнь).

3. Беременность в подавляющем большинстве случаев не приводила к клинически выраженным обострениям ГС. При лабораторном обследовании повышение содержания щелочной фосфатазы отмечалось у 61,54% беременных, повышение активности АЛТ — у 30,77%, повышение содержания билирубина — у 7,69%, повышенная активность АСТ — у 30,77%.

4. Наличие у беременной ХВГС неблагоприятно влияет на течение и исход беременности, что проявляется высоким риском развития таких осложнений, как угроза прерывания беременности, гестозы, фетоплацентарная недостаточность, синдром задержки роста плода, многоводие.

5. К основным видам осложнений течения родов следует относить преждевременное излитие околоплодных вод.

6. Вирусный гепатит С оказывает неблагоприятное влияние на плод и новорожденного, проявляющееся в виде внутриутробной гипоксии, недоношенности.

Литература

1 Шахгильдян, И.В. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика) / И.В. Шахгильдян, М.И. Михайлов, Г.Г. Онищенко. — М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2003. — 384 с.

2. Lavanchy, D. The global burden of hepatitis C / D. Lavanchy // Liver Int. — 2009. — Vol. 29, suppl. 1. — P. 74–81.

3. HCV-related burden of disease in Europe: a systematic assessment of incidence, prevalence, morbidity, and mortality / N. Mühlberger [et al.] // BMC Public Health [Electronic resource]. — 2009. — Vol. 9. — P. 34. — Mode of access: http://www.biomedcentral.com/1471-2458/9/34. — Date of access: 02.05.2013.

4. Игнатова, Т.М. Хронический гепатит С и беременность / Т.М. Игнатова // Клинич. гепатология. — 2008. — № 1. — С. 3–9.

5. Кузьмин, В.Н. Вирусные гепатиты у беременных: клиническая картина и лечение / Т.М. Игнатова // Справочник поликлинического врача. — 2010. — № 6. — С. 43–45.

6. Ковалева, Т.А. Тактика ведения беременных женщин с хроническими вирусными гепатитами В и С / Т.А. Ковалева, К.И. Чуйкова, Е.Д. Евтушенко // Лечение и профилактика. — 2012. — № 1. — С. 31–38.

7. Мукомолов, С.Л. Вирусный гепатит С. Клинико-эпидемиологическая и лабораторная характеристика: автореф. дис. ... д-ра мед.наук / С.Л. Мукомолов. — СПб., 2010. — 35 с.

8. Характер течения беременности и родов у больных хроническим вирусным гепатитом С в зависимости от состояния внешней среды: пособие для врачей / Т.В. Сологуб [и др.]. — СПб., 2003. — 38 с.

9. Prevalence and risk factors for hepatitis C virus among pregnant women / A. Kumar [et al.] // Indian J. Med. Res. — 2007. — Vol. 126. — P. 211–215.

10. Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15, 250 pregnant women / D. Conte [et al.] // Hepatology. — 2000. — Vol. 31. — P. 751–755.

PREGNANCY AND DELIVERY IN WOMEN WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS C

Znovets T.V.[1], Baranovskaya E.I.[2], Zhavoronok S.V.[2]

[1]3rd Municipal E.V. Klumov Clinical Hospital, Minsk;

[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The work is devoted to studying peculiarities of pregnancy and childbirth in women with chronic hepatitis C. The conducted research convincingly proves that the course of pregnancy in women with chronic virus hepatitis has often become complicated by threat of miscarriage, preeclampsia, placental

insufficiency, fetal growth retardation syndrome, polyhydramnios. Viral hepatitis C has an adverse effect on the fetus and newborn, which manifests itself in the form of intrauterine hypoxia, prematurity.

Keywords: chronic hepatitis C, pregnancy.

Поступила 11.06.2014

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ФАКТОРЫ РИСКА ИНФЕКЦИИ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА

Калачик О.В., Нарбин А.В., Вершинин П.Ю., Губерская М.П., Козлова М.В., Смолякова М.В., Садовский Д.Н.

9-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь

Реферат. В статье проанализированы факторы риска развития инфекционных осложнений после трансплантации почки. Изучен ряд параметров донора и реципиента, факторы, связанные с анатомией почечного трансплантата, методиками операции по пересадке почки, а также влияние функции и базовой иммуносупрессивной терапии на развитие инфекционных осложнений со стороны трансплантата почки и мочевых путей.

Ключевые слова: трансплантация почки, инфекция мочевых путей.

Введение. Трансплантация почки является основным методом почечно-заместительной терапии терминальной стадии хронической почечной недостаточности [1]. За последние годы отмечается устойчивая тенденция по увеличению числа пересадок почки. Задачей этого этапа развития трансплантологии в Республике Беларусь является улучшение качества лечения пациентов путем оптимизации их реабилитации и снижения частоты основных осложнений трансплантации почки.

Инфекционные осложнения играют ведущую роль в послеоперационной заболеваемости и летальности реципиентов почки [2–4]. Септические состояния встречаются в 42 раза чаще после трансплантации почки, чем в общей популяции [5]. При этом инфекция мочевых путей (ИМП) является основным источником бактериемии и сепсиса у реципиентов почки [6].

ИМП часто носит рецидивирующий характер, может способствовать отторжению трансплантата, острому или хроническому снижению его функции и с трудом поддается эффективному лечению [4, 7].

В связи с этим основное внимание в борьбе с ИМП после трансплантации почки необходимо уделять первичной профилактике инфицирования трансплантата почки и мочевых путей реципиента. С этой целью необходим поиск и изучение факторов риска ИМП. По существующим литературным данным, доказанную клиническую и статистическую значимость развития ИМП имеют женский пол реципиента, использование почечных стентов и длительной катетеризации мочевого пузыря у реципиентов почки [8, 9].

Однако не изучены другие факторы, связанные с донором, реципиентом, анатомией самого трансплантата, а также с техникой операции и послеоперационными факторами.

Цель работы — выявление групп пациентов с инфекцией мочевых путей и бессимптомной бактериурией среди реципиентов почечного аллографта, установление распространенности этой патологии и выявление новых статистически и клинически важных факторов риска ИМП.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ учетных форм № 4-пп/у-07 «Карта динамического наблюдения больного после пересадки почки», утвержденных приказом Минздрава № 883 от 19.11.2007 «Об утверждении форм первичной медицинской документации по почечно-заместительной терапии».

В исследование включены 270 пациентов, получивших почечный трансплантат от живого или умершего донора в период с января 2011 г. по декабрь 2013 г. Сроки наблюдения за пациентами составили от 3 мес. до 3 лет и 3 мес.

В исследуемую группу вошли 138 мужчин и 132 женщины. Средний возраст пациентов составил 41,6±12,2 года. Большинство пациентов (82,9%) до трансплантации почки получали лечение терминальной ХПН с помощью программного гемодиализа, а остальные 17,1% — с помощью пери-

тонеального диализа. Продолжительность диализотерапии до трансплантации составила (Me (LQ-UQ)) 27 (11–58) мес. Основными причинами терминальной уремии у пациентов были: хронический гломерулонефрит — 154 (57,0%) случая, врожденные аномалии мочевых путей (поликистоз, гипоплазия почек, нейрогенная дисфункция мочевого пузыря и т. д.) — 40 (8,5%), сахарный диабет — 25 (9,3%), системные болезни (артериальная гипертензия, люпус-нефрит, и т. д.) — 20 (7,4%), а также неустановленные причины — 31 (11,5%).

Исследовано влияние различных факторов донора и реципиента на развитие ИМП. Среди донорских факторов были проанализированы возраст, тип донора (живой или умерший), причина смерти мозга (ЧМТ или ОНМК), вариант забора почек (изолированный или мультиорганный), пол, вес и рост, ИМТ, артериальное давление, число лекарственных средств, применяемых для кардиотонической поддержки на фоне смерти мозга, уровни основных цитокинов и интерлейкинов (IL-1b, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, IL-10, IL-13, Interferon-γ), показатели биомолекул в крови и моче (pNGAL и uNGAL), основные биохимические показатели сыворотки крови (мочевина, креатинин, трансаминазы, АЛТ, АСТ), анатомия почечных сосудов и время холодовой ишемии.

Среди дотрансплантационных факторов реципиента изучено влияние на возникновение ИМП пола, возраста, типа (гемодиализ и перитонеальный диализ) и времени нахождения на диализотерапии.

Изучено также влияние перитрансплантационных факторов реципиента: вариант реконструкции сосудов, установка почечного стента, степень гистосовместимости с донором, использование индукции иммуносупрессии (базиликсимаб, АТГ или без индукции), типа ингибиторов кальциневрина (циклоспорин или такролимус), типа функционирования трансплантата (немедленная, отсроченная или замедленная функция), послеоперационных хирургических осложнений (мочевой свищ, гематомы, кровотечения, лимфоррея, раневая инфекция), длительности операции по трансплантации почки и отторжения трансплантата (острое, стероидрезистентное).

Общий анализ мочи проводился в клинико-диагностической лаборатории УЗ «9-я ГКБ» г. Минска на аппарате «MediscreenReaderII» («Orgenics», Израиль).

При анализе воспалительных заболеваний мочевых путей оценивалось два основных патологических состояния: активная инфекция мочевых путей (аИМП) и бессимптомная бактериурия (ББ). аИМП характеризовалась патологией осадка мочи (лейкоцитурия, пиурия, протеинурия, эритроцитурия) в сочетании или без бактериурии в общем анализе мочи [10]. ББ характеризовалась качественно положительными результатами выявления бактериурии или посева мочи на микрофлору при условии отсутствия патологии в осадке мочи [11]. У пациентов с данными заболеваниями дополнительно устанавливалась частота рецидивов.

Для сравнительного анализа выделено три группы пациентов. В первую группу вошли 79 пациентов с аИМП по данным лабораторных методов обследования (микроскопия осадка мочи) и общеклиническим параметрам. Во вторую группу были включены 20 пациентов с ББ. В группу сравнения вошел 171 пациент без клинических или лабораторных проявлений аИМП и ББ (таблица 1).

Таблица 1 — Характеристика групп реципиентов почечного трансплантата

Признак	Группа 1 (n = 79)	Группа 2 (n = 20)	Группа сравнения (n = 171)
Пол (м/ж)	32/47	4/16	102/69
Возраст (mean±SD), годы	40,7±11,4	40,4±18,2	42,2±11,9
Тип диализа (ГМД/ПД)	77/2	18/2	162/9
Длительность диализотерапии (Me (LQ-UQ)), мес.	38,5 (13–63)	27(17–36)	24 (10–53)

Характеристика доноров почек для пациентов вышеуказанных групп представлена в таблице 2.

Таблица 2 — Данные доноров почек в группах сравнения и контроля

Признак	Группа 1 (n = 79)	Группа 2 (n = 20)	Группа сравнения (n = 171)
Пол (м/ж)	51/28	11/9	116/55
Возраст (mean± SD), годы	39,1±10,9	43±10,9	38,0±11,9
Тип донора (умерший/живой)	74/5	19/1	154/17
Причина смерти (ЧМТ/ОНМК)	35/39	12/7	76/78
Вес (Me (LQ-UQ)), кг	80(65–88)	70(60–80)	75(65–80)
Рост (Me (LQ-UQ)), см	170 (160–178)	165 (160–175)	170,5 (165–180)
ИМТ	25,3 (21,5–29,5)	26,2 (26,0–26,4)	23,4 (21,7–26,1)
Тип забора (изолированный/мультиорганный)	38/41	9/11	82/89

Статистическая обработка данных проведена с использованием статистического пакета «Statsoft», в частности программы «Statistica 10.0».

Результаты и их обсуждение. В группу с аИМП (группа 1) вошли 79 реципиентов почечного трансплантата. Таким образом, распространенность аИМП после пересадки почки составила 29,3% (79/270).

У этих пациентов изолированная лейкоцитурия встречалась в 68,3% (54/79) случаев. Сочетание воспалительной патологии осадка мочи и бактериурии по результатам общего анализа мочи было отмечено у 31,7% (25/79) пациентов с аИМП.

Степень бактериурии у пациентов с аИМП оценивалась качественно, медиана составила 2+ (1+–2+). Значение медианы (Me(LQ–UQ)) лейкоцитурии составило 15 (10–55) лейкоцитов в поле зрения.

Группа пациентов с ББ (группа 2) составила 20 реципиентов почечного трансплантата. Распространенность этого состояния составила 7,4% (20/270). Значение медианы бактериурии(Me (LQ–UQ)) в этой группе равнялось 1+ (1+–2+).

Таким образом, общая встречаемость инфекций мочевых путей (аИМП и ББ вместе) у пациентов после трансплантации почки составила 36,7% (99/270).

Эти осложнения наблюдались как однократно, так и могли носить рецидивирующий характер. Частота рецидивов составляла от 2 до 7 случаев. Среднее значение (mean±SD) рецидивов составило 1,62±1,2.

У реципиентов с аИМП средняя (mean±SD) частота рецидивов составила 1,67±1,21. ББ рецидивировала с частотой в среднем (mean±SD) 1,57±0,87.

Среди факторов, зависящих от реципиента, установлена статистически достоверная зависимость возникновения аИМП от пола, длительности диализотерапии и ВАМП как причины терминальной уремии (таблица 3).

Таблица 3 — Факторы риска аИМП, ассоциированные с данными реципиентов

Параметр	Группа 1 (n = 79)	Группа сравнения (n = 171)	p-level
Пол (м/ж)	32/47	102/69	0,004159*
Возраст (mean±SD), годы	40,7±11,4	42,2±11,9	0,640766*
Тип диализа (ГМД/ПД)	77/2	162/9	0,337693*
Длительность диализотерапии (Me (LQ–UQ)), мес.	38,5 (13–63)	24 (10–53)	0,047813*
Длительность в листе ожидания (Me (LQ-UQ)), мес.	18 (8–41)	15 (6–28)	0,198071*
Клинический диагноз: - хронический гломерулонефрит - СД - ВАМП - др.	 45/154 (29,2%) 8/23 (34,8%) 19/46 (41,3%) 3/15 (20%)	 109/154 15/23 27/46 12/15	0,0397**

Примечание — *Здесь и далее — Mann–WhitneyUTest; **двусторонний вариант критерия Фишера.

Среди факторов донора установлена статистическая значимость возникновения аИМП в зависимости от уровня АЛТ и наличия нижнеполярной почечной артерии трансплантата. С клинической точки зрения последний фактор является действительно важным и требует внимательного отношения к реваскуляризации нижнеполярной добавочной почечной артерии, кровоснабжающей кроме полюса почки весь мочеточник трансплантата [12]. Интересно, что такие факторы, как тип донорства (посмертное или живое), вариант эксплантации почек (изолированный забор или в сочетании с другими органами), а также время холодовой консервации почки не имели статистически значимого влияния на развитие инфекции мочевых путей (таблица 4).

Таблица 4 — Факторы риска аИМП, ассоциированные с донором и трансплантатом почки.

Признак	Группа 1 (n = 79)	Группа сравнения (n = 171)	p-level*
Пол (м/ж)	51/28	116/55	0,565124
Возраст (mean±SD), годы	39,1±10,9	38,0±11,9	0,458011
Тип донора (умерший/живой)	74/5	154/17	0,250969
Причина смерти (ЧМТ/ОНМК)	35/39	76/78	0,819690
Вес (Me (LQ–UQ)), кг	80 (65–88)	75 (65–80)	0,565124
Рост (Me (LQ–UQ)), см	170 (160–178)	170,5 (165–180)	0,733627
ИМТ	25,3 (21,5–29,5)	23,4 (21,7–26,1)	0,621410
Тип забора (изолированный/мультиорганный)	38/41	82/89	0,965202
Na, ммоль\л	150,0 (144–164)	151 (144–157)	0,590265
АСТ, ммоль\л	48,0 (29–79)	53 (39–110)	0,183202
АЛТ, ммоль\л	41,0 (22–97)	60 (34–103)	0,036572
Креатинин, мкмоль\л	96 (80–109)	89 (74–103)	0,253534
Мочевина, ммоль\л	6,5 (5,4–7,6)	6,1 (4.5–7,0)	0,432493
Верхнеполярная артерия. %	20	13,3	0,631705
Нижнеполярная артерия,%	25	9,5	0,035553
Одиночный ствол ПА,%	55	76,6	0,358938
Артериальная реконструкция, %	15	14	0,882993
Время холодовой консервации (Me (LQ–UQ)), ч	9,5 (6,5–12)	9,0 (6,5–11,5)	0,281223

С целью углубленного изучения инфекционного статуса у доноров почки, анализа механизмов иммунного дисбаланса, нарушений в системе цитокинов, для дальнейшей разработки методов иммунопрофилактики и иммунореабилитации пациентов после трансплантации почки выполнен анализ цитокинов и провоспалительных биомолекул [13]. Результаты исследования показали достоверное снижение уровня IL-13 в крови доноров, почка которых инфицировалась после трансплантации. Это можно объяснить тем, что у пациентов происходило снижением пролиферации В-клеток и секреции IgE и IgG4, возникающее на фоне дефицита IL-13 (таблица 5).

Таблица 5 — Уровни провоспалительных цитокинов и биомолекул в крови донора при ИМП

Параметр (Me (LQ–UQ))	Группа ИМП (n = 77)	Группа сравнения (n = 193)	p-level*
IL-1b	1,59 (0,6–2,4)	2,02 (1,0–2,5)	0,909757
IL-4	2,35 (1,3–5,8)	1,56 (0,5–3,9)	0,427558
IL-6	5,58 (3,95–7,9)	5,66 (3,9–9,5)	0,630006
IL-8	3,64 (2,3–7,4)	4,98 (2,4–9,2)	0,590307
TNF-α	2,13 (1,2–4,2)	3,26 (1,9–4,5)	0,610067
IL-10	4,45 (1,4–41)	32,55 (7,2–38,6)	0,217385
IL-13	12,29 (6,2–28,7)	20,49 (12,3–26,7)	**0,040747**
Int-γ	2,44 (1,7–5,1)	3,41 (2,2–5,1)	0,230053
pNGAL	60,5 (27,1–134,5)	36,35 (7,7–98,3)	0,259217
uNGAL	23,1 (6,8–81,5)	20,9 (9,1–85,3)	0,972519
BNP	20,67 (6,2–58,9)	46,4 (1–55,2)	0,847675

Среди перитрансплантационных факторов установлено статистически достоверное влияние длительности операции по трансплантации почки и степени гистосовместимости по HLA на развитие аИМП (таблица 6). Очевидно, что длительная тепловая ишемия, неизбежно присутствующая после извлечения почки изо льда, в случае увеличения времени операции снижает резистентность трансплантата к инфекционным агентам [14]. Недостаточная гистосовместимость тканей донора и реципиента также ассоциирована с ростом инфекционных рисков, поскольку обычно требует усиления иммуносупрессивного фона с помощью иммунодепрессивных лекарственных средств с целью подавления реакции отторжения.

Таблица 6 — Факторы риска аИМП, ассоциированные с перитрансплантационными признаками

Параметр	Группа 1 (n = 79)	Группа сравнения (n = 171)	p-level*
Анастомоз «конец в бок» с НПА,%	93,0	91,1	0,218346
Анастомоз «конец в конец» в ВПА, %	7,0	8,9	0,752080
Установка почечногостента,%	33,9	36,6	0,820341
Длительность операции (Me (LQ–UQ)), ч	3 (2,5–4,0)	3 (2,5–3)	**0,009978**
Число несовпадений по HLA, (Me (LQ–UQ))	2 (1–2)	2 (0–4)	**0,045281**
Индукция иммуносупрессии, %	86,2	86,5	1,000000
Ингибиторы кальциневрина,% циклоспорин А/такролимус	66,7/33,3	55,6/44,4	0,173328
Начальная дисфункция, %	30	20,8	0,136804
Креатинин (выписка), мкмоль\л (Me (LQ–UQ))	137,0 (110–216)	148,0 (109–202)	0,760221
Креатинин 1/12, мкмоль/л (Me (LQ–UQ))	123,0 (89–180)	115,0 (92,5–144,5)	0,486408
СКФ 1/12, мл/мин (Me (LQ–UQ))	66,0 (36–83)	67,0 (50–84)	0,511963
Креатинин 3/12, мкмоль/л (Me (LQ–UQ)	116,0 (93–147)	112,0 (92,5–130)	0,528637
СКФ 3/12, мл/мин (Me (LQ–UQ))	72,0 (46–87)	68,0 (53–83)	0,947568
Острое отторжение,%	23,3	15,5	0,472219
Стероидрезист. ОО, %	9,3	6,4	0,543608
Замедленная функция, %	6,9	13,8	0,248182

Отдельно проведен сравнительный анализ факторов риска возникновения ББ, зависящих от донора и реципиента. Установлена лишь статистическая значимость женского пола как фактора риска развития ББ (p = 0,000679).

Заключение. В ходе нашего исследования была установлена распространеность аИМП и ББ (29,3 и 7,4% соответственно). Общая встречаемость инфекций мочевых путей (аИМП и ББ) у пациентов после трансплантации почки составила 36,7% (99/270).

Ретроспективный анализ выявил статистически значимые факторы риска аИМП после трансплантации почки, некоторые из них ранее не упоминались в литературе. По нашим данным, к факторам риска относятся: женский пол реципиента, клинический диагноз «врожденная аномалия мочевых путей» реципиента, длительность нахождения на диализотерапии, уровень АЛТ донора, наличие нижнеполярной почечной артерии, длительность операции по трансплантации почки, а также степень гистосовместимости донора и реципиента.

Среди факторов риска ББ статистически достоверное значение имеет только женский пол реципиента.

Из провоспалительных цитокинов уровень IL-13 показал статистическую значимость в качестве предиктора ИМП.

Одновременно установлено, что другие факторы, традиционно ассоциируемые с риском инфекции (длительность холодовой консервации почки, установка мочевого стента при операции, функция трансплантата, использование лекарственной индукции иммуносупрессии, острое отторжение трансплантата), не имели статистически достоверной значимости в развитии ИМП.

Полученные в ходе исследования данные могут лечь в основу рекомендации по первичной профилактике ИМП у пациентов после трансплантации почки.

Литература

1. Bethesda M.D. US Renal Data System. USRDS 1997 Ann. Data Report / M.D. Bethesda; Nat. Inst. Health, Nat. Inst. Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. — 1997.
2. Infectious complications after kidney transplantation: current epidemiology and associated risk factors / G.J. Alangaden [et al.] // Clin. Transplant. — 2006. — Vol. 20. — P. 401–409.
3. Nosocomial infections in renal transplant patients: risk factors and treatment implications associated with urinary tract and surgical site infections / S.R. Dantas [et al.] // J. Hospital Infect. — 2006. — Vol. 63. — P. 117–123.
4. Late urinary tract infection after renal transplantation in the United States / K.C. Abbott [et al.] // Am. J. of Kidney Dis. — 2004. — Vol. 44. — P. 353–362.
5. Hospitalizations for bacterial septicemia after renal transplantation in the United States / K.C. Abbott [et al.] // Am. J. Nephrol. — 2001. — Vol. 21. — P. 120–127.
6. Long-term survival in renal transplant recipients with graft function / A.O. Ojo [et al.] // Kidney Internat. — 2000. — Vol. 7. — P. 307–313.
7. Acute pyelonephritis represents a risk factor impairing long-term kidney graft function / G. Pellé [et al.] // Am. J. Transplant. — 2007. — Vol. 7. — P. 899–907.
8. Early catheter removal decreases incidence of urinary tract infections in renal transplant recipients / D.G. Rabkin [et al.] // Transplant. Proceed. — 1998. — Vol. 30. — P. 4314–4316.
9. Epidemiology of urinary infections in renal transplant recipients / B. Transplant. Proceed. — 2006. — Vol. 38. — P. 2414–2415.
10. Laboratory evaluation of urinary tract infections in an ambulatory clinic / K.C. Carroll [et al.] // Am. J. of Clin. Pathol. — 1994. — Vol. 101. — P. 100–103.
11. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults / L.E. Nicolle [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2005. — Vol. 40. — P. 643–654.
12. Sampaio, F.J. Renal arteries: anatomic study for surgical and radiologic practice / F.J. Sampaio, M.A. Passos // Surg. Radiol. Anat. — 1992. — Vol. 14, № 2. — P. 113–177.
13. Камышников, В.С. Лабораторная диагностика внутренних и хирургических болезней: учеб. пособие / В.С. Камышников. — Минск: Адукацыя і выхаванне, 2012. — 584 с.: ил.
14. Deleterious influence of prolonged warm ischemia in living donor kidney transplantation / J. Hellegering [et al.] // Transplant. Proceed. — 2012. — Vol. 44, № 5. — P. 1222–1226.

PREVALENCE AND RISK FACTORS OF URINARY TRACT INFECTIONS IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS

Kalachik O.V., Narbin A.V., Vershinin P.Yu., Guberskaya M.P., Kozlova M.V., Smolyakova M.V., Sadovsky D.N.

9th Municipal Clinical Hospital, Minsk, Belarus

Analyzes of the risk factors for infectious complications after kidney transplantation has been presented in the paper. We analyzed a number of parameters for the donor, and recipient, studied the factors related to the anatomy of kidney transplant, procedures of kidney transplant, as well as the influence function and the basic immunosuppressive therapy on the development of infectious complications in kidney transplant and urinary tract.

Keywords: renal transplantation, urinary tract infection.

Поступила 16.05.2014

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗНЫХ ВАРИАНТОВ ПРОФИЛАКТИКИ ЦМВ-ИНФЕКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

Калачик О.В.[1], Садовский Д.Н.[1], Амвросьева Т.В.[2], Козлова М.В.[1], Макович В.Н.[1], Поклонская Н.В.[2], Богуш З.Ф.[2]

[1]9-я городская клиническая больница, Минск;
[2]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. В статье проведен сравнительный анализ применения тактики универсальной профилактики ЦВМ-инфекции и превентивной терапии с учетом влияния на ЦМВ-виремию и ЦМВ-синдром. Изучены функциональные характеристики трансплантата почки в зависимости от наличия ЦМВ-инфекции.

Ключевые слова: ЦМВ-инфекция, профилактика, трансплантация почки.

Введение. Частота инфекционных вирусных осложнений после аллотрансплантации почки, несмотря на современные подходы к лечению и профилактике, остается высокой [4]. В дополнение к увеличению расходов на медикаментозную терапию пациентов, вирусная инфекция, особенно вызванная цитомегаловирусом (ЦМВ), может быть ассоциирована с увеличением частоты острых реакций отторжения [1] и отсроченной функции трансплантата [2].

ЦМВ-инфекция может протекать бессимптомно и диагностироваться только по наличию виремии или она может приводить к возникновению ЦМВ-синдрома (болезни), сопровождающегося клиническими проявлениями. В посттрансплантационном периоде ЦМВ-инфекция, как правило, обнаруживается в срок до 6 мес. после пересадки почки, но чаще в период с 1-го по 3-й мес., что связано с относительно высоким уровнем лекарственной иммуносупрессии в этот период [3–6].

Литературные данные свидетельствуют о том, что профилактика противовирусными препаратами может нарушать развитие Т-клеточного ответа [7-9] или образование антител [10], поэтому риск развития ЦМВ-инфекции увеличивается спустя 3 мес., т. е. после прекращения ЦМВ-профилактики в посттрансплантационном периоде.

Некоторые исследования показывают связь между ЦМВ-инфекцией и возникновением хронической нефропатии трансплантата, а также ее ассоциацию с острым отторжением [11, 12] и отсроченной функцией трансплантата [2]. И, наоборот, другие исследования не обнаруживают какую-либо корреляцию между ЦМВ-инфекцией и острым отторжением, либо хронической нефропатией трансплантата почки [13].

Известно несколько вариантов профилактики ЦМВ-инфекции в посттрансплантационном периоде. Так называемая универсальная профилактика заключается в пероральном применении реципиентами профилактических доз валганцикловира («Вальцит», производства «Hoffman-la-Roche», Швейцария) в течение 3–6 мес. после трансплантации. Альтернативно может применяться другая тактика в профилактике ЦМВ-синдрома (болезни) — регулярный количественный скрининг в крови ЦМВ методом ПЦР и при превышении пороговых значений вирусной нагрузки назначение превентивной противовирусной терапии лечебными дозами ганцикловира («Цимевен», производства «Hoffman-la-Roche», Швейцария) или валганцикловира. Показанием для такой превентивной терапии является выявление диагностически значимого роста ЦМВ-виремии (более 2000 копий ДНК ЦМВ в 1 мл) в посттрансплантационном периоде.

До начала настоящих исследований в Республике Беларусь отсутствовали какие-либо данные об эффективности (результативности) разных вариантов профилактики ЦМВ-инфекции и их влиянии на частоту и структуру дисфункции трансплантата почки. Весьма ограничена также информация о роли самой ЦМВ-инфекции в нарушении функции трансплантата почки.

Цель работы — изучение частоты возникновения дисфункции почечного трансплантата у реципиентов в зависимости от примененной тактики при осуществлении профилактики ЦМВ и от наличия ЦМВ-инфекции в раннем (до 3 мес.) и средне отдаленном (до 1 года) послеоперационном периодах.

Материалы и методы. Наличие ДНК ЦМВ и уровень вирусной нагрузки определяли методом количественной полимеразной цепной реакции на базе лаборатории инфекций с природным резервуаром ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии». Исследовали образцы крови пациентов после трансплантации почки на 30, 60, 90, 180, 300, 365 сут.

На наличие ЦМВ-инфекции у реципиентов почки указывал факт регистрации ЦМВ в крови (виремии), выявленной методом ПЦР. ЦМВ-синдром характеризовался выраженной виремией (число копий ДНК ЦМВ более 2000 в мл крови) в сочетании с появлением генерализованных симптомов вирусной инфекции (лихорадка без явной причины >38°С в течение 2-х и более дней, гриппоподобное состояние — миалгия, артралгия, анорексия, общая слабость, лейкопения, тромбоцитопения, признаки умеренного вирусного гепатита, повышение трансаминаз крови в два и более раз).

В исследование был включен 41 реципиент почечного аллографта со сроками наблюдения 1 год после трансплантации. Из них 28 (68,3%) мужчин и 13 (31,7%) женщин.

Причиной терминальной стадии хронической болезни почек стали в 30 случаях (73,2%) хронический нефритический синдром, в 5 случаях (12,2%) — врожденная аномалия мочевых путей, в 4 случаях (9,8%) — системные заболевания (сахарный диабет, люпус-нефрит и т. д.) и в 2 случаях (4,8%) — поликистоз и мочекаменная болезнь почек.

Трансплантация почки от умершего донора была выполнена 39 пациентам (95,1%), от живого родственного донора — 2 пациентам (4,9%).

Исследуемые пациенты были разделены на группы в зависимости от выбранной тактики профилактики ЦМВ-инфекции. В 1-ю группу вошли 20 реципиентов почки с превентивной тактикой ЦМВ-профилактики. Она заключалась в скрининге ЦМВ-виремии и определении вирусной нагрузки методом количественной ПЦР с последующим назначении лечебных доз ганцикловира, парентерально в течение 14–21 дня (в зависимости от сроков достижения эффекта по снижению ЦМВ-виремии ниже порогового уровня). Во 2-й группе (21 пациент) использовалась тактика универсальной профилактики. Она состояла в профилактическом ежедневном приеме валганцикловира в течение 3-х мес. после трансплантации, внутрь в дозировке, установленной в соответствии с Клиническим протоколом трансплантации почки № 6, утвержденным Постановлением Минздрава Республики Беларусь от 05.01.2010.

Дисфункция аллографта почки определялась при наличии в послеоперационном периоде замедленной, отсроченной функции трансплантата или реакции острого отторжения трансплантата почки. Замедленная функция трансплантата характеризовалась длительным снижением азотемии (уровень креатинина крови превышал 300 мкмоль/л через 1 мес. после трансплантации почки), но без потребности в проведении диализотерапии. Отсроченная функция трансплантата была определена как любая дисфункция требующая применения диализотерапии для коррекции водно-электролитного баланса в раннем послеоперационном периоде трансплантации почки. Острая реакция отторжения — причина дисфункции, установленная морфологически с помощью пункционной чрезкожной нефробиопсии трансплантата, либо с учетом наличия у пациента комплекса иных (инструментальных или лабораторных) значимых признаков отторжения пересаженной почки.

Статистический анализ проводился с использованием непараметрических методов. Средние величины показаны как медиана с 25 и 75% межквартильным интервалом — Me(LQ;UQ), среднее арифметическое со средним квадратичным отклонением — M(SD). Сравнение количественных величин выполнялось с использованием Mann–Whitney U-test и Fisher exact test, two-tailed. При значениях $p<0,05$ результаты считались статистическими достоверными.

Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) была рассчитана с использованием формулы MDRD 4.

Результаты и их обсуждение. Исследуемые группы не имели существенных демографических различий между пациентами. По возрасту, полу и виду диализотерапии, проводимой до трансплантации почки, пациенты были сопоставимы. В то же время определялось достоверно большее число серонегативных реципиентов (6/21) во 2-й группе по сравнению с 1-й группой (1/20) ($p = 0,053$). Результаты сравнительных характеристик двух групп приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Характеристика реципиентов в группах сравнения

Показатель	Группа 1 (n = 20)	Группа 2 (n = 21)	p
Мужчины, n (%)	13 (65)	15 (71,4)	0,52*
Женщины, n (%)	7 (35)	6 (28,6)	0,5*
Средний возраст, лет, M(SD)	34,1 (10,45)	36,62 (10,63)	0,46**
ЦМВ«+»(Ig G «+», IgM «–»), n (%)	19 (95)	15 (71,4)	0,053*
ЦМВ«–»(Ig G «–», IgM «–»), n (%)	1 (5)	6 (28,6)	0,053*
Гемодиализ	16 (80)	18 (85,7)	0,47*
Перитонеальный диализ	4 (20)	3 (14,3)	0,47*

Примечание — *Fisher exact test, two-tailed; **Mann–Whitney U-test.

Серологический скрининг показал, что все доноры почек были серопозитивными в отношении ЦМВ (IgG «+», IgM «–»).

ЦМВ-виремия в течение всего периода наблюдения была выявлена у 56% реципиентов (23/41). При этом частота выявления ЦМВ-виремии в 1-й группе составила 50% (10/20), а во 2-й группе — 65% (13/21) ($p = 0,32$).

По результатам статистического анализа достоверных различий в частоте выявляемой ЦМВ-виремии в зависимости от варианта примененной послеоперационной противовирусной профи-

лактики в группах сравнения не выявлено (таблица 2). Не было установлено также статистически значимых различий в показателях вирусной нагрузки между группами сравнения (копий/мл, Me (LQ;UQ)): 1-я группа — 191 (80;287) и 2-я группа — 189 (69;371), p = 0,94.

Таблица 2 — Частота ЦМВ-виремиии, вирусная нагрузка в зависимости от срока после трансплантации почки

Период	Количество и доля (%) реципиентов с ЦМВ-виремией		p, Fisher exact test, two-tailed	Средняя вирусная нагрузка при ЦМВ-виремии (копий/мл), Me(LQ;UQ)		p, Mann–Whitney U-test
	Группа 1	Группа 2		Группа 1	Группа 2	
1 мес.	1 (5%)	0	0,49	31	0	
2 мес.	6 (30%)	9 (41,8%)	0,3	287 (233;915)	302 (52,3;3340)	0,95
3 мес.	2 (10%)	1 (4,7%)	0,48	135,5 (80;191)	101 (87;229)	0,84
4–12 мес.	1 (5%)	3 (14,3%)	0,32	45,95 (21,9;70)	87 (50,6;189)	0,38

Изучена кратность эпизодов ЦМВ-виремии в группах сравнения (таблица 3). Установлено, что в 1-й группе ЦМВ-виремия носила рецидивный характер и была выявлена в 4 из 20 случаев (20%), а во 2-й группе — в 6 из 21 случая (28,6%) (p = 0,43).

Таблица 3 — Частота рецидивов ЦМВ виремии в группах сравнения

Кратность выявления	Количество и доля (%) реципиентов с ЦМВ-виремией	
	Группа 1	Группа 2
1 эпизод	6 (30%)	7 (33,3%)
2 эпизода	3 (15%)	3 (14,3%)
3 и более эпизода	1 (10%)	3 (14,3%)

В 1-й группе ЦМВ-синдром был диагностирован у 1 из 20 реципиентов (5%). Во 2-й группе — 5 из 21 реципиента (23,8%) имели ЦМВ-синдром (p = 0,103). Большинство заболевших реципиентов (4/5) в этой группе были ЦМВ-серонегативными (IgG «–», IgM «–»). Пациент с ЦМВ-инфекцией из 1-й группы был ЦМВ-серопозитивным (IgG «+», IgM «–»). Таким образом, 4 из 6 реципиентов с ЦМВ-синдромом (66,7%) были ЦМВ-серонегативными (таблица 4).

Таблица 4 — Характеристики пациентов с ЦМВ-синдромом в группах сравнения

Характеристика реципиентов	Группа 1	Группа 2
Общее количество, n (%)	1 (5)	5 (23,8)
Мужчины, n (%)	0	4 (19)
Женщины, n (%)	1 (5)	1 (4,7)
Средний возраст, годы, M(SD)	30	33,6 (5,1)
ЦМВ «+» (IgG «+», IgM «–»), n (%)	1 (5)	1 (4,7)
ЦМВ «–» (IgG «–», IgM «–»), n (%)	0	4 (19)

ЦМВ-синдром развился у пациента 1-й группы на 93-е сут после операции, а у реципиентов 2-й группы среднее время от момента трансплантации до появления ЦМВ-инфекции составило 63 сут (20;308) (Me (LQ–UQ).

Частота ранней дисфункции трансплантата почки у пациентов, включенных в наше исследование, составила 31,7% (13/41). Отсроченная функция трансплантата была зафиксирована у 4 из 41реципиента (9,8%), замедленная функция трансплантата — у 5 из 41 реципиента (12,2%), острое отторжение трансплантата — у 4 из 41 реципиента (9,8%) .

В группах сравнения частота дисфункций трансплантата достоверно не отличалась. В 1-й исследуемой группе ранняя дисфункция зафиксирована у 35% пациентов (7/20), отсроченная функция — у 15% пациентов (3/20), замедленная функция — у 15% пациентов (3/20), острое отторжение аллографта почки — у 5% пациентов (1/20). Во 2-й исследуемой группе частота регистрации ранней дис-

функции трансплантата почки составила 28,6% (6/21), отсроченной функции — 4,8% (1/21), замедленной функции 9,8 % (2/21), острого отторжения аллографта почки — 14,3% (3/21).

Медиана скорости клубочковой фильтрации (СКФ) у пациентов 1-й группы через 1 год после операции оказалась выше, хотя различия не были статистически достоверными. В частности, медиана СКФ (Me (LQ;UQ) в 1-й группе составила 72,1 (52,5; 94,5) мл/мин, а во 2-й группе — 64,2 (58,6; 70,6) мл/мин (p = 0,23, Mann–Whitney U-test) (таблица 6).

Проведено изучение влияния ЦМВ-инфекции на функцию почечного аллографта. У реципиентов с ЦМВ-синдромом (n = 6) медиана СКФ составила 66,0 (59; 88,7) мл/мин. В группу сравнения были включены реципиенты почки без ЦМВ-синдрома (n = 35). В этой группе медиана СКФ составила 68,5 (56,8; 80,57) мл/мин (p = 0,98, Mann–Whitney U-test). Таким образом, достоверных данных о влиянии ЦМВ-инфекции на функцию почечного трансплантата получено не было.

Таблица 6 — Функциональные характеристики трансплантатов почки в группах сравнения

Функция трансплантата почки	Группа 1	Группа 2	p
Частота ранней дисфункции, n (%)	7 (35)	6 (28,6)	0,46*
Отсроченная функция трансплантата, n (%)	3 (15)	1 (4,8)	0,3*
Замедленная функция трансплантата, n (%)	3 (15)	2 (9,8)	0,47*
Острое отторжение трансплантата , n (%)	1 (5)	3 (14,3)	0,4*
СКФ через 1 год, мл/мин	72,1 (52,5; 94,5)	64,2 (58,6; 70,6)	0,23**

Примечание —*p — Fisher exact test, two-tailed; ** — Mann–Whitney U-test.

Заключение. На основании полученных в настоящем исследовании результатов можно сформулировать следующие выводы:

1. После трансплантации почки ЦМВ-инфекция проявлялась в виде ЦМВ-виремии или ЦМВ-синдрома (болезни).

2. Большая часть реципиентов почки (56%), несмотря на применение противовирусной профилактики, имела ЦМВ-виремию, детектируемую методом ПЦР.

3. ЦМВ-синдром (болезнь) у реципиентов почки регистрировался с частотой 14,6%. При этом в 66,7% случаев ЦМВ-синдром развился у ЦМВ-серонегативных реципиентов почки.

4. Несмотря на то, что тактики универсальной ЦМВ-профилактики и превентивной терапии не имели достоверных различий в полученном эффекте по предупреждению ЦМВ-инфекции, сравнение абсолютных значений частоты развития ЦМВ-виремии и ЦМВ-синдрома у реципиентов указывает на возможное преимущество применения превентивной терапии у этих пациентов. Полученные данные диктуют необходимость продолжения представленных исследований и указывают на важность осуществления регулярного вирусологического мониторинга реципиентов в посттрансплантационном периоде.

5. Частота ранних дисфункций трансплантата почки и показатель скорости клубочковой фильтрации не зависели от выбранной тактики ЦМВ-профилактики.

6. Показатели функции аллографта почки через 1 год после трансплантации у пациентов с ЦМВ-инфекцией и без нее не отличались.

Литература

1. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients / S. Sagedal, [et al.] Am. J. Transplant. — 2002. — Vol. 2. — P. 850–856.

2. Persistent cytomegalovirus infection in kidney allografts is associated with inferior graft function and survival / I. Helanterä [et al.] // Transpl. Int. — 2006. — Vol. 19. — P. 893–900.

3. Инфекции в трансплантологии / под ред. С.В. Готье. — М., 2010.

4. Вирусные инфекции и трансплантация почки (Обзор литературы, часть I) // Нефрология и диализ. — 2003. — Т. 5, № 2. — С. 108–116.

5. Руководство по трансплантации почки / под ред. Г.М. Данович, Я.Г. Мойсюка; 3-е изд., пер. с англ. — Тверь: ООО «Изд-во “Триада”», 2004. — 472 с.

6. Цитомегаловирусная инфекция при трансплантации почки / Д.Н. Садовский [и др.] // Мед. журн. — 2012. — Т. 4. — С. 85–88.

7. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: Correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis / C. Li [et al.] // Blood. — 1994. — Vol. 83. — P. 1971–1979.

8. Deficiency of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells in patients presenting with late-onset CMV disease several years after transplantation / N. Cummin [et al.] // Transpl. Infect. Dis. — 2009. — Vol. 11. — P. 20–27.

9. Primary cytomegalovirus disease after five years of antiviral prophylaxis / S. Kijpittayarit [et al.] // Transplantation. — 2006. — Vol. 81. — P. 137–138.

10. Antibody maturation and viremia after primary cytomegalovirus infection, in immunocompetent patients and kidney-transplant patients / C. Steininger [et al.] // J. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 190. — P. 1908–1912.

11. The impact of cytomegalovirus infections and acute rejection episodes on the development of vascular changes in 6-month protocol biopsy specimens of cadaveric kidney allograft recipients / I. Helantera [et al.] // Transplantat. — 2003. — Vol. 75. — P. 1858.

12. Association between cytomegalovirus disease and chronic rejection in kidney transplant recipients / A. Humar [et al.] // Transplantat. — 1999. — Vol. 68. — P. 1879.

13. Cytomegalovirus infection and graft rejection in renal transplantation / G. Cathomas [et al.] // Transplantat. — 2001. — Vol. 71. — P. 764.

RESULTS OF USE DIFFERENT APPROACHES TO PREVENT CMV INFECTION IN PATIENTS AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION

Kalachik O.V.[1], Sadovski D.N.[1], Amvrosieva T.V.[2], Kozlova M.V.[1], Makovitch V.N.[1], Paklonskaya N.V.[2], Bogush Z. F.[2]

[1]9th City Clinical Hospital, Minsk;

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

The study devotes to compare an effect of preemptive therapy versus universal prophylaxis on CMV viremia and CMV syndrome. Functional characteristics of a kidney graft depending of CMV infection were investigated.

Keywords: CMV infection, prophylaxis, kidney transplantation.

Поступила 11.07.2014

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ СИНУСОИДАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ У ПАЦИЕНТОВ С КОИНФЕКЦИЕЙ ВИЧ /ВГС

Матиевская Н.В., Цыркунов В.М., Кравчук Р.И., Андреев В.П.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Реферат. Представлены особенности структуры синусоидных капилляров и синусоидальных клеток печени у 14 пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС. Препараты печени, полученные в результате биопсии, изучены с использованием световой и электронной микроскопии.

Установлено нарушение печеночной микроциркуляции, выраженные нарушения структуры эндотелиальных клеток синусоидов, Купферовских клеток, активация иммунных реакций в печени, ускорение фиброгенеза различной степени выраженности у всех пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС.

Ключевые слова: ВИЧ, ВГС, электронная микроскопия, синусоидальные клетки, фиброгенез.

Введение. Синусоидальные клетки печени (СКП) являются «первой линией обороны» при встрече с различными патогенами, токсинами и другими повреждающими факторами, т. к. синусоиды и микроциркуляция печени служат плацдармом и объектом иммунопатологических реакций. В настоящее время к СКП относят эндотелиальные клетки синусоидов (ЭКС), звездчатые клетки печени (ЗКП, клетки Ито), клетки Купфера (КК), Pit-клетки (ПК), дендритные клетки (ДК). СКП составляют около 33% от клеточного состава печени. При этом доля ЭКС достигает 70%, ЗКП — 10%, КК — 20%, ПК — <1% [2].

Цель работы — выявление особенностей структуры синусоидных капилляров и синусоидальных клеток печени у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС.

Материалы и методы. Структура синусоидальных клеток печени была изучена у 14 пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС (8 мужчин, 6 женщин, средний возраст составил 33,4±6,5 года). Диа-

гноз ВИЧ-инфекции и ХГС верифицирован стандартными лабораторными методами (ИФА, иммунный блотинг, ПЦР) с учетом клинико-эпидемиологических данных. В зависимости от клинической стадии ВИЧ-инфекции (классификация ВОЗ, 2006) пациенты распределились следующим образом: 1-я стадия — 6 (42,8%) пациентов, 2-я стадия — 4 (28,6%), 3-я стадия — 4 (28,6%). Подготовку биоптатов печени для электронно-микроскопического исследования проводили по стандартной методике. Препараты изучали в световом микроскопе и выбирали однотипный участок из интермедиальной области дольки для детального изучения ультраструктурных изменений. Ультратонкие срезы (35 нм), контрастировали 2%-м раствором уранилацетата на 50%-м метаноле и цитратом свинца по E.S. Reynolds. Электронно-микроскопические препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (Япония) при увеличениях 5000–20000 при ускоряющем напряжении 80 кВт. Для получения снимков использовался комплекс из вмонтированной цифровой камеры Olympus MegaView III (Германия) и программы для обработки изображений iTEM.

Для подготовки ультратонких срезов кусочки печени фиксировались в смеси формальдегида и параформальдегида, глютаральдегида на фосфатном буфере pH 7,4 с последующей постфиксацией в 1%-м растворе осмия на фосфатном буфере. Из блоков ткани, залитой в смесь бутилметилметакрилатов, готовили полутонкие срезы толщиной 0,5–1,0 мкм и окрашивали азуром II, метиленовым синим, основным фуксином.

Иммуногистохимические исследования выполнены в парафинизированных препаратах печени с использованием моноклональные мышиные антитела anti-HIV p24, Dako Cytomation. Оценка результатов ИГХ проводилась на световом микроскопе (увеличение 100, 200, 400) в 6 случайных полях зрения. Оценивалась локализация окрашивания в клетках, процент и интенсивность положительно окрашенных клеток. Степень экспрессии маркера выражалась в баллах: 0 баллов — негативное окрашивание, 1 балл — слабая интенсивность, 2 балла — умеренная, 3 балла — резко выраженная интенсивность.

Результаты и их обсуждение. В 13 из 14 исследованных биоптатов пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС регистрировался пелиоз (расширение синусоидных капилляров), сопровождаемый стазом эритроцитов (рисунок 1A), а в ряде случаев тромбоцитов. При этом у 13 пациентов отмечалась закупорка просветов синусоидов крупными электронно-светлыми, полиморфными вакуолями, содержащими зернистую субстанцию (рисунок 1B). Данные признаки указывали на нарушение микроциркуляции в синусоидах печени.

В синусоидных капиллярах выявлялись многочисленные, плотно контактирующие СКП, в т. ч. КК, ПК, а также эритроциты, лимфоциты, гранулярные лейкоциты, плазматические клетки (рисунок 2C, 2D), фрагменты цитоплазматических органелл. Нередко в просветах синусоидов выявлялись апоптозные тельца, что указывает на активацию иммунопатологических реакций в синусоидах печени при коинфекции ВИЧ/ВГС.

При изучении ультраструктуры ЭКС в группе наблюдения у всех пациентов отмечены ее изменения. ЭКС отличались крупным телом, крупным фрагментированным ядром и истонченными отростками. Ядра характеризовались периферической концентрацией конденсированного хроматина и компактным ядрышком. В цитоплазме ЭКС выявлялись единичные митохондрии и элементы гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума, идущего параллельно клеточной мембране, немногочисленные компоненты пластинчатого комплекса, а также плотные тельца, однородные по размеру. При изучении ультраструктуры ЭКС у пациентов в группе наблюдения часто наблюдался отек и усиленное везикулообразование под гладкой мембраной, обращенной в просвет синусоида, либо в пространство Диссе. При этом цитоплазматические микропиноцитозные везикулы имели краевое распределение, что приводило к увеличению поверхности плазмалеммы клеток. Местами регистрировалось формирование булавовидных полимембранных образований на поверхности ЭКС, обращенной в синусоид (рисунок 1D).

В ряде случаев имело место отложение электронно-плотного материала на цитомембране ЭКС, приводящего к капилляризации синусоидов. В участках печеночной дольки с явлениями капилляризации синусоидов выявлялись ЭКС, ядра которых подвергались фрагментации в результате глубоких инвагинаций кариолеммы (рисунок 1C). Особенностью морфологии ЭКС человека является пористость мембран ЭКС за счет многочисленных отверстий и отсутствие базальной мембраны, что позволяет осуществлять функцию фильтрации и свободную диффузию растворимых ве-

ществ небольшого размера между кровью и пространством Диссе. ЭКС у здоровых лиц осуществляют пиноцитоз многих лигандов (гликопопротеинов, компоненты экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), иммунных комплексов, трансферина, церуллоплазмина) и способны функционировать как антигенпрезентирующие клетки (АПК), секретируют ряд цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6), эйкосоноидов, эндотелин-1, нитрат оксида, некоторые компоненты ЭЦМ [2, 3]. Капилляризация синусоидов, отмеченная у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС, приводила к нарушению транскапиллярного обмена, пластического и энергетического обеспечения гепатоцитов. Данный факт подтверждался наличием различной степени выраженности изменений гепатоцитов у всех пациентов в группе наблюдения: стеатоза, деструкции митохондрий и ядер, активации ГлЭС, снижения активности ГрЭС и пластинчатого комплекса, гиперплазии вторичных лизосом и резидуальных телец.

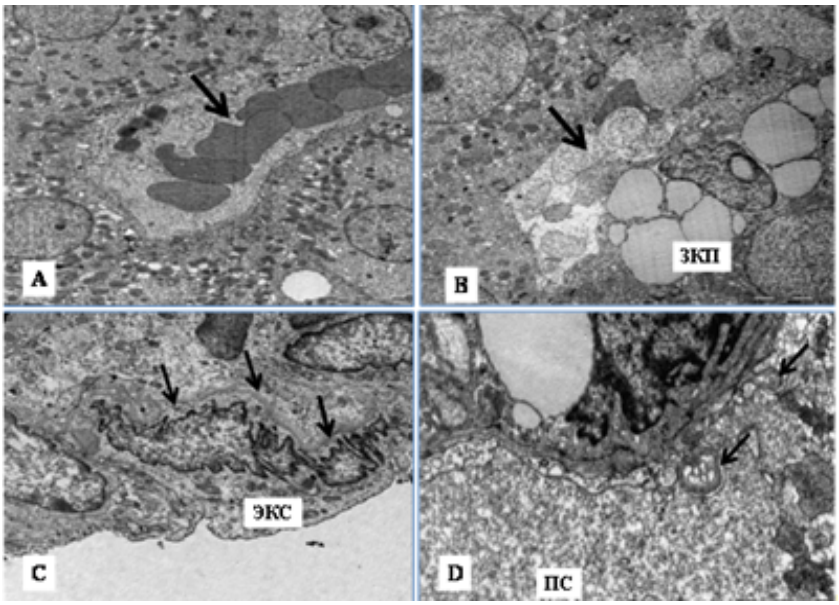


Рисунок 1 — Ультраструктура синусоидов печени и ЭКП: А — агрегация эритроцитов (стрелка) в просвете синусоида х5000; В — окклюзия просвета синусоида полиморфными электронно-светлыми вакуолями (стрелка); С — фрагментация ядра эндотелиальной клетки в результате глубоких инвагинаций кариолеммы. Субэндотелиальное отложение материала повышенной электронной плотности (капилляризация синусоида — стрелки) — х8000; D — булавовидные полимембранные образования на поверхности ЭКС (х15000); ПС — просвет синусоида печени; ЗКП — звездчатая клетка печени (клетка Ито); ЭКС — эндотелиальная клетка синусоида

При изучении структуры КК пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС по данным световой микроскопии полутонких срезов печени в синусоидах печени определялись активированные КК, содержащие большое количество фагосом (рисунок 2А). КК располагались в просвете синусоида, характеризовались относительно крупным размером, наличием звездчатых отростков, бобовидной формой ядра, наличием лизосом в цитоплазме. При этом КК характеризовались большим размером тела клетки, а их ядра содержали разреженный (не концентрированный) хроматин. В цитоплазме части КК были обнаружены характерные множественные мультивезикулярные включения (МВВ), представленные везикулами и вакуолями округлой формы, различного диаметра, густо распределенными в цитоплазме клеток (рисунок 2А). Наряду с описанными клетками у всех ВИЧ-инфицированных пациентов встречались КК без мультивезикулярных включений.

Доказано, что КК инфицируются на ранних стадиях ВИЧ-инфекции. Существует два варианта инфицирования КК: продуктивная и латентная ВИЧ-инфекция. При латентной инфекции КК инфицирована ВИЧ, однако вирус не размножается, т. к. находится в латентном состоянии. При продуктивной инфекции, благодаря активности протеина Nef, который предотвращает деструкцию компонентов ВИЧ-1 в фагосомах, происходит размножение и накопление ВИЧ в цитоплазме КК. При продуктивной инфекции КК высокоустойчивы к цитопатическому действию ВИЧ. Таким образом,

КК являются своеобразным «инкубатором» для ВИЧ, при этом КК распространяют ВИЧ, инфицируя клетки печени, «активируют» различные сигнальные пути, оказывают паракринные эффекты на другие клетки печени [4, 5].

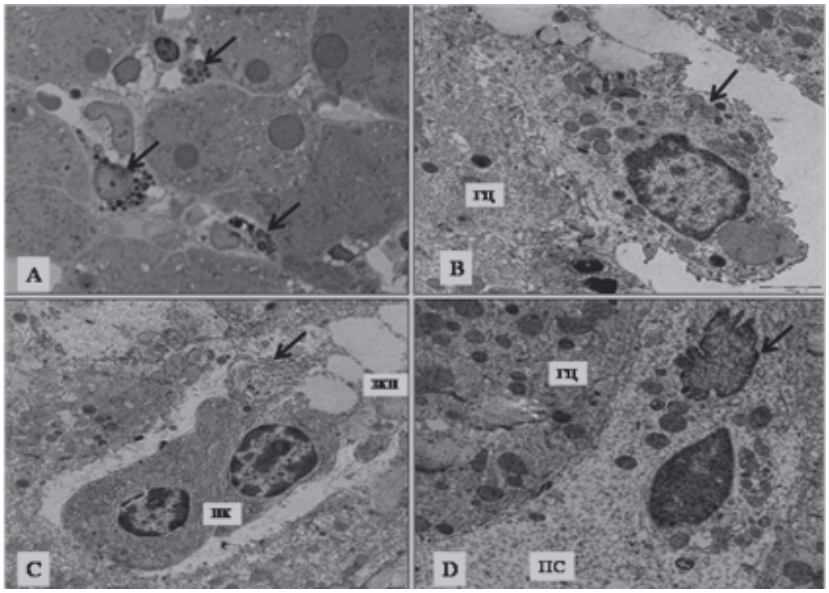


Рисунок 2 — Структура клеток Купфера у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС: А — клетки Купфера (стрелки) в просвете синусоида (полутонкие срезы, окраска азур II) Об. 100, ок. 10.; В — клетка Купфера в просвете синусоида печени (стрелка), х10000; С — плазматические клетки в контакте с клеткой Купфера (стрелка) и ЗКП — х6000; D — контакт клетки Купфера (стрелка) с агрессивным лимфоцитом (х10000); ПС — просвет синусоида печени; ГЦ — гепатоцит; ПК — плазматические клетки; ЗКП — звездчатая клетка печени (клетка Ито)

Для подтверждения наличия ВИЧ в КК были выполнены иммуногистохимические исследования в парафинизированных препаратах печени с определением экспрессии антигена р24 ВИЧ в цитоплазме КК 3-х ВИЧ-инфицированных пациентов из группы исследования (рисунок 3).

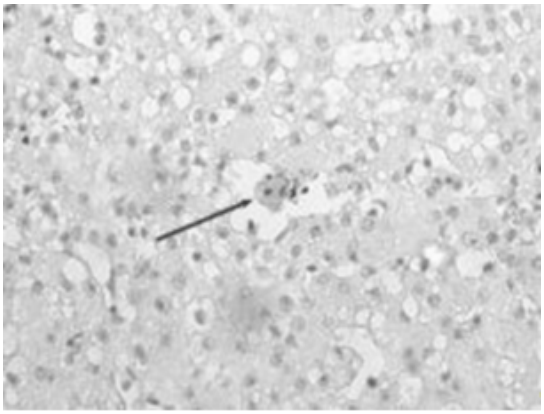


Рисунок 3 — Умеренно выраженная экспрессия антигена р24 ВИЧ в цитоплазме клетки Купфера (стрелка) и слабо выраженная экспрессия антигена р24ВИЧ в цитоплазме гепатоцитов ВИЧ-инфицированного пациента Лк., 47 лет. Тонкой стрелкой показана звездчатая клетка печени (клетка Ито). Окраска азур II-основной фуксин. Световая микроскопия (х600)

Таким образом, было подтверждено наличие продуктивной ВИЧ-инфекции КК у пациентов, у которых определялись характерные МВВ при световой микроскопии.

Электронно-микроскопическое исследование КК также выявляло существенную активацию КК, что проявлялось в виде гиперплазии и гипертрофия клеток, содержащих многочисленные лизосомы, фагосомы и мелкие электронно-плотные гранулы (рисунок 2B). Как правило, макрофаги тесно взаимодействовали с гепатоцитами, в которых отмечались глубокие деструктивные изменения внутри клеток и в окружающем микрососудистом русле. Ядра большинства КК характеризовались глубокими инвагинациями кариолеммы вплоть до фрагментации. Часто определялись КК, у которых исчезали выросты и складки, наблюдался распад плазматической мембраны и, как следствие, выход внутриклеточного содержимого в окружающее пространство (рисунок 2C).

Нередко КК и другие СКП находились в тесном топографическом контакте с плазматическими клетками (рисунок 2C). Кроме того, наблюдался контакт макрофагов с агрессивными лимфоцитами (рисунок 2D) — один из морфологических признаков активации иммунных реакций в печени [4].

При изучении структуры ЗКП у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС отмечалась гиперплазия данных клеток, большинство из которых отличались обилием липидных включений различных размеров, минимумом органелл и полигональным ядром, сдавленного липидными каплями. Существенных изменений в структурной организации ЗКП не наблюдалось, лишь в отдельных случаях имело место слияние липидных капель (рисунок 4A). У всех пациентов наряду с ЗКП, перегруженными липидными включениями, достаточно часто обнаруживались клетки, тело и ядра которых приобретали вытянутую форму, что было сопряжено с уменьшением в их цитоплазме липидных включений и свидетельствовало об активации данных ЗКП (рисунок 4B и 4C).

Известно, что активированные КК обладают паракринным эффектом на ЗКП, т. к. они выделяют множество растворимых агентов, таких как цитокины, трансформирующий фактор роста бета (TGF-β), ростовой фактор тромбоцитов (PDGF), и TNF-α, свободные радикалы кислорода и другие факторы, которые способны активировать ЗКП [5].

В нормальных состояниях ЗКП остаются неактивными, продуцирующими небольшое количество экстрацеллюлярных мембран, таких как ламинин и коллаген типа IV. Активированные ЗКП продуцируют большое количество эллектронно-плотного экстрацеллюлярного матрикса (в т. ч. коллаген I), что проявляется в виде феномена капилляризации синусоидов и свидетельствует об индукции фиброгенеза в печени [5].

Перикапиллярный фиброз различной степени выраженности был отмечены у всех пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС и проявлялся либо в виде сформированных крупных пучков фибрилл коллагеновых волокон, либо в виде массивных отложений в пространстве Диссе волокнистой массы, представляющей собой набухшие и потерявшие периодическую исчерченность коллагеновые волокна (рисунок 5D).

Имели место различные варианты клеточной кооперации ЗКП: с лимфоцитами (рисунок 4D), с пролиферирующими плазматическими клетками (рисунок 2C), с клетками, содержащими крупные гранулы (вероятно ПК).

В настоящее время доказано, что несмотря на низкую экспрессию CD4 рецептора на поверхности ЗКП, ВИЧ может инфицировать активированные ЗКП по CD4+ независимому механизму. В условиях коинфекции ВИЧ/ВГС поражение печени ВГС или другими этиологическими агентами ведет к активации ЗКП, что создает условия для их инфицирования ВИЧ [5].

После активации ЗКП демонстрируют свойства профессиональных АПК и у них появляется возможность эндоцитоза внешних частиц, а также возможность стимулировать пролиферацию Т-лимфоцитов. ВИЧ-инфицированные ЗКП способны передавать вирусы восприимчивым CD4+ лимфоцитам посредством межклеточных контактов. Возможный механизм CD4-независимой инфицирования ВИЧ ЗКП связывают с использованием альтернативных рецепторов входа в клетки как C-type lectins, как было описано для ДК, а также путем рецептор-независимого эндоцитоза [5].

У большинства пациентов (13 из 14) отмечены выраженные изменения со стороны сосудистого полюса гепатоцита: укорочение и редукция микроворсинок, отек и сглаживание синусоидальной поверхности, сужение пространства Диссе (рисунок 5A).

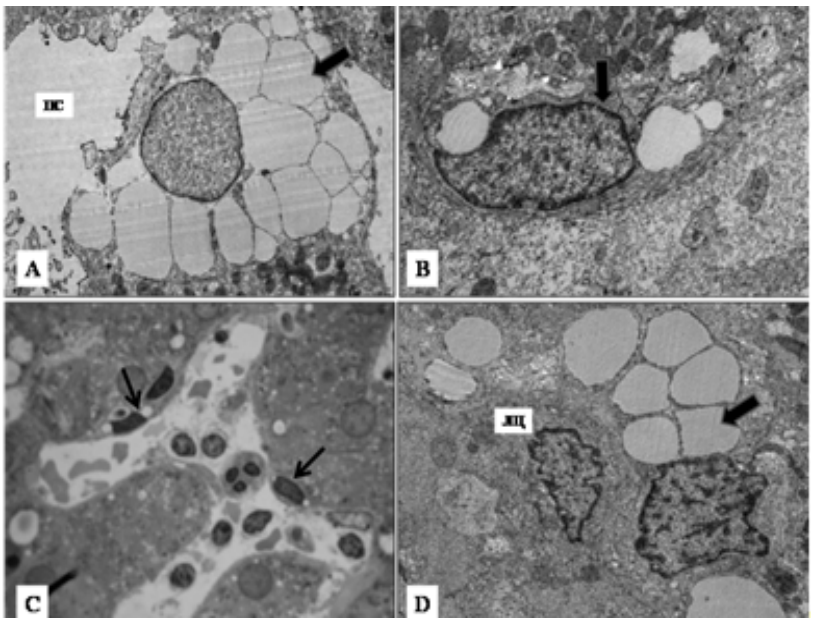


Рисунок 4 — Структура звездчатых клеток печени у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС: А — ЗКП, перегруженная липидными включениями (стрелка), х8000; В — ЗКП (стрелка) с небольшим содержанием липидных включений (активные), х10000; С — активированные ЗКП (показаны стрелками) в центральной зоне ацинуса печени. Полутонкий срез, окраска: азур-фуксин. Об. 100, ок. 10.; D — контакт ЗКП и лимфоцита, х10000; ПС — просвет синусоида; ЛЦ — лимфоцит

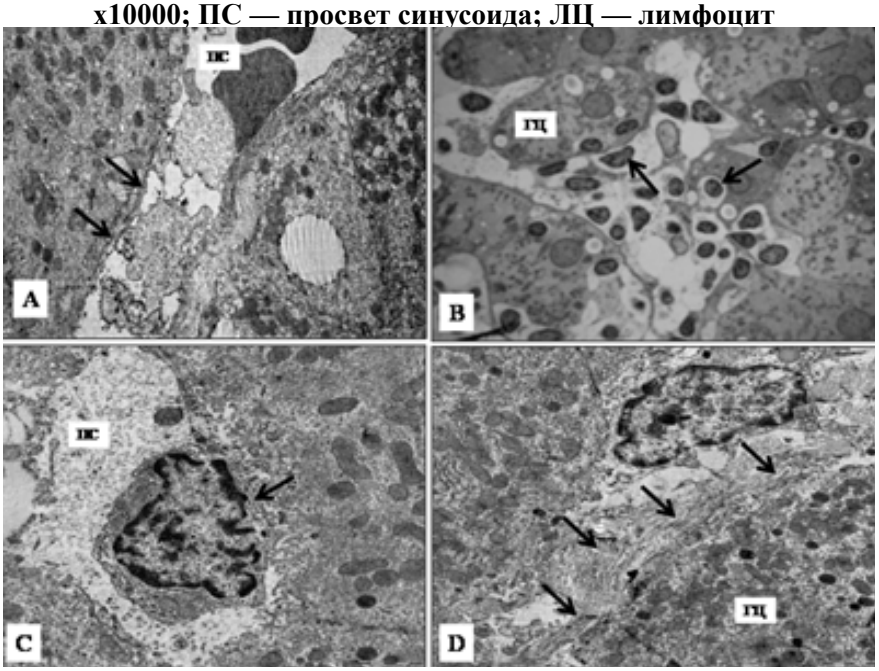


Рисунок 5 — Структура синусоидов печени у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС: А — отек на сосудистом полюсе гепатоцитов, редукция микроворсинок, сужение пространства Диссе (стрелки), х8000; ПС — просвет синусоида; В — периполез цитотоксических лимфоцитов (стрелки) и иммунный цитолиз гепатоцитов в центральной зоне ацинуса печени. Полутонкий срез, окраска: азур-фуксин. Об. 100, ок. 10; С — контакт лимфоцита (стрелка) с гепатоцитом (периполез), х10000; D — фиброз в пространстве Диссе, х10000; ПС — просвет синусоида; ГЦ — гепатоцит

В ряде случаев регистрировалось проникновение в перикапиллярное пространство эритроцитов, лимфоцитов (периполез), их тесный контакт с гепатоцитами (рисунок 5B и 5C) с одновременным увеличением количества коллагеновых волокон в пространстве Диссе (5D).

Заключение. У пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС установлены выраженные нарушения микроциркуляции в синусоидах печени, что проявлялось окклюзией синусоидов печени электронно-плотными массами и вакуолями, агрегацией в них эритроцитов и тромбоцитов, сужением пространства Диссе.

Структурные изменения СКП приводят к нарушению транскапиллярного обмена, пластического и энергетического обеспечения гепатоцитов, активации иммунных реакций в печени, ускорению процессов фиброзообразования.

Морфологическими признаками активации иммунных реакций в печени пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС являются: активация клеток Купфера, звездчатых клеток печени, дегенеративно-дистрофические изменения эндотелиоцитов; капилляризация синусоидов и формирование перикапиллярного фиброза; межклеточные кооперации синусоидальных клеток с цитотоксическими лимфоцитами и плазматическими клетками; периполез лимфоцитов. Наличие в цитоплазме клеток Купфера мультивезикулярных включений свидетельствует о инфицировании ВИЧ данных клеток.

Литература

1. Ивашкин, В.Т.Механизмы иммунной толерантности и патологии печени / В.Т. Ивашкин // Росс. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2009. — № 2. — С. 2–13.

2. McCuskey, R.S. The Hepatic Microvascular System in Health and Its Response to Toxicants / R.S. McCuskey // Anatom. Rec. — 2008. — Vol. 291. — P. 661–671.

3. Primary cultures of endothelial cells from the human liver sinusoid are permissive for human immunodeficiency virus type 1 / A. Steffan [et al.] // PNAS USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 1582–1586.

4. Permissivity of primary cultures of human Kupffer cells for HIV-1 / M.P. Schmitt [et al.] // AIDS Res. Hum. Retrovirus. — 1990. —Vol. 6, № 8. — P. 987–991.

5. HIV and HCV Cooperatively Promote Hepatic Fibrogenesis via Induction of Reactive Oxygen Species and NFκB / W. Lin [et al.] // J. Biol. Chem. — 2011. — Vol. 286. — P. 2665–2674.

SPECIFIC STRUCTURE OF SINUSOIDAL LIVER CELLS IN PATIENTS WITH HIV/HCV CO-INFECTION

Matsiyeuskaya N.V., Tsyrkunov V.M., Kravchuk R.I., Andreev V.P.

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

The aim of study: to revile the structural changes of liver sinusoidal cells in patients with HIV/HCV coinfections.

Structure of sinusoidal liver cells was studied in 14 patients with HIV/HCV coinfections by light and electronic microscopy examination of liver tissue obtained from patients by liver biopsy.

Hepatic microcirculatory disturbances, significant structural changes in sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells, activation of immune reactions in the liver, acceleration of fibrogenesis, affection of hepatocytes metabolism by different expression were revealed in all patients with HIV/HCV coinfections.

Keywords: HIV, HCV, electronic microscopy, sinusoidal endothelial cells Kupffer cells, stellate liver cells, fibrogenesis.

Поступила 23.06.2014

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНТАМИНАЦИИ КОРНЕВЫХ КАНАЛОВ ЗУБОВ

Медведева К.В., Манак Т.Н.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Реферат. Полученные результаты исследования глубины контаминации дентинных канальцев корневых каналов зубов с диагнозом «хронический апикальный периодонтит» до и после механической обработки разными системами с помощью разработанного метода на эндоблоках дают возмож-

ность проводить дифференциальную диагностику с другими диагнозами и проводить качественное эндодонтическое лечение, предупредить рецидивы данного заболевания.

Ключевые слова: стоматология, корневые каналы, контаминация, апикальный периодонтит.

Введение. Устранение микроорганизмов из системы корневых каналов (КК) является одной из важнейших задач эндодонтического лечения и оказывает существенное влияние на его результаты. Медикаментозная обработка КК дополняет механическую обработку и позволяет повысить качество дезинфекции [1]. Дезинфекция — это устранение микроорганизмов с помощью физико-химических средств. Она представляет собой один из этапов эндодонтического лечения, во время которого производится орошение канала растворами антисептиков с целью уничтожения микроорганизмов, находящихся в его просвете, ответвлениях и пристеночном дентине [2]. Дезинфекция применяется при лечении инфицированных зубов и заключается в механическом удалении тканей и распада, содержащих микроорганизмы, промывании каналов и их заполнении временным пломбировочным материалом, обладающим антисептическим действием [3, 4]. Микрофлора корневой системы представлена микроорганизмами различных родов и семейств, как правило, в ассоциациях, среди которых наиболее часто встречаются стафилококки, стрептококки, фузобактерии, бактероиды, вейлонеллы и др. Ассоциативная флора продуцирует ферменты, эндотоксины, которые препятствуют процессам фагоцитоза и хемотаксиса в периодонте и ингибируют активность препаратов применяемых для антисептической обработки [5]. Медикаментозная обработка собой один из этапов эндодонтического лечения, во время которого производится орошение канала растворами антисептиков с целью уничтожения микроорганизмов, находящихся в его просвете, ответвлениях и пристеночном дентине [6]. Проведение механической обработки КК снижает количество микроорганизмов в 100–1000 раз, однако не позволяет очистить канал полностью. В процессе инструментальной обработки КК на поверхности дентина формируется «смазанный слой» толщиной 1–6 мкм, а глубины проникновения — 50 мкм [7]. Этот слой содержит дентинные опилки, фрагменты пульпы и микроорганизмы, являясь для них питательной средой. Смазанный слой уменьшает диаметр КК, нарушает прилегание «корневой пломбы» к стенкам и служит источником вторичного инфицирования периапикальных тканей [8]. Вышеназванное диктует необходимость его удаления. Медикаментозная обработка проводится при помощи ирригации, которая позволяет растворить органические компоненты «смазанного слоя», антисептически воздействует на микроорганизмы, а также механически промывает КК от инфицированного содержимого. На сегодняшний день на стоматологическом рынке широко представлены различные системы для механической обработки КК: ручные, машинные (ротационные), а также ультразвуковые и звуковые эндодонтические инструменты. Большое значение для клинической стоматологии имеет глубина проникновения и видовое разнообразие патогенных микроорганизмов КК с диагнозом «хронический апикальный периодонтит после механической и медикаментозной обработки».

Цель работы — определение глубины контаминации дентинных канальцев корневых каналов зубов с диагнозом «хронический апикальный периодонтит до и после механической обработки разными системами».

Задачи: 1. Определить видовое разнообразие микрофлоры корневого канала до механической обработки. 2. Выявить обсемененность КК до и после механической обработки. 3. Установить глубину контаминации КК зубов при хроническом апикальном периодонтите до и после механической обработки КК ручным способом, системой Protaper Universal, Protaper Next и системой Wawe One. 4. Статистическая обработка.

Материалы и методы. Этапы исследования были разделены до проведения механической обработки и после механической обработки КК. До механической обработки КК проводилось микробиологическое исследование для идентификации микроорганизмов, определения общей микробной обсемененности третей КК и загрязненности внутренней поверхности канала. Декальцинацию зубов проводили для изучения глубины контаминации КК. После механической обработки корневой системы также определяли глубину контаминации. Экстрагированные зубы верхней и нижней челюсти с диагнозом хронический апикальный периодонтит (110 КК) были разделены на 5 групп таким образом, чтобы в каждой оказалось по 25 КК с разными методами обработки и 10 КК в группе контроля. В группе сравнения (№ 1) проводилось удаление содержимого канала ручным способом + промывание дистиллированной водой. В группе № 2 проводилось удаление содержимого канала +

механическая обработка К-римерами, К-, Н-файлами по методике «Step back» + промывание 3%-м гипохлоритом натрия + обработка жидким 17%-м ЭДТА. Общее время ирригации остается идентичным традиционной технике обработки. В группе № 3 проводилось удаление содержимого канала + механическая обработка корневого канала с использованием системы ProTaper Universal до финишного инструмента F2 (25/08) + промывание 3%-м гипохлоритом натрия после каждого инструмента + обработка жидким ЭДТА. В группе № 4 проводилось удаление содержимого канала + механическая обработка корневого канала с использованием системы ProTaper Next до финишного инструмента X2 (25/08) + промывание 3%-м гипохлоритом натрия после каждого инструмента + обработка жидким ЭДТА. В группе № 5 проводилось удаление содержимого канала + механическая обработка КК с использованием системы Wave One Primary (25/08) + промывание гипохлоритом натрия + обработка жидким ЭДТА.

По разработанному нами методу определяли объем контаминированных тканей дентина на универсальных эндоблоках после механической обработки разными системами с помощью С-силиконового оттискного материала и микрометра. Двадцать пять эндоблоков были разделены на 5 групп в зависимости от конструктивных особенностей используемых инструментов: группа контроля, ручные инструменты, ProTaper Universal, ProTaper Next, Wave One Primary. В группе № 1 (контроль) проводилось удаление содержимого канала ручным способом и промывание дистиллированной водой. В группе № 2 (К-римеры, К-, Н-файлы) проводилось удаление содержимого канала и механическая обработка по методике «Step back» + промывание 3%-м гипохлоритом натрия + обработка жидким 17%-м ЭДТА. В группах №№ 3 (ProTaper Universal), 4 (ProTaper Next) и 5 (Wave One Primary) проводилось удаление содержимого канала и механическая обработка корневого канала с использованием системы до финишных инструментов (25/08) с промыванием 3%-м гипохлоритом натрия после каждого инструмента и обработкой жидким ЭДТА. После обработки в КК эндоблоков вносили С-силиконовый оттискной материал. Затем извлекали силиконовые КК и производили измерения с помощью микрометра в цервикальной, средней и апикальной третях. С помощью полученных данных можно говорить о количестве препарированных тканей дентина после механической обработки различными системами.

Оценка загрязненности внутренней поверхности КК рассчитывалась по формуле:

$$N = K \times (A/a),$$

где N — чистый/грязный квадрат;

K — коэффициент, показывающий во сколько раз площадь счетной камеры меньше 1 см ^{2};

A — количество квадратов в счетной камере;

a — количество квадратов, на которых производился отсчет.

Микробиологическое исследование включало посев содержимого КК с диагнозом «хронический апикальный периодонтит» на желточно-солевой агар, кровяной агар с азидом натрия, шоколадный агар с линкомицином и лактобакагар. Идентификация всех выделенных штаммов осуществлялась в соответствии с определителем Берджи (Дж. Хоулт, 1997). Полученные препараты содержимого КК зубов по Нейссеру и Грамму изучали при увеличении до x100 на оптическом микроскопе Technival (Carl Zeiss Jena, Германия), проводили тест Грегерсена. Для ПЦР-диагностики забор материала из КК осуществлялся с помощью трех стерильных бумажных штифтов, каждый штифт погружался в канал на 10 с. Забранный материал помещался в герметично закрытый контейнер с транспортной средой и доставлялся в лабораторию. Выявление микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической схемой детекции осуществлялось с использованием диагностических тест-систем «МультиДент» (ООО «Гентех», РФ) в соответствии с инструкцией производителя. После декальцинации получены срезы КК для изучения глубины контаминации дентинных канальцев до и после механической обработки КК с помощью оптического микроскопа Technival (Carl Zeiss Jena, Германия).

Оценку общей микробной обсемененности проводили по числу микробных клеток, обнаруживаемых в одном поле зрения при микроскопии с иммерсией. Интерпретацию рассчитывали по 4-балльной системе: 1 балл (до 10 микробных клеток в поле зрения) — минимальное количество; 2 балла (от 11 до 100 микробных клеток в поле зрения) — умеренное количество; 3 балла (от 100 до

1000 микробных клеток в поле зрения) — большое количество; 4 балла (более 1000 микробных клеток в поле зрения) — массивное количество.

Таким образом, в исследовании использованы следующие методы: декальцинация зубов, оценка внутренней поверхности КК, окраска бактерий по методу Грамма, тест Грегерсена, микробиологической метод, метод Nugent-оценка общей микробной обсемененности, световая микроскопия, ПЦР-диагностика, ручной метод препарирования КК зубов, машинный метод препарирования КК зубов по технологии Protaper, машинный метод препарирования КК зубов по технологии Wave One.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью однофакторного дисперсионного анализа Anova (Analysis of Variation — STATISTICA), оценки достоверности разности сравниваемых величин по U-критерию Манна–Уитни, непараметрического однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса. Биометрический анализ производился с использованием пакетов Statistica 6.0, возможностей программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. При анализе внутренних поверхностей КК, полученных с помощью микроскопии при увеличении x100, установлено, что КК в группе № 1 (контроль) были не очищены от дебриса в 87% случаев, в группе № 2 внутренние поверхности КК были не очищены в 11 (37%) случаях, больше всего очищенных участков каналов оказались в группе № 5 (система Wave One) — 96%, в группе № 3 (система ProTaper Universal) — 19 (63%) и в группе № 4 (система ProTaper Next) — 94%. Биотип корневых каналов зубов с хроническим апикальным периодонтитом содержит разнообразную микробиоту, среди которых грам-отрицательные, грам-положительные, анаэробы и факультативные микроорганизмы. Идентифицировано 20 родов, 24 вида, 14 таксонов.

С использованием для расчета формулы загрязненности КК установлено, что внутренняя поверхность КК группы № 1 (контроль) имеет только 20% чистых квадратов в коронковой трети каналов и 80% — грязных квадратов в основном средней и апикальной трети КК, в группе № 2 в 43% случаев выявлены чистые квадраты (коронковая треть КК, средняя треть КК), в 57% — грязные квадраты (апикальная треть КК), в группе № 3 — в 72% КК зафиксированы чистые квадраты (коронковая треть КК, средняя треть КК), в 28% — грязные квадраты (апикальная треть КК), в группе № 4 (система Wave One) оказалось больше всего чистых квадрантов — 98% (коронковая треть КК, средняя треть КК) и только 2% грязных квадратов в апикальной трети (таблица 1).

Таблица 1 — Показатели загрязненности третей корневых каналов

Группа исследования	Треть корневого канала, мкм		
	Цервикльная, мкм	Средняя треть, мкм	Апикальная треть, мкм
I (контроль)	10,5±0,09	6,5±0,16	3,5±0,04
II (ручные инструменты)	11,5±0,11	9,5±0,05	5,5±0,06
III (ProTaper Universal)	13,0±0,14	12,5±0,03	6,0±0,08
IV (ProTaper Next)	16,5±0,04	15,0±0,05	9,0±0,14
V (система Wave One)	14,0±0,04	15,0±0,06	7,5±0,13

Результаты сравнительного анализа глубины контаминации корневых каналов после использования различных методов обработки приведены ниже (таблица 2).

Таблица 2 — Глубина контаминации корневых каналов

Группа исследования	Трети КК, мкм		
	Цервикльная	Средняя	Апикальная
КК до обработки	27,0	17,0	11,0
I (контроль)	27,0	17,0	11,0
II (ручные инструменты)	25,0	14,0	10,0
III (ProTaper Universal)	24,0	13,0	9,0
IV (ProTaper Next)	19,0	10,0	7,0
V (система Wave One)	26,0	14,0	8,0

В ходе микробиологического исследования идентифицировано 20 родов, 24 вида и 14 таксонов. К анаэробам относились 35 грам-отрицательных родов, 15 грам-положительных, 23 вида/таксона, к факультативным микроорганизмам — 25 видов/таксонов.

Таблица 3 — Видовое разнообразие контаминации корневых каналов с диагнозом «хронический апикальный периодонтит»

Грам-отрицательные бактерии		Грам-положительные бактерии	
Анаэробные	Факультативные	Анаэробные	Факультативные
Палочки		Палочки	
Dialister *Dialister sp.* *D. invisus*	***Capnocytophaga*** *C. gingivalis*	***Actinomyces*** *Actinomyces sp.* *A. gerencseriae,* *A. odontolyticus*	***Actinomyces*** *A. naeslundii*
Porphyromonas *Porphyromonas sp.* *P. endodontalis,* *P. gingivalis*	***Aggregatibacter*** *Aggregatibacter spp.* *A. Actinomycetem-comitans*	***Pseudoramibacter*** *P. alactolyticus*	***Corynebacterium*** *C. matruchotii*
Tannerella *Tannerella sp.* *T. forsythia*		***Eubacterium*** *E. infirmum,* *E. nodatum,* *E. minutum*	***Lactobacillus*** *Lactobacillus sp.* *L. salivarius*
Prevotella *Prevotella sp.* *Prevotella sp.* *P. intermedia,* *P. denticoia*			
Кокки		Кокки	
Veillonel *V. parvulala*	***Neisseria*** ***Neisseria spp.*** ***N. mucosa***	***Lactobacillus*** ***Lactobacillus sp.***	***Streptococcus*** *Streptococcus sp.* *S. mitis,* *S. oralis*
Anaeroglobus *Anaeroglobus spp.*		***Peptostreptococcus*** *P. stomatis*	
Megasphaera *Megasphaera sp.*		***Streptococcus*** *Streptococcus sp.* *Streptococcus sp.* *S. intermedius*	

Пародонтопатогенная флора, имеющая значение для развития заболеваний пародонта, присутствовала в содержимом корневых каналов у 92,5% человек с заболеванием апикального периодонта. Из пародонтопатогенных видов микроорганизмов на первом месте по выявляемости при всех нозологических формах эндодонтической патологии стоял *P. gingivalis* (47,17±8,45%), обнаруженный у 25 человек. На втором месте стоит *A. actinomycetemcomitans* и *Pr. intermedia*, выявленные в 28,30±7,73 и 26,42±7,56% случаев соответственно (таблица 4).

Таблица 4 — Частота выявления отдельных пародонтопатогенных микроорганизмов среди пациентов с заболеваниями апикального периодонтита

Микроорганизм / Диагноз		*P. intermedia*	*B. dentium*	*T. denticola*	*A. actino-mycetem-comitans*	*P. gingivalis*
О. периодонтит (9)	n	3	2	1	3	3
	%	30,33±15,71	22,22±13,86	11,11±10,48	30,33±15,71	30,33±15,71

Окончание таблицы 4

Х. периодонтит (34)	n	8	6	8	10	18
	%	23,53±7,27	17,65±6,04	23,53±7,23	29,41±7,81	53,94±8,56
Все (43)	n	14	11	12	15	25
	%	26,42±7,56	18,87±6,71	22,64±7,18	28,30±7,73	47,51±8,45

По результатам сравнительного анализа степени распространенности пародонтопатогенных возбудителей значимо чаще выделялся *P. gingivalis*, самые высокие показатели зарегистрированы для хронического апикального периодонтита (53,94±8,56%). Анализ микробных ассоциаций показал, что в отличие от заболеваний маргинального пародонта при заболеваниях апикального периодонта чаще встречались 1 или 2 представителя (42 и 40% случаев соответственно), 4 и 5 представителей флоры не было определено ни у одного из обследованных, 3 представителя определено в 8% случаев (всего у 4 из 53 пациентов).

Таблица 5 — Частота ассоциаций периодонтопатогенных микроорганизмов

Диагноз	Количество видов микроорганизмов, шт.			
Острый апикальный периодонтит (9)	0	77,78±13,86%	11,11±10,48%	11,11±10,48%
Хронический апикальный периодонтит (34)	11,76±5,52%	38,24±8,44%	41,18±8,44%	8,82±4,46%

Термин моноинфекции для пародонтопатогенной флоры можно было применить для описания острых апикальных периодонтитов (78%, n = 10). У большей части пациентов с заболеваниями пульпы возбудители присутствовали в виде микст-инфекций, при этом количество патогенов, входящих в ассоциацию, составило 2.

Выводы:

1. Контаминация корневых каналов включает 20 родов, 24 вида и 14 таксонов, среди которых 35 грам-отрицательных родов, 15 грам-положительных, 23 таксона — анаэробы и 25 таксонов — факультативные микроорганизмы. Высокая (92,5% случаев) распространенность пародонтопатогенной флоры в содержимом корневого канала позволяет сделать предположение, что данные микроорганизмы играют важную роль в этиологии не только маргинальных периодонтитов, но и в поражениях апикального периодонта.

2. Общая обсемененность КК в цервикальной трети — массивная, в средней трети — большая, в инцизальной — умеренная обсемененность микроорганизмов.

3. Количество препарированного материала эндоблоков в зависимости от метода обработки КК:ручным способом — 0,63 мкм ($p<0,009$), ProTaper Universal — 1,08 мкм ($p<0,002$), ProTaper Next — 1,16 мкм ($p<0,011$), Wave One Primary — 0,008 мкм.

4. Глубина инфицированности КК составляет 27 ($p<0,047$) мкм, в группе сравнения — 27 мкм ($p<0,029$). После механической обработки корневого канала ручным способом — 25 мкм ($p<0,033$), ProTaper Universal — 16 км ($p<0,052$), ProTaper Next — 12 мкм ($p<0,064$), Wave One Primary — 18 мкм.

Литература

1. Берутти, Е. Оценка при помощи сканирующего электронного микроскопа очищающей способности гипохлорита натрия при разных температурах / Е. Берутти, Р. Марини // Дж. Эндод. — 1996. — № 9. — С. 467–470.

2. Гутман, Д.Л. Повторное эндодонтическое лечение с помощью инструментов системы Pro Taper / Д.Л. Гутман // Новости Dentsply. — 2005. — № 11. — С. 28–31.

3. Бризено, Б. Препарирование корневых каналов с использованием механических никель-титановых систем / Б. Бризено // Клин. стоматология. — 2000. — № 3. — С. 28–33.

4. Дубова, М.А. Современные технологии в эндодонтии: учеб. пособие / М.А. Дубова, Т.А. Шпак, И.В. Корнегова. — СПб., 2005. — 96 с.

5. Макеева, И.М. Смазанный слой корневого канала и его удаление / И.М. Макеева, А.Б. Пименов // Эндодонтия Today. — 2002. — № 1–2. — С. 5–9.

6. Апрятин, С.А. Особенности комплекса медикаментозной и инструментальной обработки корневых каналов / С.А. Апрятин, В.И. Митрофанов // Эндодонтия Today. — 2007. — № 2. — С. 64–68.

7. Берутти, Е. Способность проникновения различных ирригантов в дентинные канальцы / Е. Берутти, Р. Марини, А. Ангеретти // Дж. Эндод. — 1997. — № 12. — С. 725–727.

8. Мылзенова, Л.Ю. Критерии оценки качества эндодонтического лечения на этапах его проведения: автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.00.21 / Л.Ю. Мылзенова; ЦНИИ стоматологии. — М., 2002. — 20 с.

KONTAMINATION'S DEFINITION OF ROOT CHANNELS OF TEETH

Medvedeva K.V., Manak T.N.
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The results obtained for depth contamination of dentin tubules of teeth root channels in chronic apical periodontitis before and after machining by different systems, using the method developed on endoblocks, allow carry out differential diagnosis and high-quality endodontic treatment to prevent recurrence of the disease.

Keywords: teeth root canals contamination, microbial species diversity.

Поступила 08.07.2014.

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И ДИАГНОСТИКИ ПНЕВМОЦИСТНОЙ ПНЕВМОНИИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Михед Т.М., Красавцев Е.Л.
Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Реферат. Были проанализированы истории болезни и карты диспансерного наблюдения пациентов учреждения «Гомельская областная инфекционная клиническая больница» и амбулаторные карты пациентов поликлиники г. Светлогорска с установленным диагнозом «пневмоцистная пневмония». Основным критерием диагностики послужила эффективность эмпирически начатого специфического лечения пневмоцистной пневмонии. У 7 человек диагноз был подтвержден только патологоанатомически. В 13,3% случаев число CD4-лимфоциты составило более 200 в мкл. При компьютерной томографии грудной клетки у большинства пациентов отмечались обширные зоны инфильтрации по типу симптома «матового стекла».

Ключевые слова: пневмоцистная пневмония, ВИЧ-инфекция, *Pneumocystis jirovecii*, симптом «матового стекла».

Введение. Проблема ВИЧ/СПИДа — это одна из наиболее актуальных и тревожных проблем здравоохранения Республики Беларусь. В настоящее время уже более 16315 человек в нашей стране инфицированы ВИЧ. В Гомельской области на 1 мая 2014 г. зарегистрировано 7834 случая ВИЧ-инфекции [1].

В связи с неуклонно растущей эпидемией ВИЧ-инфекции в Беларуси врачам разных специальностей придется все чаще сталкиваться с различными поражениями, которые могут развиться у лиц ВИЧ-инфекцией. Нарушения клеточного иммунитета позволяют условно-патогенным микроорганизмам проникать в ткани и вызывать оппортунистические инфекции (ОИ).

ОИ — основная причина поражений и летальных исходов у пациентов со СПИДом. Некоторые ОИ у людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), можно предупредить, проводя им так называемую первичную профилактику. Однако до сих пор многие пациенты узнают о своем ВИЧ-статусе, когда уже установлено или предполагается какое-либо оппортунистическое заболевание.

К числу наиболее значимых вторичных поражений у больных ВИЧ-инфекцией относится пневмоцистная пневмония (ПП) — одно из самых тяжелых заболеваний, которое при отсутствии своевременного лечения может привести к гибели пациента. Диагностика ПП представляет большие трудности из-за отсутствия патогномоничных клинических симптомов, четких критериев и эффективных лабораторных методов. У лиц с ВИЧ-инфекцией развитие пневмоцистной пневмонии обычно наблюдается при уменьшении числа CD4-лимфоцитов (менее 200 в мкл). Тогда же и рекомендуют проводить первичную профилактику пневмоцистной пневмонии у ВИЧ-инфицированных [2, 3]. При подозрении на развитие ПП у пациента с ВИЧ-инфекцией диагноз должен быть установлен на основании комплекса клинических и лабораторных данных.

Наиболее характерными симптомами ПП у данной категории лиц являются: одышка (90–100% случаев); лихорадка (60%); кашель (50%). Одышка как наиболее ранний симптом наблюдается практически у всех больных. Вначале она бывает выражена при умеренной физической нагрузке, в частности во время подъема по лестнице, затем постепенно нарастает и начинает беспокоить больного уже в состоянии покоя [4–8]. Повышение температуры тела может сопровождаться ознобом, потливостью. В начале заболевания обычно наблюдается субфебрильная температура, затем она либо повышается (до 38–39°С), либо остается субфебрильной [5–8]. Кашель при ПП малопродуктивный. В начале болезни характерно навязчивое покашливание из-за ощущения раздражения за грудиной или в гортани. В дальнейшем кашель становится почти постоянным и коклюшеподобным, особенно беспокоит в ночное время. Боль в грудной клетке отмечается значительно реже других симптомов.

При анализе лабораторных показателей следует обращать внимание на повышение суммарной активности ЛДГ и снижение PO_2 крови, что свидетельствует о дыхательной недостаточности; общее содержание белка в сыворотке крови снижено, уменьшается уровень альбуминов, возрастает содержание иммуноглобулинов. Эти признаки, хотя и неспецифичны, но характерны для ПП [4, 9, 10]. При исследовании периферической крови специфических изменений не выявляют. Часто регистрируют изменения, характерные для поздних стадий ВИЧ-инфекции: анемию, лейкоцитопению, тромбоцитопению, повышение СОЭ (всегда) вплоть до 40–60 мм/ч [4].

В связи с вышеизложенным актуальным является изучение особенностей ПП у больных ВИЧ-инфекцией как моноинфекции.

Цель работы — определение особенностей течения и диагностики пневмоцистной пневмонии у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Материал и методы. Были проанализированы истории болезни и карты диспансерного наблюдения пациентов учреждения «Гомельская областная инфекционная клиническая больница» (ГОИКБ) (15 человек) и амбулаторные карты поликлиники г. Светлогорска (15 человек) с установленным диагнозом пневмоцистная пневмония.

Лабораторные показатели — общий анализ крови (эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, лейкоциты, СОЭ), биохимический анализ крови (общий белок, ЛДГ) — определялись общепринятыми методиками [11]. Микологическое исследование ротоглоточной слизи у пациентов проводилось на базе клинико-диагностической лаборатории ГОИКБ. Стерильным тампоном брались мазки с мест поражения и засевались на среды Никерсона. Рост оценивали через 72 ч.

Иммунологический статус (определение CD4-клеток) определяли с помощью аппарата проточного цитофлюориметра FACScan, используя лизирующий раствор и иммуноклональные антитела, вирусную нагрузку — методом ПЦР в лаборатории ГОИКБ и лаборатории отдела профилактики ВИЧ/СПИД Гомельского областного центра гигиены и эпидемиологии и общественного здоровья.

Рентгенологическое исследование и компьютерная томография органов грудной клетки проводились по общепринятым методикам. Статистический анализ полученных данных осуществлялся с помощью методов непараметрической статистики.

Результаты и их обсуждение. Было проанализировано 30 клинических случаев пневмоцистной пневмонии у ВИЧ-инфицированных. В основном это были жители города Светлогорска (70%). Из них 12 женщин и 18 мужчин. Возраст колебался от 21 до 54 лет. Больные аттестованы по ВИЧ-инфекции с 1996 по 2014 гг. В 23% случаев при этом особенности пневмонии явились показанием к обследованию на ВИЧ-инфекцию (4 случая в 2013 г., 3 случая в 2014 г.). Преобладал половой путь инфицирования (57%), также был отмечен парентеральный путь за счет внутривенного введения наркотических веществ в 33% случаев, в 10% случаев путь инфицирования уточнен не был.

Среднее содержание числа CD4-лимфоцитов в мкл составило 168,7±39,7. Необходимо отметить, что у 4 пациентов количество CD4-лимфоцитов превышало 200 в мкл (все находились на лечении в Светлогорской ЦРБ, иммунограмма была сделана не в период эпизода ПП). Вирусная нагрузка отмечалась высокая — 1088322±509709,1 копий РНК в мл. Тромбоцитопении ($169,7±25×10^9$/л) и лейкопении ($5,76±0,9×10^9$/л) в среднем отмечено не было. Однако в 7 случаях была отмечена тромбоцитопения и в 8 лейкопения.

Восемь пациентов умерло, у 7 из них диагноз был подтвержден только патологоанатомически. Один пациент умер с установленным при жизни диагнозом, но поступил поздно в тяжелом состоянии с дыхательной недостаточностью (ДН) III степени, отказавшегося от антиретровирусной терапии.

Основными клиническими проявлениями у 15 пациентов ГОИКБ были: снижение или отсутствие аппетита, слабость, одышка, лихорадка, малопродуктивный кашель. ДН первой степени отмечалась у 5 (33,3%) пациентов, ДН второй степени у 7 (46,6%) пациентов, ДН третьей степени наблюдалась у 2 (13,3%) пациентов, у одного (6,7%) пациента не наблюдалось одышки.

Большинство пациентов до поступления в стационар жаловалось на повышение температуры тела до 38,5°С в течение 1 недели (86,7%), только 2 (13,3%) пациента отмечали повышение температуры свыше 39°С с ознобом по ночам. Такие жалобы, как боль в грудной клетке предъявляли 2 пациента, тошноту — один пациент. Жалобы на кашель были у 10 пациентов. Из них у 7 пациентов кашель отмечался навязчивый сухой, непродуктивный; у 3 пациентов — влажный с трудно отходимой мокротой. У 5 пациентов кашель не наблюдался.

Все пациенты объективно были бледные, отмечалось сухость кожных покровов, большая часть (11 человек) были астенизированы.

У большинства больных отмечались клинические проявления орофарингеального кандидоза (12 пациентов), подтверждено лабораторно высевом *C. albicans* со слизистой ротовой полости в титре 10^6 КОЕ и выше у 9 пациентов.

При осмотре аускультативно не было замечено патологических изменений у 2 пациентов, в остальных случаях отмечалось жесткое дыхание, у одного в сочетании с влажными мелкопузырчатыми хрипами по всем легочным полям, у 8 пациентов выслушивались сухие рассеянные хрипы по всем легочным полям.

В начале заболевания у 2 пациентов при рентгенологическом исследовании легких не было изменений, при повторном исследовании через одну неделю отмечалась картина интерстициальной пневмонии (в нижних отделах с обеих сторон определялось сгущение деформированного рисунка по ячеистому типу, корни расширены, структурны). В остальных случаях отмечались деформация легочного рисунка с прикорневой инфильтрацией, мономорфные мелкоочаговые диссеминации или с двух сторон в средних отделах — усиление легочного рисунка, очаговые тени, корни малоструктурные.

При проведении компьютерной томографии грудной клетки у 10 пациентов отмечались обширные зоны инфильтрации по типу симптома «матового стекла». На этом фоне у 4 пациентов наблюдались тонкостенные кисты от 8 до 20 мм, жидкость не визуализировалась; у одного пациента — кистозные изменения, альвеолит, тотальное поражение легких за счет ретикулярных изменений на фоне «малого стекла» участков консолидации. В верхних долях с двух сторон облаковидные образования типа «бабочки» отмечены в одном случаи.

Только у одного пациента было проведено исследование мокроты на определение *Pneumocystis ijrovecii*. Результат положительный. Остальным пациентам диагноз был выставлен по клинико-рентгенологическим данным, данным КТ-исследования и эмпирически начатому специфическому лечению пневмоцистной пневмонии. Положительный результат уже был отмечен на 3–5-е сут от момента начала терапии, что и явилось окончательным критерием для постановки диагноза пневмоцистная пневмония. Все пациенты до постановки диагноза не получали или не были привержены к специфическому лечению ВИЧ-инфекции (антиретровирусной терапии). Соответственно первичная профилактика не проводилась.

Заключение. Основные клинические проявления при пневмоцистной пневмонии были типичными: снижение или отсутствие аппетита, слабость, одышка, лихорадка, малопродуктивный кашель. ДН третьей степени наблюдалась у 2 пациентов, у одного пациента не наблюдалось одышки.

При аускультации не было замечено патологических изменений у 2 пациентов. При рентгенологическом исследовании отмечались деформация легочного рисунка с прикорневой инфильтрацией, мономорфные мелкоочаговые диссеминации или с двух сторон в средних отделах — усиление легочного рисунка, очаговые тени, корни малоструктурные. Только при повторном исследовании отмечалась картина интерстициальной пневмонии у двух пациентов. При проведении компьютерной томографии грудной клетки у 10 пациентов отмечались обширные зоны инфильтрации по типу симптома «матового стекла». В верхних долях с двух сторон облаковидные образования типа «бабочки» отмечены в одном случаи.

Только у одного пациента была обнаружена *Pneumocystis jirovecii*, т. к. проводилось обследование мокроты. Остальным пациентам диагноз был выставлен по клинико-рентгенологическим

данным, данным КТ-исследования и эмпирически начатому специфическому лечению пневмоцистной пневмонии.

Все пациенты до постановки диагноза не получали или не были привержены к специфическому лечению ВИЧ-инфекции (антиретровирусная терапия).

В 23% случаев при этом особенности пневмонии явились показанием к обследованию на ВИЧ-инфекцию.

Литература

1. Единый белорусский веб-портал по ВИЧ/СПИДу [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://www.aids.by. — Дата доступа: 15.06.2014.
2. Клинические стандарты (протоколы) проведения антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекции. Диагностика, лечение и профилактика оппортунистических заболеваний у ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом взрослых и подростков: утв. МЗ Респ. Беларусь 25.03.05. — Минск: Белсэнс, 2005.
3. Лечение и помощь при ВИЧ/СПИДе. Клинические протоколы для европейского региона ВОЗ. — Denmark: Phoenix Design Aid, 2007.
4. Каражас, Н.В. Пневмоцистная пневмония: клинические и микробиологические аспекты / Н.В. Каражас, А.В. Дехнич // Клин. микробиология и антимикробная химиотерапия. — 1999. — Т. 1, № 1.
5. Шепеленко, А.Ф. Пневмоцистная пневмония у лиц с тяжелыми дефектами иммунитета / А.Ф. Шепеленко, М.Б. Миронов, А.А.Попов // Леч. врач. — 2006. — № 1. — С. 76–80.
6. Хофман, Ч. Лечение ВИЧ-инфекции / Ч. Хофман, Б. Кампс, Ю. Рокштро // Инфосеть «Здоровье Евразии». — 2005. — 565 с.
7. Бартлет, Д. Клинические аспекты ВИЧ-инфекции / Д. Бартлет // Инфосеть «Здоровье Евразии». — 2007. — 467 с.
8. Gifford, S. Pneumocystosis and HIV [Electronic resource] / S. Gifford, M.D. Leoung; HIV Insite Knowledge Base. — Mode of access: http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-00&doc=kb-05-02-01. — Date of access: 01.07.2014.
9. Бартлет, Дж. Клинические аспекты ВИЧ-инфекции / Дж. Бартлет, Дж. Галлант. — Балтимор, 2007. — 467 с.
10. Ермак, Т.Н. Лечение пневмоцистной пневмонии при ВИЧ-инфекции / Т.Н. Ермак // Фарматека. — 2003. — № 13. — С. 20–23.
11. Чиркин, А.А. Клинический анализ лабораторных данных / А.А. Чиркин. — М.: Мед. лит-ра, 2004. — 380 с.

CLINICAL DIAGNOSTIC FEATURES OF PNEUMOCYSTIS PNEUMONIA IN HIV-INFECTED

Mikhed T.M., Krasavtsev E.L.

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

The dispensary observation medical records and maps of patients in the Gomel Regional Infectious Hospital and the Svetlogorsk clinics outpatient cards with exposed diagnosis of pneumocystis pneumonia have been analyzed. The effectiveness of empirically started specific treatment of pneumocystis pneumonia served as the main criterion for the diagnosis. For seven patients the diagnosis was confirmed only post mortem. In 13.3% of the CD4-lymphocytes were more 200 per microliter. During chest computed tomography most patients had extensive areas of infiltration by type "frosted glass" symptom. In the upper lobes on both sides of cloud-like formations like "butterflies" are marked in the same cases. The main clinical manifestations were: lack or loss of appetite, weakness, shortness of breath, fever, unproductive cough.

Keywords: pneumocystis pneumonia, HIV-infection, Pneumocystis jirovecii, "frosted glass" symptom.

Поступила 10.07.2014

ОСОБЕННОСТИ ОСЛОЖНЕННОГО ТЕЧЕНИЯ КОКЛЮША У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

Надрага А.Б., Дыбас И.В.
Львовский национальный медицинский университет им. Д. Галицкого Министерства здравоохранения Украины, Львов, Украина

Реферат. В статье приведены результаты исследования клинико-иммунологических особенностей осложненного и неосложненного течения коклюша у детей в возрасте 1–24 мес. У детей с коклюшем, осложненным бронхитами или пневмониями, дольше удерживался как гипертермический синдром, так и кашель с репризами или эпизоды апноэ. К характерным изменениям гемограммы можно отнести лейкоцитоз, абсолютный и относительный лимфоцитоз, более высокие уровни которых отмечались у детей с коклюшем, осложненным пневмониями. Установлено, что у детей с осложненным течением болезни развитие иммунопатологических процессов проходит преимущественно по Th1-типу, а характер лимфоцитоза свидетельствует о преобладании супрессорных форм и лимфоцитов со сниженной функциональной способностью. Эти особенности иммунного ответа способствуют длительному течению болезни и могут быть предпосылкой для использования в протоколах лечения коклюша иммунокорректирущих препаратов.

Ключевые слова: коклюш, дети раннего возраста, осложнения, иммунитет.

Введение. Заболеваемость коклюшем среди детей раннего возраста остается нерешенной проблемой как в Украине, так и во всем мире, хотя активная иммунизация с использованием современных вакцин позволила резко уменьшить распространение этого заболевания. Согласно утвержденному в Украине календарю вакцинации, прививки против коклюша проводятся детям, начиная только с 3-месячного возраста, у части младенцев сохраняется высокий риск заболевания, поскольку они либо еще не привиты, либо находятся в процессе вакцинации.

Цель работы — изучение клинических и иммунологических особенностей осложненного и неосложненного течения коклюша у детей раннего возраста.

Материалы и методы. Обследовано 65 невакцинированных детей в возрасте 1–24 мес., которые находились в 2012–2014 гг. на стационарном лечении во Львовской инфекционной клинической больнице с диагнозом «коклюш». Дети были распределены следующим образом: в группу А вошли 27 (41,53%) пациентов с коклюшем и симптомами поражения бронхов и трахеи, в группу В — 14 (21,53%) детей, больных коклюшем, осложненным пневмониями, группа С (группа сравнения) сформирована из детей с неосложненным течением коклюша (24 ребенка, 36,94%). Дети в группах были сопоставимы по возрасту, полу, массе тела на момент госпитализации в стационар. Диагноз коклюша был подтвержден результатами определения IgM и IgG к коклюшному токсину с использованием тест-систем для иммуноферментного анализа (Legal Manufacturer DRG Instruments, Германия). Тяжесть течения коклюша оценена по 1–20-балльной шкале, предложенной M.-P. Preziosi, E. Halloran [1]. Уровни γ-интерферона, IL-1β, IL-2, IL-10 в крови определялись методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-систем производства ЗАТ «Вектор-Бест» (РФ). Клеточный иммунитет детей исследовали по показателям CD4+, CD8+, CD16+, CD22+ (диагностические тест-системы ТсОО НПЛ «Гранум», Украина) и CD25+, CD71+, HLA-DR, CD95+ (ВГМУ, РБ). Статистический анализ проводился по 102 показателям с использованием программ MS Excel 2003, Statistica 8. Полученные результаты с нормальным распределением представлены в виде средних величин и SD. Данные, с распределением отличным от нормального, поданы в виде ДИ (95% доверительный интервал). При оценке непараметрических данных использован U-критерий Манна–Уитни. Достоверность разницы процентов между группами оценена по критерию χ^2. Оценка параметрических данных проводилась с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Дети группы А были госпитализированы в периоде спазматического кашля в среднем на 12,19±6,56 дня от начала болезни, группы В — на 14,28±8,76, группы С — на 16,71±9.97 дня. В большинстве случаев госпитализация в стационар была обусловлена изменением характера кашля, развитием кашля с репризами или возникновением эпизодов апноэ. Средний возраст на момент госпитализации у детей группы А составлял 9,19±7,99 мес., группы В — 7,71±6,31 мес., группы С — 10,87±8,52 мес.

Среди осложнений у детей группы А чаще всего наблюдался бронхит — у 23 (85,19%) пациентов, обструктивный бронхит — у 3 (11,11 %) детей, трахеобронхит — у 1 (3,7%) ребенка. Вовлечение в патологический процесс бронхов выявлено в среднем на 2,25±1,17 дня пребывания в стационаре, или на 14,44±3,87 дня болезни. Среди детей группы В пневмония с односторонней локализацией процесса диагностирована у 8 (57,14%) пациентов, двусторонняя — у 2 (14,28%), развитие бронхопневмонии отмечено у 4 (28,57%) детей. При этом на фоне пневмонии у 2 детей развился ателектаз верхней части правого легкого (на 10 и 26-й день болезни) и у 1 ребенка — бронхиолит (на 17-й день болезни). Поражение паренхимы легких было установлено в среднем на 3,23±1,64 дня от момента поступления в больницу (на 17,51±5,2 дня от начала болезни).

Развитие респираторных осложнений сопровождалось повышением температуры тела (среднее значение температуры у детей группы А составляло 37,13±0,66°С, у больных группы В — 37,20±0,79°С). При этом в группах А и С не было больных с фебрильной температурой тела, а в группе В высокая температура отмечалась у 3 (21,43%) детей (таблица 1).

Таблица 1 — Особенности течения коклюша у младенцев (осложненного и неосложненного)

Показатель	Группа А	Группа В	Группа С
Средний возраст пациентов на момент поступления (мес.)	9,19±7,99	7,71±6,31	10,87±8,52
Средняя продолжительность гипертермии (дни)	2,5±1,72	3,43±2,45	1,56±0,77
Продолжительность периода, в течение которого регистрировались апноэ (дни)	4,45±3,07	7,57±3,37	4,89±3,13
Продолжительность периода, течение которого отмечались репризы (дни)	12,96±6,15	12,5±7,58	9,89±4,68
Тяжесть течения коклюша при госпитализации# (баллы)	10,59±3,46**	11,21±3,86***	8,2±2,32
Тяжесть течения коклюша на 4–5-й день лечения в стационаре# (баллы)	12,00±3,80**	11,64±3,39	10,03±2,81

Примечания:
1 — #Тяжесть течения заболевания по шкале M.-P. Preziosi, E. Halloran [1].
2 — **p<0,05 — отличия между группами А и С.
3 — ***p<0,05 — отличия между группами В и С.

При госпитализации тяжесть заболевания у детей группы А в среднем была оценена в 10,59±3,46 балла, дети группы В по тяжести течения коклюша приближались к пациентам группы А (11,21±3,86 балла), у детей из группы С тяжесть течения болезни составляла 8,2±2,32 балла и была вероятно ниже, чем у пациентов предыдущих групп. В динамике состояние больных группы А и группы С ухудшалось, по-видимому из-за того, что практически все пациенты поступали в начале периода спазматического кашля: в дальнейшем у них появлялись репризы, рвота после кашля, приступы апноэ. Количество приступов кашля в течение суток было выше в группе В и составляло в среднем 18,64±5,44 эпизода в сутки по сравнению с 16,59±6,96 эпизода в группе А, в то же время этот показатель превышал количество эпизодов кашля у детей группы С — 14,93±4,16 (p<0,05). За весь период болезни репризы наблюдались у 36 (87,8%) детей, больных коклюшем с легочными осложнениями: в группе А — у 23 (85,19%) пациентов, в группе В — у 13 (92,86%) пациентов. В группе С репризы наблюдались у 20 (83,33%) детей. Эпизоды апноэ чаще наблюдались у детей группы В — в 35,46% (5 детей) случаев против 29,63 % (8 детей) в группе А. Среди детей группы С приступы апноэ отмечены у 3 (12,5%) пациентов. Рвота после кашля, наоборот, в некоторой степени чаще наблюдалась у пациентов группы А (55,56%) по сравнению с пациентами группы В (42,86%, p<0,05) и детьми с неосложненным течением болезни (10 детей, 41,67%).

Аускультативно в легких у детей выслушивались хрипы. Характеристика хрипов подана в таблице 2.

Средняя продолжительность времени, в течение которого определялись хрипы, была достоверно выше у детей в группе А (6,00±3,02 дня) и В (8,62±6,09 дня) по сравнению с детьми группы С (4,00±2,91 дня, p<0,05).

Рентгенологическое обследование проводилось детям в среднем на 2,79±1,97 дня от начала стационарного лечения (таблица 3).

Таблица 2 — Характеристика хрипов при аускультации легких у детей групп А–С

Характеристика хрипов	Группа А, количество детей, %	Группа В, количество детей, %	Группа С, количество детей, %
Сухие	17 (62,96)* $^{\Delta}$	5 (35,71)	7 (23,33)
Влажные	3 (11,11) * $^{\Delta}$	6 (42,85)†	5 (16,76)
Крепитирующие	–	3 (21,43)	–

Примечания:
1 — *p<0,05 группа А — группа В.
2 — $^{\Delta}$p<0,05 группа А — группа С.
3 — †группа В — группа С.

Таблица 3 — Характеристика рентгенограмм легких детей группы А и группы В

Характеристика	Группа А	Группа В
Односторонние инфильтративные изменения ткани легких слева	3 (12,00%)	4 (28,57%)
Односторонние инфильтративные изменения ткани легких справа	17 (73,91%)	10 (71,43%)
Двустороннее поражение легких	–	2 (14,29%)
Обогащение легочного рисунка	21 (84,0%)	–
Расширенные и малоструктурные корни легких	19 (76,0%)	4 (28,57%)
Тени корней легких неизмененной структуры	4 (16,0%)	
Инфильтрация корней легких	1 (3,70%)	

В клиническом анализе крови всех детей выявлен лейкоцитоз. У детей группы А общее количество лейкоцитов составляло в среднем 13,07±5,8×10^9/л, гиперлейкоцитоз (количество лейкоцитов превышающее 30,000×10^9/л) у этих детей не диагностирован; у пациентов группы В количество лейкоцитов в среднем достигало 16,22±7,13×10^9/л, а гиперлейкоцитоз выявлен у 2 (14,29%) пациентов, в группе С — 13,88±5,89×10^9/л. На момент госпитализации у детей с коклюшными пневмониями (группа В) выявлены достоверно более высокие уровни абсолютного количества лимфоцитов в периферической крови, в среднем этот показатель составлял 10,34±5,33×10^9/л. В динамике лечения количество лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови вероятно снижалось наиболее выражено у детей из групп В и С. Скорость оседания эритроцитов была в пределах нормы у всех обследованных пациентов, как при поступлении, так и в динамике болезни, и не зависела от тяжести течения основного заболевания (таблица 4.).

Таблица 4 — Результаты лабораторных исследований детей группы А — группы С

Показатель	Группа А	Группа В	Группа С
На момент госпитализации			
Лейкоциты (×10^9/л)	13,07±5,8*	16,22±7,13***	13,88±5,89
Лимфоциты (×10^9/л)	7,76±4,04	10,34±5,33***	8,19±4,61
СОЭ (мм/ч)	5,11±2,43**	5,54±2,73***	8,25±5,03
В динамике			
Лейкоциты (×10^9/л)	11,80±4,48 *	14,33±6,50***	9,89±2,86
Лимфоциты (×10^9/л)	7,81±3,17 * **	9,43±3,49***	2,97±3,12
СОЭ (мм/ч)	6,25±4,18 **	7,5±4,52***	9,23±4,24

Примечания:
1 — *p<0,05, группа А — группа В.
2 — **p<0,05, группа А — группа С.
3 — ***p<0,05, группа В — группа С.

При исследовании иммунного статуса детей, у которых коклюш сопровождался легочными осложнениями, установлено повышение продукции γ-интерферона (основного цитокина Th1-лимфоцитов) в 3 раза относительно референтных значений для детей соответствующего возраста (таблица 5). Это совпадает с данными литературы, которые свидетельствуют о повышении среднего уровня данного цитокина в крови у детей первого года жизни с коклюшем, осложненным пневмонией на 1–2-й неделе периода спазматического кашля [2]. Повышенная проницательность сосу-

дов у этих детей способствует проникновению более высоких концентраций γ-интерферона в кровь [3]. По данным Mascart F., дендритные клетки детей, начиная с 2-месячного возраста, при контакте с *Bordetella pertussis* могут продуцировать γ-интерферон в количествах, которые соответствуют уровням взрослого человека, и обеспечить полноценный иммунный ответ по Th1-типу [4]. У пациентов с неосложненным течением коклюша (группа С) уровень γ-интерферона был достоверно ниже и составлял 32,18±9,28 пг/мл.

Тяжесть течения коклюша коррелирует ($r = 0,436$; $p<0,05$) с уровнями интерлейкина-1β в крови: при тяжелом течении заболевания (с суммарной оценкой по шкале M.-P. Preziosi, E. Halloran более 10 баллов) — IL1β = 17,26±3,23 пг/мл, а при легком течении — IL1β = 12,38±1,1 пг/мл ($p<0,05$). У детей группы С и группы А средние уровни IL1β повышены относительно возрастной нормы в 3 раза, в группе В — в 4,6 раза.

Таблица 5 — Состояние цитокинового профиля у детей с осложненным и неосложненным течением коклюша

Показатель	Группа А	Группа В	Группа С	Норма
γ-интерферон (пг/мл)	39,26±8,51*	39,95±8,72•	32,18±9,28	0–10
IL-1β (пг/мл)	13,02±5,49*	20,40±2,63•	12,64±2,41	3,9–4,9
IL-2 (пг/мл)	17,40±1,97**	18,55±3,54•	15,54±3,22	6,5–12,0
IL-10 (пг/мл)	31,15±4,24**	32,98±4,47•	36,66±5,62	1,35–31,0

Примечания:
1 — *$p<0,05$, группа А — группа В.
2 — **$p<0,05$, группа А — группа С.
3 — •$p<0,05$, группа В – группа С.

Данные литературы свидетельствуют о возможности повышения уровней IL-2 у детей с коклюшем, осложненным пневмонией в 50 раз [3]. В нашем исследовании показатели данного цитокина повышены в 1,8–2 раза в обеих группах с осложненным течением болезни, в группе С (неосложненное течение) его продукция выражена менее, хотя и превышает норму в 2 раза.

Уровень противовоспалительного IL-10 (который продуцируется Th2-лимфоцитами) находился на верхней границе нормальных значений во всех группах, однако в группе С уровень IL-10 превышал уровни в группах А, В. Это соответствует литературным данным, свидетельствуя о незавершенности инфекционного воспаления, предрасполагает к длительному клиническому течению болезни и развитию осложнений [2, 3].

У детей с относительно легким течением коклюша определялись более низкие уровни IL-2 и IL-10 по сравнению детьми, у которых отмечено тяжелое течение болезни.

Исследование некоторых показателей клеточного звена иммунной системы выявило повышение абсолютного количества В-лимфоцитов: CD22+ — в 2 раза (по сравнению с нормой) у детей группы В (2,94±2,02 г/л) и С (2,20±1,34 г/л) (таблица 6).

Значительное повышение уровней ранних маркеров активации лимфоцитов (CD71+, CD25+) во всех группах свидетельствует о развитии общего вариабельного иммунодефицита [5]. По данным литературы, коклюшный токсин имеет способность снижать активность CD25+клеток [3], влияя на триггерные клетки лимфатической ткани, избегая таким образом своевременного иммунологического ответа организма [6]. Повышенные уровни поздних маркеров активации лимфоцитов CD HLA-DR+ и CD95+ (несут рецептор активации апоптоза) свидетельствуют о процессе гибели клеток, которые участвовали в процессе иммунологического ответа.

Уровни субпопуляций Т-лимфоцитов CD4+ и CD8+ повышены, что наиболее выражено у детей группы В (коклюш + поражение паренхимы легких) — 3,55±1,52 и 2,94±1,44 г/л соответственно; уровни CD3+ находятся в пределах нормы. Снижение индекса иммунорегуляции в группе В (1,26±0,17) и группе С (1,38±0,22) свидетельствует о преобладании супрессорных форм лимфоцитов. У пациентов группы А изменений в соотношении Т-хелперы/специфические Т-киллеры не найдено — 1,64±0,39, что соответствует литературным данным [4].

Таблица 6 — Характеристика клеточного звена иммунитета у детей групп А–С

Вид обследования	Группа А		Группа В		Группа С	
	%	г/л	%	г/л	%	г/л
Лейкоциты		13,55±2,73		17,62±10,12		13,50±11,54
Лимфоциты	60,25±9,03	8,09±1,63 *, **	63,5±5,32	10,84±5,24^{+}	58,27±13,09	9,04±8,39
CD16 + лимфоциты	16,5±2,51	1,33±0,31 *, **	29,0±4,83	3,13±1,43	27,91±5,19	2,21±1,22
CD22 + лимфоциты	19,50±5,07	1,63±0,66*, **	25,5±4,36	2,94±2,02	26,36±4,40	2,20±1,34
CD3 + лимфоциты	51,50±7,85	4,21±1,19*	60,75±6,90	6,56±3,09^{+}	60,88±4,17	4,78±2,54
CD4 + лимфоциты	29,50±4,65	2,43±0,85*	33,25±3,30	3,55±1,52	31,63±3,24	2,80±1,58
CD8 + лимфоциты	18,25±3,30	1,47±0,35*	26,75±4,57	2,94±1,44 $^{+}$	23,63±3,67	1,76±0,82
CD4 + /CD8+		1,64±0,39		1,26±0,17		1,38±0,22
CD71 + лимфоциты	26,23±6,13	2,12±0,61	24,0±8,12	2,47±1,07	25,72±5,83	1,99±1,05
CD25 + лимфоциты	24,75±7,89	1,55±0,99*,**	24,75±2,87	2,76±1,63	27,27±3,57	2,21±1,29
CDHLA-DR + лимфоциты	23,5±5,97	1,94±0,84*	26,75±3,40	2,85±1,17	27,73±4,30	2,24±1,24
CD95 + лимфоциты	20,5±6,56	1,71±0,72*	23,75±2,87	2,63±1,48	25,18±3,77	2,02±1,20

Примечания:

1 — *p<0,05, группа А — группа В.

2 — **p<0,05, группа А — группа С.

3 — $^{+}$p<0,05, группа В — группа С.

Уровни абсолютного и относительного количества CD16+лимфоцитов (Т-эфекторов, NK-клеток) значительно повышены у детей группы В. Вероятно более низкие значения показателей CD16+лимфоцитов у детей группы А (в среднем 1,33±0,31 г/л) выявлены только при сопоставлении с пациентами из групп В (в среднем 3,13±1,43 г/л) и С (в среднем 2,21±1,22 г/л), а относительное их количество не превышает референтного значения для детей соответствующего возраста.

Заключение. Состояние детей, у которых в дальнейшем возникали легочные осложнения, уже на момент госпитализации было более тяжелое, относительно пациентов группы сравнения. У детей с коклюшем, осложненным бронхитами или пневмониями, дольше удерживался как гипертермический синдром, так и кашель с репризами или эпизоды апноэ. К характерным изменениям гемограммы можно отнести лейкоцитоз, абсолютный и относительный лимфоцитоз, более высокие уровни которых отмечались у детей с коклюшем, осложненным пневмониями. Процессы, происходящие в иммунной системе при коклюше, характеризовались развитием иммунопатологических процессов как по Th1, так и по Th2-типу. У детей, болеющих осложненными формами коклюша, течение болезни вызывало чаще Th1-тип иммунологических реакций, при неосложненном течении болезни — иммунопатологические процессы протекали в большинстве случаев по Th2-типу. Состояние клеточного иммунитета свидетельствовало о превалировании супрессорных форм лимфоцитов, а также клеток со сниженными функциональными способностями, что особенно выражено у детей с осложненным течением коклюша. Эти особенности иммунного ответа способствуют длительному течению болезни и могут быть предпосылкой для использования в протоколах лечения коклюша иммунокорректирущих препаратов.

Литература

1. Preziosi M.-P. Effects of pertussis vaccination on disease: vaccine efficacy in reducing clinical severity / M.-P Preziosi, E. Halloran // Clin. Infect. Dis. — 2003. — № 37. — P. 772–779.

2. Immunity to the respiratory pathogen Bordetella pertussis [Electronic resource] / R. Higgs [et al.] // Mucosal Immunol. — 2012. — Vol. 5. — P. 485–500. — Mode of access: http://www.nature.com/mi/journal/v5/n5/pdf/mi201254a.pdf. — Date of access: 10.07.2014.

3. Содержание провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов в сыворотке крови больных коклюшем / Л.М. Панасенко [и др.] // Аллергология. — 2005. — № 3. — С. 40–44.

4. *Bordetella pertussis* infection in 2-month-old infants promotes type 1 T-cell responses / F. Mascart [et.al.] // J. Immunol. — 2003. — Vol. 170, № 3. — P. 1504–1509.

5. Матейко Г.Б. Герпесвірусна інфекція: раціональні підходи до лікування і діагностики / Г.Б. Матейко // Клін. імунологія. Алергологія. Інфектологія. — 2013. — № 8. — С. 23–29.

6. Pertussis toxin as adjuvant suppresses the number and function of CD4+CD25+ T-regulatory cells / X. Chen [et al.] // Eur. J. Immunol. — 2006. — Vol. 36, № 3. — P. 671–680.

PECULIARITIES OF COMPLICATED COURSE OF PERTUSSIS IN INFANTS

Nadraga A.B., Dybas I.V.
Danylo Halytskiy Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

The results obtained on study of clinical and immunological features of complicated and uncomplicated pertussis in children aged 1–24 months are presented in the paper. Severity of the diseases, which further pulmonary complications occurred already at the time of hospitalization, were more with respect to a comparison group of patients. Pertussis bronchitis and pneumonia characterized by a prolonged period of hyperthermia and period of reprises or period of episodes of apnea. The characteristic changes in hemogram include leukocytosis, absolute and relative lymphocytosis, higher levels of which occurred in children with pertussis pneumonias. Found that children with complicated disease development immunopathological processes occurs mainly on Th1-type and character lymphocytosis indicates the predominance of lymphocytes and suppressor forms with reduced functional capacity. These features of an immune response contribute to long course of the disease and may be a reason to include immunomodulatoes in pertussis treatment protocols.

Keywords: pertussis, infants, complications, immunity.

Поступила 12.07.2014

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПЕПТИДОГЛИКАН-РАЗРУШАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ У ЛИЦ С ВНЕГОСПИТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

Окулич В.К., Земко В.Ю., Кирилюк О.Д.
Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

Реферат. Нами предложен способ выделения пептидогликана из клеточной стенки грамположительных бактерий, который может быть использован для изучения активности ферментов, разрушающих муреин. Разработана методика, позволяющая определять антимикробную активность сыворотки крови пациентов по ее способности разрушать пептидогликан. Исследована пептидогликан-разрушающая способность сыворотки крови 18 пациентов с внегоспитальной пневмонией и 18 доноров — лиц призывного возраста, проходивших обследование в кардиологическом отделении Витебской областной клинической больницы. Установлено, что способность разрушать пептидогликан достоверно выше у пациентов с внегоспитальной пневмонией ($p<0,05$) в сравнении с донорами.

Ключевые слова: грамположительные бактерии, пептидогликан, ферментативная активность, Конго-красный.

Введение. Пневмония представляет собой острое инфекционное заболевание, которое характеризуется очаговым поражением респираторных отделов легких и наличием внутриальвеолярного экссудата.

Проблема диагностики и лечения пневмоний является одной из самых актуальных в современной терапевтической практике.

В настоящее время диагностика пневмонии базируется на клинических, рентгенологических, лабораторных, эпидемиологических и других данных. Однако следует отметить, что общий и биохимический анализы крови не дают специфической информации, а один из самых доступных и распространенных методов рентгенологического исследования — рентгеноскопия органов грудной клетки — обладает рядом существенных недостатков, а именно: отличается известной субъективностью трактовки рентгенологической картины, сопровождается большой лучевой нагрузкой на пациента и медперсонал. Следует иметь в виду, что в ряде случаев диагноз пневмонии не подтверждается рентгенологическими данными.

Серологическая диагностика инфекций, вызванных *M. pneumoniae*, *Ch. pneumoniae* и *Legionella*, не рассматривается в ряду обязательных методов исследования, поскольку с учетом повторного взятия крови в острый период и период реконвалесценции (через несколько недель от на-

чала заболевания) метод в большей степени определяет не клинический, а эпидемиологический уровень диагностики.

В последнее время получили распространение тесты — иммуноферментный (с определением в моче специфического растворимого антигена *L. Pneumophila*) и иммунохроматографический (с определением в моче пневмококкового антигена). Однако эти тесты в нашей стране пока что широкого распространения не получили [1].

Поэтому в настоящее время разработка новых методов диагностики бактериальных инфекций продолжается, и исследование в данной области представляет собой несомненный научно-практический интерес.

Цель работы — оценка способности пептидогликан-разрушающей активности сыворотки крови для диагностики внегоспитальной пневмонии.

Материалы и методы. Выделение пептидогликана (ПГ) из клеточной стенки грамположительных бактерий проводили по методике, предложенной В.Л. Львовым, Б.В. Пинегиным, Р.М. Хаитовым, в нашей модификации. В качестве культуры использовали *Microccocus luteus* ATCC 10240. Полученный ПГ метили 2%-м раствором Конго красного. Для постановки метода использовали пептидогликан, меченый 2%-м Конго красным (ПМК), сыворотку пациента и буферный раствор (0,2 М солянокислый трис-буфер) с pH 7,4. Была исследована сыворотка крови 36 человек: 18 пациентов с диагнозом «внегоспитальная пневмония» и 18 пациентов призывного возраста, находившихся на обследовании в кардиологическом отделении ВОКБ.

Венозную кровь у обследуемых лиц забирали рано утром натощак в объеме 1 мл в пробирку Пробы перед применением осаждали в течение 10 мин (10 тыс. об/мин; центрифуга MICRO 120). Для постановки метода использовали пептидогликан, меченый 2%-м Конго красным (ПМК), сыворотку пациента и 0,2 М солянокислый трис-буфер pH 7,4, т. к. у нейтрофильной эластазы это оптимум pH. В один ряд эппендорфов вносили последовательно: 300 мкл раствора ПМК и 100 мкл сыворотки крови. Во второй ряд эппендорфов — 300 мкл раствора ПМК и 100 мкл сыворотки крови, которую предварительно нагревали в течение 1 ч при температуре 56°С для инактивации комплемента. Контролем служили пробы, содержащие трис-HCl буфер pH 7,4 в количестве 300 мкл и 100 мкл сыворотки крови.

Далее проводили инкубацию проб в термостате при t = 37ºС в течение 24 ч. Затем пробы извлекали из термостата и центрифугировали в течение 10 мин (10 тыс. об/мин; MICRO 120) для осаждения оставшегося неразрушенного ПМК. Из надосадка брали в дублях по 150 мкл раствора и переносили в лунки 96-луночного полистиролового планшета. Планшет помещали в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 492 нм определяли оптическую плотность в лунках.

Результат выражался в оптических единицах и рассчитывался как разница оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных.

Для пересчета полученных результатов в пикокаталы нами была использована формула, выведенная после построения калибровочного графика по разведенному Конго красному, в котором была отражена зависимость активности фермента от оптической плотности раствора, исходя из того, что при расщеплении 1 молекулы субстрата в раствор переходит 1 молекула Конго красного.

$$Y = [-0{,}00117 + 0{,}0346 \times Еоп] \times 9{,}92,$$

где Y — искомый результат;

Еоп — оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля [2].

Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ STATGRAPHICS PLUS. Для всех имеющихся выборок данных проверяли гипотезу нормальности распределения по критерию Колмогорова–Смирнова. Поскольку они не подчинялись нормальному распределению, анализ проводили методами непараметрической статистики. Рассчитывались медиана (М) и интерквартильный размах (25–75%). Различия считали статистически значимыми при $p<0{,}05$.

Результаты и их обсуждение. В результате исследования было установлено, что уровень активности ферментов, способных разрушать ПГ, у пациентов с пневмонией оказался достоверно

выше, чем у доноров (у пациентов с пневмонией — M = 0,629 пкат, у доноров — M = 0,595 пкат, p<0,05). После инактивации комплемента способность разрушать ПГ достоверно снижается (у доноров — M = 0,566пкат, у пациентов с пневмонией — M = 0,579 p<0,05). Результаты представлены в таблице.

Таблица — Способность сыворотки разрушать пептидогликан до и после инактивации комплемента у доноров и у пациентов с пневмонией

Группа	№	Медиана, пкат	Интерквартильный размах (25–75%), пкат	Достоверность отличий
Доноры	18	0,595	0,567–0,621	P_{1-2}<0,05 P_{2-3}<0,05 P_{1-3}<0,05
Пациенты с невмонией	18	0,629	0,601–0,659	
Доноры с инактивированным комплементом	18	0,566	0,537–0,597	
Пациенты с пневмонией после инактивации комплемента	18	0,579	0,568–0,604	

Выводы:

1. Разработана методика, позволяющая определить пептидогликан-разрушающую активность сыворотки.

2. При изучении активности сыворотки разрушать муреин, выделенный из грамположительных бактерий при pH 7,4, достоверно установлен ее повышенный уровень у пациентов с внегоспитальной пневмонией в сравнении с донорской группой (M = 0,629 и 0,595 пкат соответственно, p<0,05).

3. После инактивации комплемента способность разрушать ПГ снижается (у доноров — M = 0,566 пкат, у пациентов с пневмонией — M = 0,579 пкат, p<0,05), однако различия между группами остаются достоверными.

Литература

1. Miyashita, N. The JRS Guidelines for the management of community — acquired pneumonia in adults: an up-date and new recommendations / N. Miyashita, T. Matsushima, M. Oka // Intern. Med. — 2006. — Vol. 45, № 7. — P. 419–428.

2. Земко, В.Ю. Ферменты, разрушающие пептидогликан, в диагностике гнойных отитов / В.Ю. Земко, О.Д. Кирилюк, В.К. Окулич // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 66-й итог. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых. — Витебск: ВГМУ, 2014. — С. 145–146.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF PEPTIDOGLYCAN-DESTROYING ACTIVITY OF BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA

Okulich V. K., Ziamko V. Y., Kiriluk O. D.

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Determining the activity of enzymes those destroy peptidoglycan — the important part of the bacterial cell wall — can substantially help in diagnosis of bacterial infections. We propose method of separation of a cell wall from gram-positive bacteria, which can be used as substrate for measuring activity of such peptidoglycan-destroying enzymes. Peptidoglycan-destroying ability of blood serum of 18 patients with community-acquired pneumonia and 18 donors — of military age, undergoing tests in the cardiology department of the Vitebsk District Clinical Hospital were analyzed. The technique allows determining antimicrobial activity of enzymes in blood serum for their ability to degrade peptidoglycan. It was found, that enzyme ability to destroy peptidoglycan was significantly higher in patients with community-acquired pneumonia (p<0.05), than in donors.

Keywords: gram-positive bacteria, peptidoglycan, enzymatic activity, Congo red.

Поступила 16.09.2014

ИММУНОФЕРМЕНТЫ ЦИТИДИНДЕЗАМИНАЗА И АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗА: СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В НОРМЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ

Павлов К.И.[1, 2], Титов Л.П.[1]
[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;
[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Реферат. Ферменты цитидиндезаминаза и аденозиндезаминаза играют важнейшую роль в регуляции иммунного ответа на всех его этапах. Поэтому особенно важен максимально стандартизированный подход к измерительной методике, высокая воспроизводимость результатов. В работе исследована активность данных иммуноферментов в группе здоровых добровольцев (n = 33) и пациентов с диагнозом «хронический гепатит С» (n = 29). Нормальные значения сопоставлялись с процентным содержанием субпопуляций CD19+ и CD8+ лимфоцитов, стандартизировались в серийных исследованиях и изменении параметров индофенольной реакции.

Ключевые слова: цитидиндезаминаза, аденозиндезаминаза**,** индофенольный колориметрический тест, хронический вирусный гепатит С.

Введение. Зародившись в конце XIX в. как часть медицинской микробиологии, иммунология на современном этапе представляет собой самостоятельную биомедицинскую и клиническую дисциплину с широчайшим диагностическим арсеналом и массивной базой экспериментальных данных. Многие механизмы функционирования иммунной системы подробнейшим образом описаны на субклеточном и молекулярном уровнях. Вместе с тем механизмы и закономерности функционирования иммунной системы, определяющие стабильность состояния здоровья индивидуума в течение жизни, равно как и разнообразных вариантов дизадаптации к факторам неблагоприятной окружающей среды и развития иммунопатологии, еще раскрыты недостаточно [1, 2]. Понимание многих механизмов развития и регуляции иммунного ответа сейчас претерпевают значительные концептуальные изменения. Так, имеется ряд энзиматических способов регуляции иммунного ответа, функционирующих на всех стадиях его формирования и крайне чувствительных к любым внешним и внутренним сигналам. К таким ферментам относятся факторы биодеградации свободных нуклеозидов: аденозиндезаминаза и особенно цитидиндезаминаза, которые поэтому можно назвать иммуноферментами [3, 4].

Цитидиндезаминаза (EC number 3.5.4.5) — индуктор соматических гипермутаций генов иммуноглобулинов — осуществляет процесс сложной регуляции селекции иммунокомпетентных клеток, их поликлональной и клональной активации, созревания аффинности вырабатываемых антител. Данный ферментативный механизм тесно связан с системой репарации ДНК и эпигенетической регуляции экспрессии, происходящей не только в иммуноцитах, но и во всех остальных клетках организма, и имеющий чрезвычайную важность для поддержания стабильности генома на всех этапах реализации наследственной информации [4].

Аденозиндезаминаза (EC number 3.5.4.4) — фермент, ответственный за трансформацию аденозина свободных нуклеозидов и нуклеиновых кислот в инозин, —выступает как сильный провоспалительный цитокин и фактор неспецифической активации Т-лимфоцитов [3]. Повышение в плазме уровня свободной аденозиндезаминазы имеет высокое диагностическое значение для своевременного выявления плеврита туберкулезной этиологии; активность цитидиндезаминазы плазмы значительно повышена при инфекционном мононуклеозе. Велика роль дезаминации аденозина в энергетическом метаболизме и детоксикации ксенобиотиков широкого диапазона молекулярного строения. Вариации в активности аденозиндезаминазы являются энзиматическим маркером ряда нарушений сна.

Учитывая значительную физиологическую роль и высокий маркерный потенциал данных ферментов, рядом авторов предложены подходы по измерению методики, стандартизации и интерпретации получаемых результатов [5–8]. В целом информация и количество диагностических находок для аденозиндезаминазы преобладают, однако и в исследовании цитидиндезаминазы и соматического мутагенеза сделан ряд важных обобщений, например, в отношении роли данного фермента в патогенезе хронического гепатита С, гриппозной инфекции, иммунодефицитных состояний разной степени интенсивности [9, 10]. На рисунке 1 схематично показаны основные подходы к стандартизации получаемых результатов активности цитидиндезаминазы.

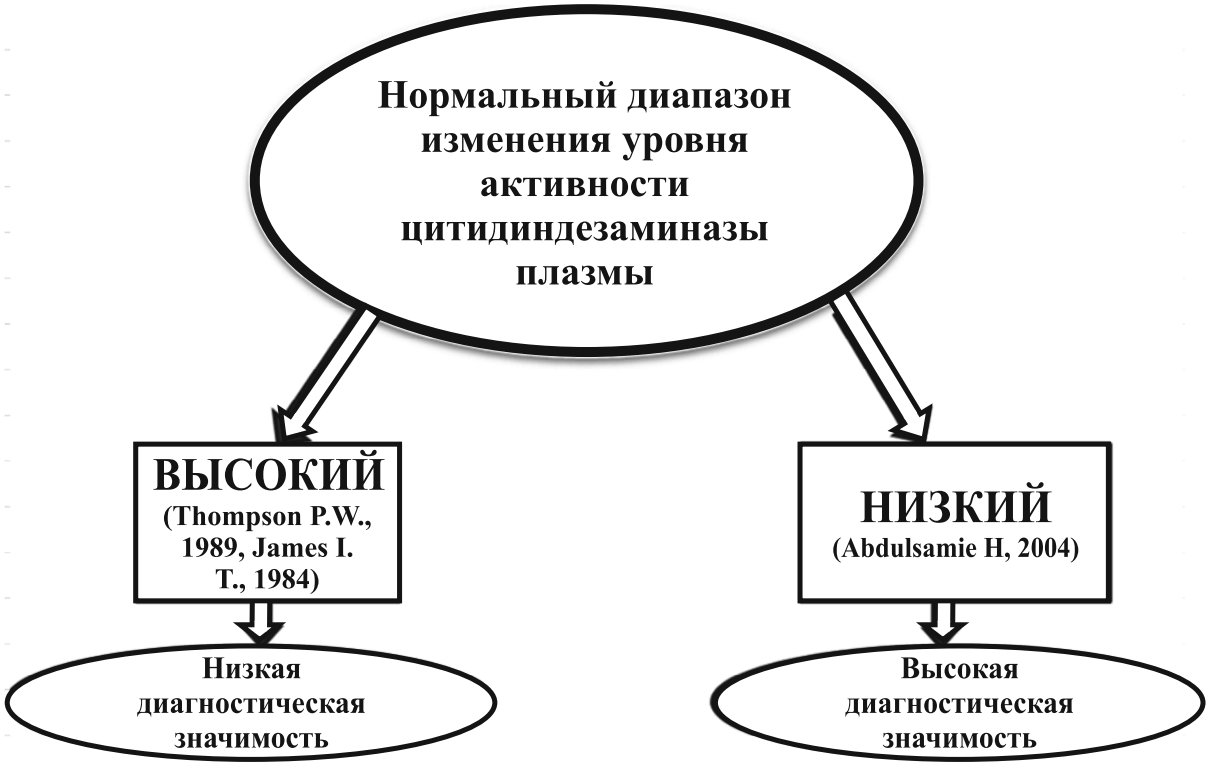


Рисунок 1 — Основные подходы к оценке исследования диагностической значимости активности цитидиндезаминазы плазмы

Упрощенно существует два основных подхода к оценке получаемых результатов и их диагностической важности. Первый связан с работами P.W. Tompson по активности фермента при ревматоидном артрите и ряде других иммуновоспалительных заболеваний [5, 6]. Данные результаты постулируют высокую вариабельность показателей активности цитидиндезаминазы, связанную как с патологическим процессом, так и, например, с суточными циркадными ритмами. Сама же средняя активность дается, как крайне высокая (значительно выше 10 МЕ) [6]. Все изложенное серьезно понижает диагностическую значимость данного исследования. В то же время ряд авторов, напротив, утверждает, что активность цитидиндезаминазы в норме довольно низкая и варьирует в крайне узком диапазоне [7]. Следовательно, любое ощутимое изменение активности отражает серьезное патологическое состояние и имеет поэтому высокую диагностическую значимость.

Цель работы — попытка максимальной стандартизации показателей активности обоих иммуноферментов в группе здоровых добровольцев с максимально узкими параметрами формирования когорты. Также была исследована группа пациентов с диагнозом «хронический гепатит С» в широком диапазоне возрастов и физиологического состояния.

Материалы и методы. *Исследованные группы.* Нормальные показатели цитидин- и аденозиндезаминазы были исследованы в максимально стандартизированной группе из 33 сравнительно здоровых добровольцев без системных и острых заболеваний. Средний возраст обследованных при возрастном диапазоне от 18 до 31 года составил 24±2 года. Половое соотношение мужчин и женщин около 4:1. Также было исследовано 29 пациентов с диагнозом «хронический гепатит С» в широком возрастном диапазоне от 27 до 81 года с соотношением мужчин и женщин около 1,5:1.

Забор образцов материала. От каждого исследуемого было получено не менее 6 мл антикоагулированной венозной крови. В течение 3 ч, избегая охлаждения, кровь доставлялась в лабораторию. Плазма выделялась путем центрифугирования при 1000 об./мин в стандартной центрифуге. Депонировалась в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл при температуре менее –75°С в низкотемпературной морозильной камере и исследовалась в течении недели с момента забора.

Исследование ферментативной активности. Активность аденозин- и цитидиндезаминазы исследовалась методом индофенольной колориметрической реакции (Bertselot) по методике Giutsi

и Galanti со следующим соотношением реакционных компонентов: 200 мкл субстратного раствора : 20 мкл исследуемой сыворотки : 600 мкл фенольно-нитропруссидного раствора : 600 мкл основного раствора гиппохлорита. Реакция проходила при 37°С в пробирке типа Эппендорф объемом 1,5 мл. Учет реакции проводился в 96-луночном планшете на ИФА-мультискане с 300 мкл реакционной смеси [3]. Цитидин с исследуемой сывороткой инкубировался в течении 22 ч, аденозин — стандартно в течении 1 ч и длительно — 22 ч. Для 17 образцов проводилось параллельное исследование активности цитидиндезаминазы со стандартным [3] и 4-кратным содержанием катализатора нитропруссида натрия.

Проточная цитометрия. 22 образца крови здоровых добровольцев были исследованы на экспрессию поверхностных молекул CD19 с использованием моноклональных антител anti-human CD19 FITC; из них 19 образцов были исследованы на экспрессию поверхностных молекул CD8 с использованием моноклональных антител anti-human CD8 PC5 на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Статистическое исследование. Обработку полученных данных проводили при помощи программ Statistica 6.0 for Windows и Microsoft Excel. Критический уровень значимости p при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05. Параметричность данных оценивалась путем оценки процентного распределения значений ферментативной активности в диапазонах ±σ, ±2σ стандартных квадратических отклонений и задания тренда путем линейного фильтра.

Результаты и их обсуждение. Для группы здоровых добровольцев средняя активность цитидиндезаминазы составила 1,82±0,36 МЕ, аденозиндезаминазы — 11,94±1.92 МЕ. Колебание внутри группы носит признаки параметрического распределения как для одного, так и для другого фермента. Для пациентов с диагнозом «хронический гепатит С» активность цитидиндезаминазы ниже, чем у здоровых, и составила 1,21±0,17 МЕ, активность же аденозиндезаминазы, напротив, выше — 14,28±2.19 МЕ. При этом для значений активности обоих ферментов также, как и у здоровых добровольцев отмечалась параметричность процентного распределения значений ферментативной активности в диапазонах ±σ, ±2σ стандартных квадратических отклонений и тренда методом линейного фильтра (рисунок 2).

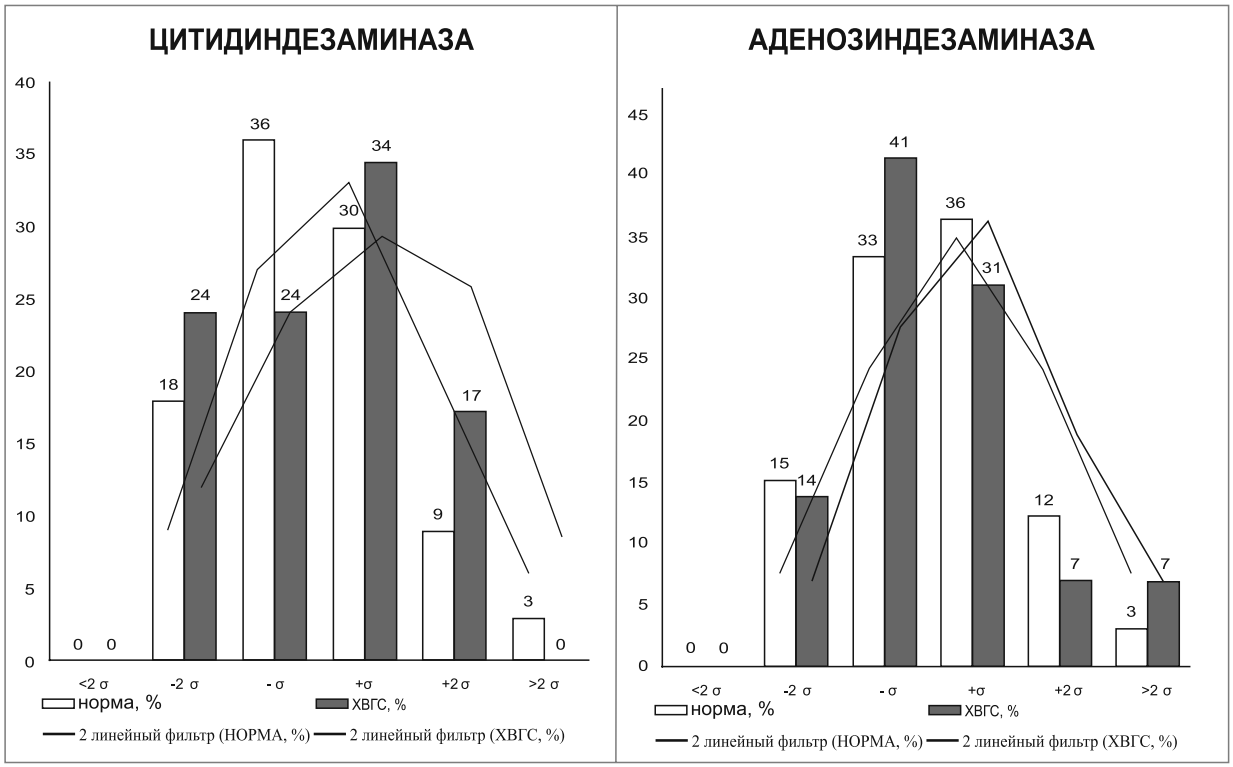


Рисунок 2 — Процентное распределения уровней активноости иммуноферментов в группе здоровых добровольцев (норма) и пациентов с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) по параметрам стандартного квадратического отклонения

Стоит отметить, что несмотря на тяготение признаков к среднему значению, в норме диапазон колебаний цитидиндезаминазы варьировал от минимального значения 0,58 МЕ до максимального в 4,91 МЕ, т. е. максимальное значение превышает минимум в 8,5 раз (таблица).

Таблица — Амплитуда колебания ферментативной активности иммуноферментов в норме и при хроническом вирусном гепатите С

		Минимальное значение, МЕ	**Среднее значение, МЕ**	**Максимальное значение, МЕ**
Здоровые добровольцы	Цитидиндезаминаза	0,58	1,82±0,36	4,91
	Аденозиндезаминаза	4,01	11,94±1,92	25,97
ХВГС	Цитидиндезаминаза	0,57	1,21±0,17	2,12
	Аденозиндезаминаза	5,82	14,28±2,19	30,53

Схожа тенденция и в ферментативной активности аденозиндезаминазы. Ряд публикаций указывает на весьма широкий физиологический диапазон колебаний этого фермента в пределах 6–20 МЕ. Lamsal M. et al. (2007) [11] отмечают, что средняя активность аденозиндезаминазы у относительно здоровых индивидов составляет 15,53±4,4 МЕ, активность фермента с нетуберкулезной воспалительной патологией дыхательных путей по большому счету также не выходит за пределы физиологических границ, незначительно при этом повышаясь — 16,71±5,16 МЕ. Серьезное повышение сывороточной активности появляется только у пациентов с легочными поражениями туберкулезной этиологии без плеврита (26,54±4,76 МЕ), достигая пика непосредственно во время плеврита (34,53±10,27), что в 2 раза выше нормального значения, приводимого в данной работе [11]. Отсутствие связи в значении активности аденозиндезаминазы и содержания CD8+ Т-клеток в свете этого не вызывает удивления. Содержание CD8+ клеток находилось у исследуемых пациентов в физиологических границах и составило 26±3,2%, достигая в максимумах 40%, а в минимальных знасениях 19–20%. Согласно Silber и Conkin, нуклеозидазная активность субпопуляций Т-клеток все-таки величина не очень высокая, и масивный воспалительный лизис не может стать причиной экстремального повышения активности [12]. Исходя из этого, массивная воспалительная острая патология приводит к незначительному повышению активности аденозиндезаминазы; в данном же случае уровень АДА при хроническом гепатите С можно трактовать как повышенный и вполне соответствующий системной воспалительной патологии.

Еще одним важным моментом является сопоставимость полученных средних значений активности аденозиндезаминазы при долгосрочной инкубации (22 ч) с чаще всего используемой одночасовой инкубации с субстратом. Отсутствие экстремально высоких значений в активности фермента при длительном контакте с субстратом свидетельствует о не высоком «обороте» и более-менее постоянной скорости дезаминации на протяжении всего срока инкубации. В отличие от аденозиндезаминазы активность в отношении цитидина при краткосрочной инкубации (1–6 ч) не определялась вообще, что указывает на низкую кинетику ферментативной активности в сыворотке, низком «обороте» фермента. Адекватный результат достигается при довольно длительной инкубации. В этом смысле целесообразно увеличение количества катализатора нитропруссида натрия, непосредственно влияющего на скорость образования индофенола. При параллельном исследовании цитидиндезаминазной активности с использованием при учете образовавшегося аммиака разных концентраций катализатора в фенольно-нитропруссидном растворе полученные показатели в целом сопоставимы. Значительного прироста в учете ферментативной активности отмечено не было (рисунок 3).

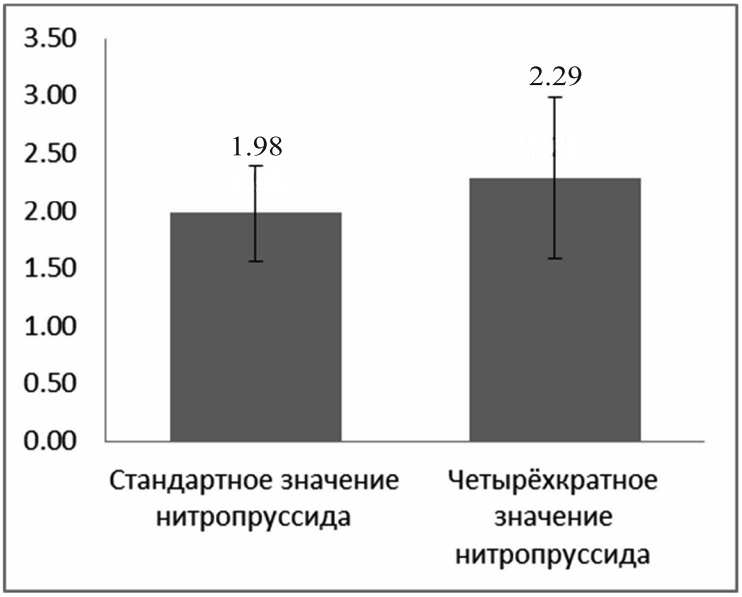


Рисунок 3 — Влияние катализатора на кинетику реакции и показатели активности цитидиндезаминазы

Таким образом, можно сказать, что и минимальное использование нитропруссида полностью отражает энзиматическую активность цитидиндезаминазы. Это же подтверждается положительной корреляционной связью в двух рядах (R = 0,67). Учитывая крайне низкие абсолютные значения активности цитидиндезаминазы, положительная корреляционная связь является крайне позитивным признаком для качества исследования.

Активность цитидиндезаминазы исследовалась параллельно в трех копиях для обоих уровней катализатора. При этом во всех пробах отмечалось подобие результатов каждого из дублей, что, как отмечается у P.J. Van der Kooij [13], можно считать показателем специфичности реакции, тем не менее диапазон колебаний внутри копий составлял 20–30% от активности, что особенно осложняет исследование образцов с низким значением цитидиндезаминазы. Тем не менее положительная динамика в сериях образцов плазмы от пациентов, а не в концентрированной суспензии фермента, как у [13], говорит о применимости данного теста и способности его отразить степень ферментативной активности индивидуального клинического образца.

Определенное значение может иметь некоторое снижение активности цитидиндезаминазы в группе пациентов с хроническим вирусным гепатитом С. Данное явление может обьясняться как воспалительно-фибротическим поражением печени и возникающим следом иммунодефицитом, так, например, и длительным получением такими пациентами рибовирина [14, 15]. Химическая структура молекулы рибовирина имеет структуру пуринового основания и сходна со строением цитидина, выступает его антиметаболитом [16, 17]. Возможна даже непосредственная конкуренция за внутриклеточный цитидин с вирусом гепатита С при значительной вирусной нагрузке.

Выводы:

1. Активность фермента цитидиндезаминазы в плазме здоровых добровольцев характеризовалась низким значением и составила 1,82±0,36 МЕ при высокой индивидуальной вариабельности признока внутри группы. Тем не менее показатель характеризовался высокой воспроизводимостью в каждой пробе и параметрическим распределением внутри всей выборки. Выявленная в группе пациентов с хроническим гепатитом С активность цитидиндезаминазы ниже, как по абсолютному значению (1,21±0,17 МЕ), так и по амплитуде индивидуальных колебаний внутри когорты. Тем не менее данная выборка также носила черты параметрического распределения.

2. Долгосрочная инкубация (22 ч) при исследовании активности аденозиндезаминазы дает результаты, сопоставимые с наиболее часто используемой часовой инкубацией. Уровень активности цитидиндезаминазы плазмы в норме при длительной инкубации составил 11,94±1,92 МЕ, при этом индивидуальные значения ферментативной активности не связаны с уровнем CD8+ Т-лимфоцитов в периферической крови. При хроническом вирусном гепатите С отмечается повышение активно-

сти АДА до 14,28±2,19 МЕ, сопоставимое с таковым при неспецифическом остром поражении верхних дыхательных путей.

Литература

1. Титов, Л.П. Противовирусный иммунитет: молекулярно-клеточные механизмы, закономерности развития и иммунопатология / Л.П. Титов, И.А. Карпов // Мед. журн. — 2007. — № 1. — С. 4–14.
2. Титов, Л.П. Микро-РНК: новый класс регуляторных молекул иммунного ответа и инфекционного процесса / Л.П. Титов // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2012. — Вып. 5. — С. 256–261.
3. Янович, О.О. Активность аденозиндезаминазы крови при инфекционном мононуклеозе / О.О. Янович, Л.П. Титов, В.В. Щерба // Здравоохранение. — 2012. — № 12. — С. 17–19.
4. Chiu, Y.L. APOBEC3G: an intracellular centurion / Y.L. Chiu, W.C. Greene // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. — 2009. — Vol. 364. — P. 689–700.
5. Determination of serum cytidine deaminase activity using ion-pair reversed-phase liquid chromatography / I.T. James [et al.] // J. Chromatogr. — 1989. — Vol. 495. — P. 105–112.
6. Circadian rhythm of serum cytidine deaminase in patients with rheumatoid arthritis during rest and exercise / P.W. Thompson [et al.] // Ann. Rheum. Dis. — 1989. — Vol. 48. — P. 502–504.
7. Cytidine Deaminase activity in breast cancer / H. Abdulsamie [et al.] // Med. J. Babylon. — 2004. — Vol. 1. — P. 32–39.
8. Павлов, К.И. Активность ферментов-индукторов соматических гипермутаций в спленоцитах мышей линии CB57/BL, амниотической и аллантоисной жидкости куриных эмбрионов / К.И. Павлов, Л.П. Титов, Л.В. Бутько // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2013. — С. 328–336.
9. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. XVI. Influenza stimulates adaptive immunity, class switch and diversification of the IgG repertoire encoded by downstream Cγ genes / J.E. Butler [et al.] // Immunology. — 2013. — Vol. 138, № 2. — P. 134–144.
10. Безопасность и эффективность вакцины «Флюваксин» при иммунизации военнослужащих / А.М. Дашкевич [и др.] // Здравоохранение. — 2011. — № 12. — С. 36–40.
11. Diagnostic utility of adenosine deaminase (ADA) activity in pleural fluid and serum of tuberculous and non-tuberculous respiratory disease patients / M. Lamsal [et al.] // Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. — 2007. — Vol. 38, № 2. — P. 363–369.
12. Silber, R. Decreased 5`-nucleosidase activity in T lymphocytes populations in patients with B-cell chronic lymphocyte leukemia / R. Silber, M. Conklyn // Blood. — 1984. — Vol. 64, № 2. — P. 479–481.
13. Determination of serum nucleotidase with cytidine monophosphate as substrate / P.J. van der Kooij [et al.] // Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. — 1975. — Vol. 13, № 4. — P. 149–155.
14. Enhancement of hepatitis C virus replication and liver damage in HIV-coinfected patients on antiretroviral combination therapy / S. Vento [et al] // AIDS. — 1998. — Vol. 12, № 1. — P. 116–117.
15. Thomson, E.C. Epidemiology of hepatitis C virus infection in HIV-infected individuals / E.C. Thomson, J. Main // J. Viral Hepatit. — 2008. — Vol. 15. — P. 773–781.
16. Crotty, S. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? / S. Crotty, C. Cameron, R. Andino // J. Mol. Med. — 2002. — Vol. 80, №. 2. — P. 86–95.
17. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients / F.J. Torriani [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2004. — Vol. 351, № 5. — P. 438–450.

IMMUNOENZIMES CYTIDINE DEAMINASE AND ADENOSINE DEAMINASE: BASAL ACTIVITY LEVELS STANDARDIZATION AND ESTIMATION OF DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Pavlov K.I.[1, 2], Titov L.P.[1]
[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk;
[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Cytidine deaminase (CDA) and adenosine deaminase (ADA) both plays great role in immune response and its regulation. So basal CDA and ADA serum levels were measured with gently standardization in cohort forming and indophenol-blue test conditions and were compared with CD19+ and CD8+ cells percentage. In other hand CDA and ADA serum levels were estimated for chronic HCV infection patients.

Keywords: cytidine deaminase, adenosine deaminase, indophenolic colorimetric test, chronic HCV infection.

Поступила 29.08.2014

ВЫЯВЛЕНИЕ ПРОТИВОГЕРПЕСНЫХ АНТИТЕЛ У ДОНОРОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГИПЕРИММУННОЙ ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ПЛАЗМЫ

Пешняк Ж.В.[1], Коржель Т.С.[1], Каленчиц И.А.[1], Сошко С.В.[2], Дашкевич Э.В.[1], Свирновская Э.Л.[1], Хулуп Г.Я.[1]

[1]РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск;
[2]Ганцевичская станция переливания крови, Ганцевичи, Беларусь

Реферат. Герпесвирусная инфекция является социально-значимой проблемой в связи с высокой степенью (90%) инфицирования населения. Впервые в трансфузиологической практике Республики Беларусь предпринята попытка решения актуальной задачи профилактики и лечения герпетической инфекции с помощью получения гипериммунной донорской плазмы, содержащей антитела к клинически значимым типам вируса герпеса. С целью отбора доноров с высокими титрами противогерпесных антител кровь 131 донора обследована методом иммуноферментного анализа на наличие специфических IgG. Установлено, что у 88,5% доноров присутствуют противогерпесные антитела к вирусу простого герпеса I и II типа, 77,1% имеют антитела к цитомегаловирусу и только у 3,8% из обследованных выявлены антитела к раннему антигену EA вируса Эпштейна–Барр.

Ключевые слова: герпесвирусная инфекция, доноры крови, компоненты крови, титры противогерпесных антител, гипериммунная противогерпетическая плазма.

Введение. Среди вирусных заболеваний по частоте встречаемости герпесвирусная инфекция занимает одно из ведущих мест. Данная инфекция относится к числу наиболее социально значимых заболеваний, что обусловлено высокой восприимчивостью человека к вирусам герпеса и ежегодным ростом числа пациентов с герпесвирусными инфекциями как за рубежом, так и в странах СНГ. Повсеместное распространение вируса и более чем 90%-е инфицирование им человеческой популяции связано с пожизненной персистенцией вируса герпеса в организме инфицированных, значительным полиморфизмом клинических проявлений герпетической инфекции, торпидностью к существующим методам лечения [1]. По данным ВОЗ, герпесвирусные инфекции, как причина летальных исходов при вирусных заболеваниях, занимают второе место (15,8%) после гриппа (не считая СПИДа). В США, например, проблема герпесвирусной инфекции является одной из ведущих медико-социальных проблем уже более 25 лет. Особую опасность представляет герпесвирусный энцефалит, смертность от которого составляет около 70%, если вовремя не начато лечение [2].

Вирус герпесвируса (herpes — от греч. «ползучий») был впервые идентифицирован в 1924 г. С тех пор с помощью биологических и иммунохимических методов описано более 100 типов герпесвирусов, из них 8 наиболее патогенны для человека. Все они являются ДНК-геномными внутриклеточными паразитами и распространены повсеместно. Уникальными биологическими свойствами всех герпесвирусов человека являются тканевой тропизм, способность к персистенции и латенции в организме инфицированного человека. К наиболее клинически значимым герпесвирусам относятся: вирус простого герпеса 1 и 2 типа, вирус Эпштейна–Барр, цитомегаловирус [3].

При трансплантации органов и тканей инфекционные осложнения играют существенную роль и влияют на эффективность высокотехнологичного лечения. Разработка методов профилактики осложнений, повышение эффективности терапии после трансплантации органов и тканей является в настоящее время актуальной проблемой [4]. Установлено, что около 90% из обследованных реципиентов относятся к группам среднего и высокого риска развития посттрансплантационных осложнений, вызванных вирусами герпетической группы [5].

Лечение и профилактика герпетической инфекции требует комплексного подхода. Современная медицина не располагает методами лечения, позволяющими элиминировать вирусы герпеса из организма человека. Поэтому целью лечения является подавление их репродукции в период обострения инфекции, формирование адекватного иммунного ответа и его длительное сохранение с целью блокирования реактивации вируса герпеса в очагах персистенции [6].

В изучение проблемы герпетической инфекции, ее профилактики и лечения внесли большой вклад белорусские ученые Вотяков В.И., Коломиец Н.Д. и др. [7–10].

Одним из перспективных подходов к профилактике и лечению герпесвирусных инфекций является применение препаратов иммуноглобулина человека [11, 12]. К настоящему моменту установлено, что вирусспецифические антитела играют существенную роль в патогенезе герпетических ин-

фекций. Защитное действие герпесспецифических антител связывают как с их непосредственным участием в нейтрализации вирусных частиц, так и с активацией ими комплемент-опосредованного лизиса и антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности в отношении инфицированных вирусом герпеса клеток. Механизм действия иммуноглобулинов при герпесе длительное время объясняли заместительным эффектом на фоне присущей для этого заболевания несостоятельности гуморального иммунитета. В последние годы было установлено, что препараты иммуноглобулинов обладают также иммуномодулирующим и антитоксическим действием, активируют опсоно-фагоцитарные реакции. Их использование показано в клинической практике на ранних стадиях острых и рецидивирующих герпесвирусных инфекций (для лечения герпетического энцефалита, диссеминации инфекции, снижения активности процесса, специфической «дезинтоксикации»), а также для профилактики их развития [13].

Пассивная иммунотерапия вирусгерпесной инфекции заключается во введении в организм пациента готовых антител (противогерпетических иммуноглобулинов), выделенных из крови доноров. Однако специфические иммуноглобулины против вирусов герпеса пока не внедрены в широкую медицинскую практику. Данные препараты уже производятся за рубежом (Иммуноглобулин против вируса герпеса простого 2 типа человека, Гаммалин — иммуноглобулин против вируса герпеса простого 1 типа человека (Биофарма, Украина); Цитотект, Неоцитотект — иммуноглобулины человека антицитомегаловирусные (Biotest Pharma GmbH, Германия), однако они ограниченно доступны из-за достаточно высокой стоимости).

Использование аллогенных антигерпетических иммуноглобулинов в отечественной клинической практике позволит достичь нового уровня в иммунотерапии и иммунопрофилактике широкого ряда нозологий. Особенно это актуально для трансплантаций органов и тканей, когда активация персистирующей герпесвирусной инфекции приводит к серьезным осложнениям и неэффективности трансплантаций, а также в акушерстве и гинекологии для профилактики и лечения генитального, неонатального герпеса и т. д.

В связи с практически 100%-м инфицированием населения вирусами герпеса, необходимостью повышения профилактически-лечебных мероприятий при заболеваниях и оперативных вмешательствах нам представляется выполнение данного проекта актуальным и своевременным. Впервые в Республике Беларусь будет изучен уровень антител у доноров крови и компонентов крови к наиболее патогенетически значимым в клиническом плане типам вируса герпеса: вирусу простого герпеса 1 и 2 типа, цитомегаловирусу, вирусу Эпштейна–Барр. Будет разработана программа отбора доноров крови и компонентов крови с высокими титрами противогерпесных антител для создания базы данных доноров крови и компонентов крови с целью получения от них гипериммунной противогерпесной плазмы для повышения эффективности профилактики и лечения герпесвирусных осложнений.

Цель работы — изучение уровня противогерпесных антител у доноров крови и ее компонентов к наиболее патогенетически значимым в клиническом плане типам вируса герпеса для отбора доноров с высокими титрами противогерпесных антител и получения гипериммунной противогерпетической плазмы.

Материалы и методы. Методом иммуноферментного анализа в лаборатории серодиагностики инфекционных заболеваний РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Минск, Беларусь) обследована сыворотка крови 131 донора мужского пола в возрасте 18–35 лет на наличие антител класса IgG к вирусам простого герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловируса и к раннему антигену EA вируса Эпштейна–Барр. В работе использовали наборы для проведения исследований методом иммуноферментного анализа, зарегистрированные для клинико-диагностического применения в Республике Беларусь. Определение антител класса IgG к вирусу простого герпеса I и II типов проводили согласно инструкции по применению «Набора реагентов для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к вирусу простого герпеса первого и второго типов в сыворотке и плазме крови человека методом иммуноферментного анализа» «ИФА-Герпес 1 / 2-IgG» (УП «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии НАН Беларуси», Минск, Беларусь). Определение антител класса IgG к цитомегаловирусу проводили согласно инструкции по применению «Набора реагентов для иммуноферментного количественного и качественного определения иммуноглобулинов класса G к цитомегаловирусу в сыворотке (плазме) крови» «ЦМВ-IgG-

ИФА-БЕСТ)» (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ», Новосибирск, РФ). Определение антител класса IgG к раннему антигену ЕА вируса Эпштейна–Барр проводили согласно инструкции по применению «Набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к раннему антигену ЕА вируса Эпштейна-Барр в сыворотке (плазме) крови» «ВектоВЭБ-ЕА-IgG» (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ», Новосибирск, РФ).

В качестве высоких титров учитывали титры в 5–10 раз выше минимального значения, при котором выявляются антитела (по инструкции к каждому набору).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. В настоящее время донорская кровь обследуется серодиагностическими лабораториями службы крови Республики Беларусь на наличие антител к вирусам гепатита С, на ВИЧ 1 и 2, сифилис, на HBs-антиген. Если антитела и антигены к данным инфекциям отсутствуют, то доноры допускаются к донации.

Согласно действующему постановлению МЗ Республики Беларусь от 19.05.2011 № 37 «Об установлении перечня заболеваний и состояний, при которых сдача крови и ее компонентов противопоказана, и утверждении Инструкции о порядке медицинского осмотра доноров крови и ее компонентов, Инструкции о порядке учета доноров крови и ее компонентов» [14] герпесвирусная инфекция не входит в «Перечень заболеваний и состояний, при которых сдача крови и ее компонентов противопоказана».

Для создания базы данных доноров плазмы с высокими титрами противогерпесных антител были обследованы активные доноры крови и ее компонентов мужского пола в возрасте от 18 до 35 лет. В дополнение к п. 10 действующей «Инструкции о порядке медицинского осмотра доноров крови и ее компонентов» [14], в котором изложено, что «врач-специалист организации переливания крови при проведении медицинского осмотра донора собирает подробный анамнез и опрашивает донора в соответствии с требованиями карты-анкеты донора», для углубленного сбора анамнеза по перенесенной герпетической инфекции разработана «Анкета донора крови и ее компонентов для выявления высоких титров противогерпесных антител с целью получения гипериммунной противогерпетической плазмы». При наличии положительного ответа на вопросы данной анкеты кровь донора направляется врачом-специалистом на дополнительное исследование на наличие противогерпетических антител, и при их выявлении данная информация вносится в компьютерную базу данных для учета доноров с целью комплектования группы доноров противогерпесной плазмы.

На основании литературных данных, для серологического обследования крови доноров на наличие противогерпесных антител к клинически значимым типам герпеса определен метод серодиагностики — метод иммуноферментного анализа для выявления антител вторичного иммунного ответа класса IgG, сохраняющихся пожизненно после первичного инфицирования (рисунок).

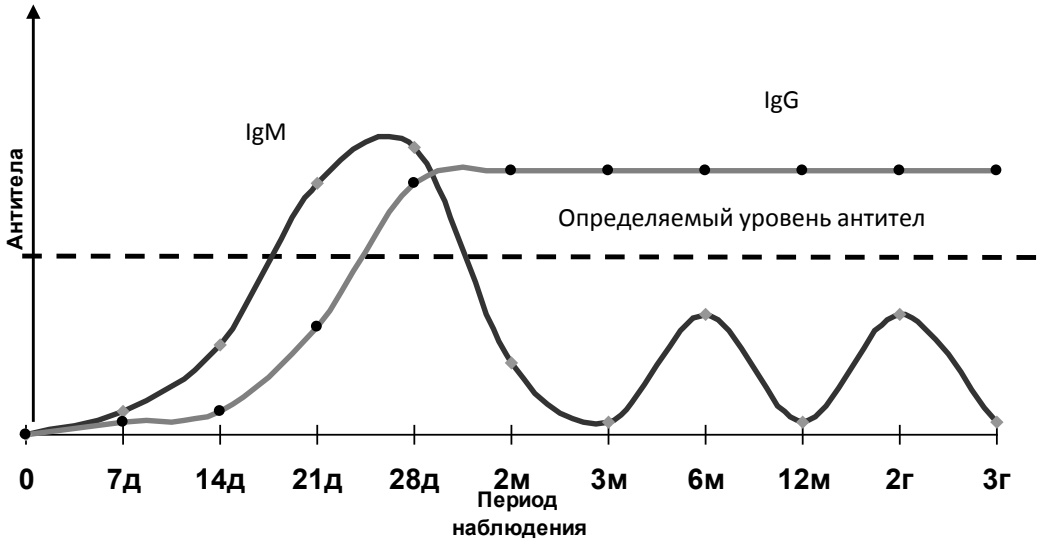


Рисунок — Иммунный ответ на герпесвирусную инфекцию (T. Mazzulli, 2014)

Обследована сыворотка от 131 донора крови и компонентов крови мужского пола в возрасте от 18 до 35 лет на наличие противогерпесных антител класса IgG к вирусу простого герпеса I и II типов (исследуются в одном наборе, т. к. между ними выявлено около 50% гомологии в структуре [1]), к цитомегаловирусу, к раннему антигену EA вируса Эпштейна–Барр.

Методом ИФА для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к вирусу простого герпеса I и II типов из 131 обследованного донора 116 (88,5%) имеют антитела, у 15 (11,5%) доноров антитела отсутствуют. Причем 75 доноров из 131 (57,3%) имеют повышенный уровень данных антител — более 2,0 оптических единиц.

При исследовании образцов сыворотки крови на антитела к цитомегаловирусу было выявлено, что из 131 обследованного донора 101 (77,1%) имеет антитела, а у 30 доноров антитела отсутствуют. Из 101 донора у 13 человек активность противоцитомегаловирусных антител составила от 4 до 5 РЕ/мл (в единицах эталонного препарата Института Пауля Эрлиха, Германия), у 37 из 101 — более 5 РЕ/мл, т. е. примерно 50% доноров имеют достаточно высокие титры антител к цитомегаловирусу.

Исследование сыворотки крови для выявления антител класса IgG к раннему антигену EA вируса Эпштейна–Барр показало, что из 131 обследованного донора данные антитела имеются только у 5 человек, что составляет 3,8% из числа обследованных доноров.

Результаты исследований у доноров по определению противогерпесных антител класса IgG к вирусу простого герпеса I и II типа, к цитомегаловирусу, к раннему антигену EA вируса Эпштейна–Барр в процентном соотношении представлены в таблице.

Таблица — Выявление противогерпесных антител класса IgG к вирусу простого герпеса I и II типа, к цитомегаловирусу, к раннему антигену EA вируса Эпштейна–Барр у доноров крови и ее компонентов РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, %

Противогерпесные антитела класса IgG	Количество положительных результатов, %	Количество отрицательных результатов, %
К вирусу простого герпеса I и II типа	88,5 (116/131), из них 57,3% доноров с высоким уровнем антител	11,5 (15/131)
К цитомегаловирусу	77,1 (101/131), из них примерно 50,0 % доноров с высоким уровнем антител	22,9 (30/131)
К раннему антигену EA вируса Эпштейна–Барр	3,8 (5/131)	96,2 (126/131)

Следует отметить, что из всех обследованных доноров (131) все четыре типа противогерпесных антител выявлены у 4 (3,1%) доноров, три типа противогерпесных антител к вирусу простого герпеса I и II типа и к цитомегаловирусу — у 85 (64,9%) доноров, к вирусу простого герпеса I и II типа — у 24 (18,3%) доноров и к одному типу (к цитомегаловирусу) — у 11 (8,4%) доноров. Полное отсутствие всех исследуемых антител определено у 5 (3,8%) из 131 обследованного донора.

Заключение. Исследования позволили установить неоднородность исследуемых показателей по количественному (наличие высоких и низких титров) и качественному составу противогерпесных антител у каждого из обследованных доноров. Данные исследования будут продолжены и направлены на создание базы данных доноров с высокими титрами противогерпесных антител для повышения эффективности профилактики и лечения герпесвирусных посттрансплантационных осложнений в рамках включения специфической гипериммунной плазмы в комплексную терапию герпетической инфекции и последующего получения сырья с целью производства противогерпесного иммуноглобулина в Республике Беларусь.

Работа выполняется в рамках ГНТП «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики», подпрограммы «Трансплантология и регенеративная медицина» по заданию НИР «Разработать и внедрить организационно-методическую программу отбора доноров для получения гипериммунной противогерпетической плазмы» (II кв. 2014 г. — IV кв. 2015 г.).

Литература

1. Герпес [Электронный ресурс]. — 2000. — Режим доступа: http://www.mariamm.ru/docprint.htm?id=104. — Дата доступа: 26.08.2014.

2. Herpes simplex virus infections / R.J. Whitley, B. Roizman // Lancet. — 2001. — Vol. 357. — P. 1513–1518.

3. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: учеб. / Л.Б. Борисов. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005. — 736 с.

4. Усс, А.Л. Трансплантация аутологичных стволовых гемопоэтических клеток в клинической практике / А.Л. Усс, В.А. Змачинский; науч. ред. А.И. Свирновский. — Минск: Беларус. наука, 2005. — С. 33 (п. 6).

5. Вирусные инфекции у пациентов после трансплантации почки / Т.В. Амросьева [и др.] // Здравоохранение. — 2012. — № 10. — С. 29–33.

6. 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.

7. Генерализованная герпетическая инфекция: Факты и концепция / А.Г. Коломиец [и др.]; под общ. ред. В.И. Вотякова, А.Г. Коломийца. — Минск: Навука і тэхніка, 1992. — 351 с.

8. Особенности эпидемиологии герпесвирусных инфекций в Беларуси / А.Г. Коломиец [и др.] // Здравоохранение. — 1998. — № 7. — С. 23–26.

9. Серологическая диагностика цитомегаловирусной инфекции / Т.В. Савицкая [и др.] // Здравоохранение. — 1998. — № 6. — С. 60–63.

10. Герпетическая инфекция человека, вызываемая ВПГ 1/2 (этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика) / Н.Д. Коломиец [и др.]. — Минск: БелМАПО, 2008. — 41 с.

11. Современная терапия герпесвирусных инфекций. руководство для врачей / В.А. Исаков [и др.]. — СПб.; М., 2004. — С. 65.

12. Barton, S. Setting standards for the development and use of complementary and alternative therapies in herpes / S. Barton // Herpes. — 2005. — Vol. 12, № 2. — P. 31.

13. Кудин, А.П. Роль *Herpes simplex* в патологии человека. Часть 3. Лабораторная диагностика, лечение и профилактика герпетической инфекции / А.П. Кудин, И.Г. Германенко, А.А. Астапов // Мед. новости. — 2004. — № 9. — С. 3–10.

14. Об установлении перечня заболеваний и состояний, при которых сдача крови и ее компонентов противопоказана, и утверждении Инструкции о порядке медицинского осмотра доноров крови и ее компонентов, Инструкции о порядке учета доноров крови и ее компонентов: постановление М-ва здравоохр. Респ. Беларусь от 19.05.2011 № 37 / Нац. реестр правовых актов Респ. Беларусь. — 2011. — № 69. — 8/23751.

15. Mazzulli, T. Herpes Viruses — Infectious Diseases: Herpesviridae – 1 [Electronic resource] / T. Mazzulli. — 2014. — Mode of access: www.infectiousdiseases.utoronto.ca. — Date of access: 04.06.2014.

IDENTIFICATION OF ANTI-HERPES VIRUS ANTIBODIES IN DONORS FOR PREPARATION OF HYPERIMMUNE ANTI-HERPES PLASMA

Peshnyak J.V.[1], Korzhel T.S.[1], Kalenchits I.A.[1], Soshko S.V.[2], Dashkevich E.V.[1],Svirnouskaya E.L.[1], Khulup H.Y.[1]

[1]Republic Research & Production Center for Transfusiology & Medical Biotechnologies, Minsk;

[2]Gantsevichi of Blood Transfusion Station, Gantsevichi, Belarus

Herpes infection is a socially significant problem due to a high degree (90%) of the population infected by herpes viruses. For the first time in transfusion practice in the Republic of Belarus attempt was made to solve the actual problem of the prevention and treatment of HSV infection by obtaining a hyperimmune donor plasma containing antibodies to clinically significant types of herpes virus. Blood of 131 donors was examined by ELISA for the presence of specific IgG in order to select donors with high titers of anti-herpes antibodies. It was found that 88.5% donors contained anti-herpes antibodies to herpes simplex virus type I and II, 77.1% of them had antibodies to cytomegalovirus, and only 3.8% of the surveyed persons had antibodies to the early antigen of Epstein-Barr virus.

Keywords: herpesvirus infection, donors of blood and blood components, anti-herpes antibody titers, hyperimmune anti-herpes plasma.

Поступила 26.08.2014

АСТРОЦИТАРНАЯ ГЛИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ И ПРИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ, ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полещук Н.Н.[1], Квачева З.Б.[1], Рубаник Л.В.[1], Докукина Т.В.[2]

1РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;
[2]РНПЦ психического здоровья, Минск, Беларусь

Реферат. Получена модель персистентной прионовой инфекции в культуре нейроглиальных клеток крысы С6 и определены морфологические маркеры инфекции. Выявлено, что внесение PrP^{Sc}27–30 в клеточную систему индуцирует появление реактивных астроцитов с накоплением глиального фибриллярного кислого белка и аккумуляцией промежуточных филламентов в виде своеобразных тяжей. Охарактеризован апоптозный путь гибели клеток, индуцированный PrP^{Sc}27–30.

Ключевые слова: нейродегенеративные заболевания, прионы, астроциты.

Введение. При болезни Альцгеймера и ряде других нейродегенеративных заболеваний, включая прионные инфекции, астроциты накапливают в цитоплазме избыточное количество глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ). При этом в ткани мозга наблюдается появление амебоидной и реактивной астроглии [1–4]. До сих пор не установлено, из каких клеток (фиброзных или протоплазматических астроцитов) формируется этот необычный тип астроцитов.

По морфологии реактивные астроциты отличаются как от протоплазматических, так и от фиброзных астроцитов. Они крупнее, имеют более толстые отростки и экспрессируют в большем количестве ГФКБ, входящий в состав глиофилламентов. Высказывается мнение, что реактивные астроциты отвечают за иммунологические реакции в центральной нервной системе (ЦНС). Кроме того накопились данные, что астроциты у взрослого человека более гетерогенны, чем это принято считать. Указывается на наличие так называемых транзиторных или «камбиальных» мультипотентных клеток, которые способны при антигенной стимуляции трансформироваться в тот или иной субтип астроцитов [5–7].

В топографическом отношении в центральной нервной системе астроциты занимают особое положение, располагаясь между капиллярами и нейронами, участвуя тем самым в селективном отборе веществ, поступающих через гематоэнцефалический барьер. Отростки астроцитов обладают также особым сродством к рецепторным поверхностям нейронов (строме, дендритам). Более того, синаптическая щель отдельных синапсов на 75–85% покрыта астроглией. Отсюда становится понятно, почему любые расстройства метаболизма астроглии быстро приводят к нарушению деятельности нейронов.

Астроциты, очевидно, определенные их субтипы, участвуют в иммунологических реакциях в забарьерном органе, которым является центральная нервная система. Они могут продуцировать различные цитокины, включая ФНОα, интерлейкины ИЛ-1β, ИЛ-16, лимфотоксины, интерферон γ, гранулоцит-стимулирующий фактор и т. д. Все эти данные указывают, что астроциты в ЦНС являются основной системой клеток опосредующей и возможно координирующей иммунологические реакции и, как следствие, косвенно ответственные за формирование амилоидных бляшек, ведущих к дегенеративным изменениям в тканях мозга.

Заслуживает внимания интерес исследователей, выявивших, что при болезни Альцгеймера пептид, включающий 28 аминокислотных остатков амилоидного β-белка, вызывает сходные с прионами (PrP^{Sc}27–30) изменения в культуре клеток и оказывает цитотоксическое действие при постепенном увеличении дозы. Эти и другие исследования свидетельствуют о некотором параллелизме между PrP^{Sc}27–30 и амилоидным β-белком [8, 9]. Анализ реакций астроглиальных клеток при прионовых инфекциях, обуславливающих специфические особенности патоморфологической картины, может раскрыть некоторые механизмы развития дегенеративных процессов в ЦНС (апоптоз, некроз).

Таким образом, имеющиеся сведения указывают на актуальность изучения роли астроглии в патогенезе нейродегенеративных и прионных заболеваний ЦНС. Удобными экспериментальными моделями для изучения ответа астроцитов на антигенное воздействие являются культуры глиальных клеток.

Цель работы — создание модели прионовой инфекции в культуре клеток для установления степени структурно-модификационных преобразований в различных субтипах астроцитов под действием возбудителя скрепи $PrP^{Sc}27–30$.

Материалы и методы. *Возбудитель.* В работе использовали эталонный штамм скрепи — 263К, предоставленный доктором I.F. Deslys (Департамент нейропатологии, Франция). Возбудитель адаптирован к мозговой ткани сирийских хомячков, хранится в 10%-й суспензии ткани мозга при –80° С, инфекционный титр — 6,5 $LD_{50/мл}$.

Культура клеток. Использовали перевиваемую линию культуры клеток глиомы крысы — С6, полученную из коллекции культур клеток Института цитологии РАМН РФ (г. Санкт-Петербург). Способ культивирования — монослойный. Условия культивирования: ростовая среда — среда Игла (90%), сыворотка плодов коров (10%), антибиотик — гентамицин (100 мкг/мл.). Процедура пересева: снятие клеток с подложки 0,02%-м раствором Версена. Посевная доза — $1,5\times10^5$ кл/мл. Монослой клеток формируется в течение 3–4 дней.

Пролиферативную активность культур клеток изучали в стационарной фазе роста после образования сплошного монослоя (4–5-е сут роста). Клетки подсчитывали в камере Горяева. Индекс пролиферации клеток вычисляли отношением количества выросших клеток к посеянным.

Изучение морфологии клеток проводили с использованием светового микроскопа (Ув. х100–600 раз) на разных пассажных уровнях после фиксирования (96% спирт, 30 мин) и окрашивания образцов гематоксилином и эозином (5–10 мин). Приготовление постоянных препаратов осуществляли обезвоживанием клеток возрастающими концентрациями этанола (50, 70 и 90%) с последующим просветлением в ксилоле и заключением в канадский бальзам.

Инфицирование культур проводили при их пересеве, добавляя к 1 мл клеточной суспензии 0,1 мл инфекционного материала (титр — 3,5 $LD_{50/мл}$). Флаконы с культурами инкубировали при 37°С, ежедневно наблюдая и отмечая под микроскопом целостность и плотность клеточного монослоя, морфологию клеток. Субпассирование культур осуществляли в течение 120–140 дней (9–10 пересевов). Контролем служили интактные культуры, поддерживаемые в субпассажах. Жизнеспособность клеток оценивали по способности к окраске 0,4%-м раствором трипанового синего. В камере Горяева подсчитывали количество погибших (окрашенных) и живых (неокрашенных) клеток, которое выражали в процентах.

Определение продукции глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ), *нестина, виментина* в культивируемых астроцитах опытных и контрольных групп проводили непрямым методом флуоресцирующих антител (НМФА) по раннее описанной методике [2] и методом проточной цитофлуориметрии. Использовали поликлональную кроличью антисыворотку к ГФКБ в рабочем разведении 1:40 (Sigma) и моноклональные сыворотки к нестину и виментину в рабочем разведении 1:100 (Sigma). Анализировали 200–300 клеток в 10–15 полях зрения люминисцентного микроскопа (ув. х450 раз) или 100 тыс. клеток при оценке методом цитофлуориметрии.

Определение показателей процесса апоптоза и некроза. Для определения маркеров апоптоза использовали тест-систему Annexin-V-Fluos (Roche, Германия), содержащую пропидий иодид и ФИТЦ-аннексин. Для этого 4-суточную культуру интактных и инфицированных клеток (3-й пассаж) переводили в суспензию. Клетки обрабатывали аннексином для идентификации фосфатедилсерина на наружном слое клеточной мембраны, что позволило выявить пул клеток, претерпевающих ранние стадии апоптоза. Исходный пул клеток гейтировали по прямому и боковому светорассеянию. Для идентификации гиподиплоидного пика на гистограмме клеточного цикла (маркер завершенного апоптоза) часть клеток фиксировали 70%-м этанолом. После отмывки фосфатно-цитратным буфером клетки помещали в раствор, содержащий 125 мкл РНК-азы (50 мкг/мл) с добавлением 125 мкл пропидий иодида (75 мкг/мл). После экспозиции в данном растворе в течение 30 мин клетки были исследованы на проточном цитофлуориметре FACS-vantage. Возбуждение флюоресценции ФИТЦ-аннексина осуществляли аргоновым лазером ($\lambda_{возб.}$ = 488 нм), регистрацию ($\lambda_{регист.}$ = 630) сигнала проводили при λ = 530 нм. Для пропидий иодида $\lambda_{возб.}$ = 535.

Детекцию прионного белка $PrP^{Sc}27–30$ проводили прямым иммунопероксидазным методом с использованием моноклональных антител SAF-70, конъюгированных с пероксидазой хрена (Институт Пастера, Франция). Связывание антител с антигеном визуализировали с помощью гистохимической реакции согласно прилагаемой инструкции.

Электронная микроскопия. Для ультраструктурного анализа клетки инфицированной культуры помещали в 2,5%-й раствор глутарового альдегида, приготовленного на фосфатном буфере (pH 7,2–7,4). Затем осуществляли дофиксацию образцов в 1%-м растворе четырехокиси осьмия с последующим обезвоживанием в спиртах восходящей концентрации и пропиткой в смолах пониженной вязкости марки Spurr согласно общепринятым методикам. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме Ultracut E (Reichert, Австрия) и исследовали на микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при различных увеличениях x6000–250000.

Статическая обработка результатов. При статической обработке экспериментальных данных вычисляли среднеарифметические величины, их доверительные интервалы и проводили оценку достоверности различий числовых результатов по критерию Фишера–Стьюдента. Разницу считали достоверной при $p<0,05$

Результаты и их обсуждение. *Моделирование скрепи в культуре клеток глиомы крысы С6.* После внесения в клеточную суспензию возбудителя скрепи в дозе 3,5 $LD_{50/мл}$ получали монослойные культуры, которые поддерживали в течение 9 субпассажей, ежедневно учитывая состояние и ростовые особенности различных субтипов клеток. На первых этапах наблюдения в течение 5 сут каких-либо изменений в морфологии клеток выявить не удалось.

Постепенно к 2–7 пассажу в опытных культурах клеток начал проявляться цитопатический эффект. Индекс пролиферации составил 6–10, в интактных культурах — 5–6. Причем наиболее выраженное усиление цитопролиферативного эффекта в 1,2–1,7 раза отмечено на 1–3-м пассаже и составило 7,4–10. Постепенно к 4–7 пассажу отмечалось снижение скорости генерации нового пула клеток до контрольного. Индекс пролиферации клеток в контрольных культурах в течение 7-ми пассажей был на одном уровне.

Увеличение пролиферативной активности клеток в опытной культуре сопровождалось более высокой плотностью монослоя. Кроме того, в монослое зафиксирована гипертрофия и морфологическая трансформация части клеток с формированием многослойных очагов усиленного роста. К 3–4-му пассажу отчетливо наблюдались 2–4-слойные очаги, в которых клетки выглядели округлыми и более крупными. Постепенно в очажках клетки теряли свои адгезивные свойства и в стационарной стадии роста отслаивались от монослоя. Определение в субпассажах количества жизнеспособных клеток показало, что 10–12% из них прокрашиваются трипановым синим и имеют признаки дистрофических изменений. Охарактеризованное цитопатическое действие не отмечалось в контрольных культурах.

Обработка культур антителами к ГКФБ (маркеру астроцитов), нестину и виментину (показатель нейральных стволовых и прогениторных клеток) показала, что наибольшее количество клеток содержащих эти маркеры регистрируется в очажках пролиферации. Общее количество клеток продуцирующих данные белки составило 30–40%. В интактных культурах этот показатель составил 3–5% клеток.

Детекция в клетках PrP^{Sc}27–30 при обработке культур моноклональными антителами к прионному белку выявила его накопление, как в отдельных клеточных элементах, так и в очагах многослойного роста. Причем в пролиферирующих клетках, локализованных в очажках и реактивных астроцитах, концентрация PrP^{Sc}27–30 была значительно выше, чем в других клетках монослоя. Общее количество клеток с детектируемым PrP^{Sc}27–30 достигало к 7-му пассажу 10–25% популяции.

Электронно-микроскопический анализ показал, что астроцитарные клетки под действием возбудителя претерпевают сложные ультраструктурные изменения. Преимущественно в реактивных астроцитах отмечается увеличение количества ядрышек до 5 и накопление промежуточных филламентов и микротрубочек в цитоплазме. Иногда промежуточные филламенты продуцируются в таком количестве, что заполняют всю область периферической цитоплазмы, образуя в отростках своеобразные тяжи из глиофилламентов. Некоторые из них напоминают фибриллы, сходные с фибриллами Розенталя, описанными при рассеянном склерозе [5–7]. Ультраструктурный анализ показал, что цитодеструктивные изменения отмечаются у части астроцитов, подвергшихся до этого морфологической трансформации (реактивных астроцитах). Наблюдаемые в астроцитах сдвиги можно охарактеризовать как пролиферативно-дистрофические с преобладанием процессов активации над цитодеструкцией.

Таким образом, моделирование прионовой инфекции в культуре нейроглиальных клеток показало, что внесение возбудителя скрепи вызывает установление персистентной формы инфекции и индуцирует появление новых морфотипов астроцитов. Новизна полученных результатов заключается в установлении фенотипа клеток в очагах повышенной пролиферации, характеризующихся свойствами нейтральных стволовых и прогениторных клеток, которые наиболее чувствительны к PrP^{Sc}27–30. Степень выраженности морфологических изменений клеток коррелирует с нарастанием количества возбудителя скрепи. Наивысшему значению титра возбудителя, определенному на 5-м пассаже, соответствует с одной стороны максимальная плотность клеток в монослое, с другой — большое количество клеток с дегенеративными изменениями, т. е. отмечена прямая зависимость выраженности цитопатического действия от титра возбудителя скрепи.

Определение механизма гибели клеток при развитии инфекции, вызванной возбудителем скрепи в культуре клеток С6. Выявление маркеров апоптоза с пропидий иодидом и ФИТЦ аннексином проводили на 3-м пассажном уровне. Клетки гейтировали по прямому и боковому светорассеянию. Для констатации ранних стадий апоптоза клетки обрабатывали аннексином. Остатки фосфатидилсерина на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны клеток на ранних стадиях апоптоза перемещаются во внешний мембранный слой, и аннексин прочно связывается с его экспонированными молекулами. Для определения поздних стадий апоптоза клетки обрабатывали РНК-азой и пропидий йодидом и исследовали на проточном цитофлуориметре. Пропидия йодид способен проникать только в погибшие клетки, имеющие мембранные дефекты, и связываться там с нуклеиновыми кислотами. Измерения в течение каждых 6 ч с гейтированием ДНК свидетельствовали о выраженной динамике процессов развития апоптоза под действием PrP^{Sc}27–30 (рисунок 1). При этом отмечалось частичное сохранение пролиферативной активности клеток.

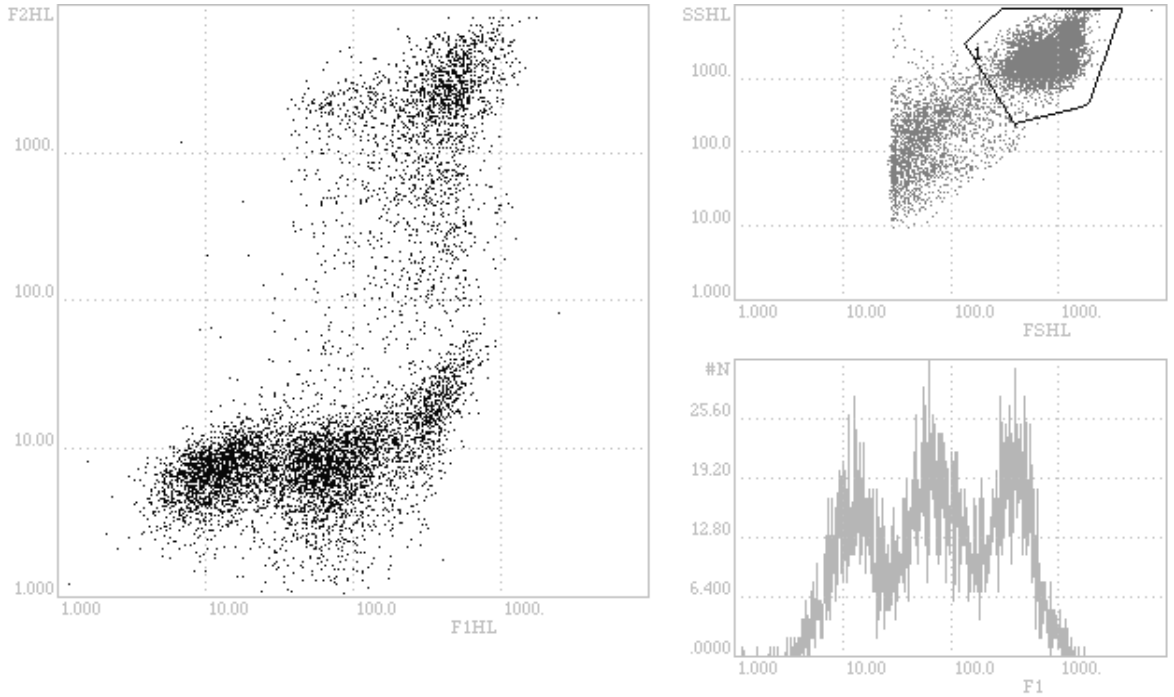


Рисунок 1 — Проявления ранних стадий апоптоза, идентифицируемые в аннексиновом тесте в инфицированной культуре С6 через 6 ч

Установление на гистограмме субдиплоидного пика клеточного цикла свидетельствовало о «вхождении» клеток в позднюю стадию апоптоза, что сопровождалось интернуклеосомной сегрегацией хроматина и формированием так называемых апоптозных тел. Интенсивность данного процесса достигала 16,1±0,8% в инфицированной культуре в течение 24-часового периода.

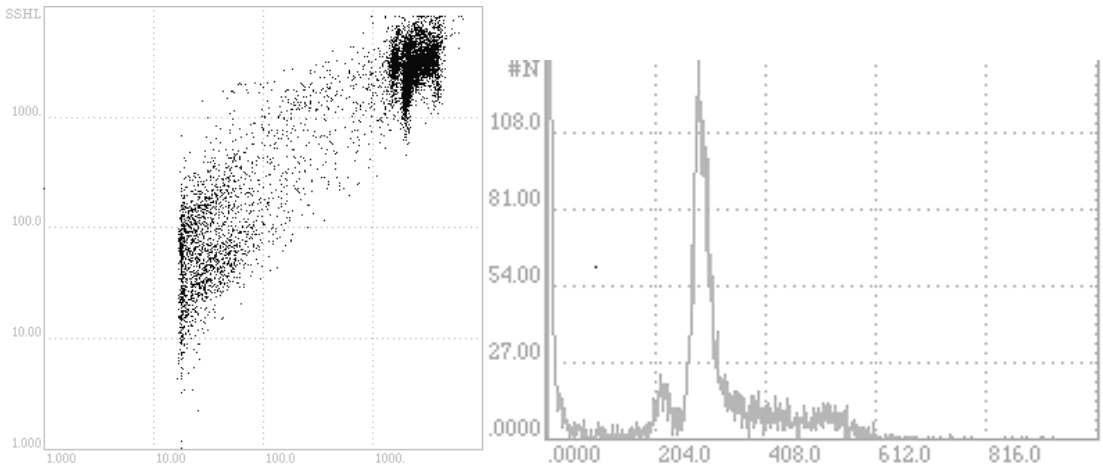


Рисунок 2 — Распределение фрагментов ДНК окрашенных пропидий йодидом в инфицированной культуре С6 через 24 ч

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют об индукции процессов апоптоза в культуре клеток под действием PrP^{Sc}27–30. Специфические особенности реакции клеток данной популяции заключались в сохранении митотической активности части клеток, несмотря на действие возбудителя в культуре. Полученные данные позволили констатировать наличие нескольких субпопуляций астроцитов, находящихся на разных стадиях дифференцировки, и разной степени их чувствительности к возбудителю скрепи.

Заключение. В результате проведенной работы получена модель прионовой инфекции в культуре клеток, в которой индуцируется формирование реактивных астроцитов с накоплением ГФКБ, входящего в состав промежуточных филламентов. Последние формируют необычные внутриклеточные скопления, во многом напоминающие процесс, отмечаемый в ЦНС людей с нейродегенеративными заболеваниями. Кроме того, охарактеризован апоптозный путь гибели клеток индуцированный PrP^{Sc}27–30. Данная модель перспективна для изучения и выявления закономерностей реактивации астроцитов при дегенеративных заболеваниях ЦНС, включая болезнь Альцгеймера.

Литература

1. Абдурасулова, И.Н. Роль иммунных и глиальных клеток в процессах нейродегенерации / И.Н. Абдурасулова, В.М. Клименко // Мед. акад. журн. — 2011. — № 1. — С. 12–29.

2. Развитие апоптоза в астроглии при моделировании скрепи *in vitro* и *in vivo* / З.Б. Квачева [и др.] // Новости мед.-биол. наук. — 2004. — № 1. — С. 65–71.

3. Pekny, M. Astrocyte activation and reactive gliosis / M. Pekny, M. Nilsson // Glia. — 2005. — Vol. 50. — P. 427–434.

4. GFAP and its role in Alexander disease / R.A. Quinlan [et al.] // Exp. Cell Res. — 2007. — Vol. 313. — P. 2077–2087.

5. Болезни нервной системы: руководство для врачей: в 2 т. / под ред. Н.Н. Яхно, Д.Р. Штульмана. — 2-е изд. — М.: Медицина, 2001. — Т. 2. — 480 с.

6. Дамулин, И.В. Когнитивные расстройства. Некоторые вопросы клиники, диагностики, лечения / И.В. Дамулин. — М., 2012. — 19 с.

7. Деменции: руководство для врачей / Н.Н. Яхно [и др.]. — М.: МЕДпресс-информ, 2010. — 272 с.

8. Small, D.H. Network dysfunction in Alzheimer's disease: does synaptic scaling drive disease progression? / D.H. Small // Trends Mol. Med. — 2008. — Vol. 14, № 3. — P. 103–108.

9. Caramelli, P. Prion protein gene in Alzheimer's disease / P. Caramelli // Arq. Neuropsiquatr. — 2013. — Vol. 71, № 7. — P. 419–420.

ASTROCYTIC GLIA IN PATHOGENESIS OF NEURODEGENERATIVE AND PRION DISEASES: CULTURE, IMMUNOCYTOCHEMICAL, AND ULTRASTRUCTURAL STUDIES

Poleshchuk N.N.[1], Kvacheva Z.B.[1], Rubanik L.V.[1], Dokukina T.V.[2]
[1]Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk;
[2]Republican Research & Practical Centre for Mental Health, Minsk, Belarus

A model of persistent prion infection in neuroglial cells culture of rat C6 was obtained and morphological markers of infection was defined. It was revealed that the introduction of PrP^{Sc}27–30 into cell sys-

tem induces the reactive astrocytes, with the accumulation of glial fibrillary acidic protein and the formation of intermediate fillaments in the form of original strands. Apoptotic cell death pathway induced by PrP^{Sc}27–30 is characterized.

Keywords: neurodegenerative diseases, prions, astrocytes.

Поступила 30.07.2014

ОСОБЕННОСТИ НАБОРА «НЕЙТРАЛЬНЫХ» ПРОТЕИНАЗ ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Пыжова Н.С., Никандров В.Н.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. С использованием различных белков-субстратов показано, что патогенные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* обладают протеиназами, проявляющими активность при нейтральных значениях pH. Судя по результатам ингибиторного анализа и динамике изменения протеолитической активности (казеино-, желатино- и фибриногенолитической), патогенные псевдомонады синтезируют несколько «нейтральных» протеиназ. Важную роль в функциональной активности этих энзимов играют металлы. В то же время сериновые и цистеиновые протеиназы не являются основными компонентами внеклеточного протеиназного арсенала псевдомонад.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, патогенные штаммы, «нейтральные» протеиназы, ингибиторный анализ, белки-субстраты.

Введение. Среди возбудителей нозокомиальных инфекций одно из примечательных мест принадлежит *Pseudomonas aeruginosa*. Этот микроорганизм способен инфицировать разнообразные органы и ткани, особенно при снижении резистентности организма, вызывая острые и хронические заболевания инфекционной этиологии при возрастающих летальности и смертности. Так, при псевдомонадной бактериемии летальность достигает 18–39% [1]. По данным Национальной системы контроля за нозокомиальными инфекциями США (NNIS), *P. aeruginosa* — самый частый возбудитель нозокомиальной пневмонии, один из ведущих возбудителей инфекций мочевыводящих путей и хирургических инфекций [2].

Микроорганизм способен существовать вне организма в виде свободно живущей (планктонной) и биопленочной (прикрепленные к поверхности сообщества микроорганизма) форм. Считают, что именно для первой формы характерны бактериемия и сепсис, тогда как биопленочная форма — коренная причина хронических инфекций [3].

Штаммы *P. aeruginosa*, вызывающие заболевания с возрастающими летальностью и смертностью, характеризуются множественной резистентностью к лекарственным средствам или даже панрезистентностью к антибиотикам [4]. При хроническом инфицировании легких *P. aeruginosa* практически невозможно добиться эрадикации инфекции доступными антибиотиками [5]. Большинство штаммов *P. aeruginosa*, выделяемых у больных в отделениях реанимации и интенсивной терапии, полирезистентны [4]. Уже не редкость и панрезистентные штаммы синегнойной палочки — описаны вызванные ими вспышки нозокомиальных инфекций [6].

В подобной ситуации, как мы уже отмечали ранее, особое значение приобретает разработка приемов подавления образования и активности факторов патогенности данных микроорганизмов [7].

Принято считать, что вирулентность псевдомонад определяется продуцированием ими специфического экзотоксина (механизм его действия подобен таковому дифтерийного гистотоксина), гемолизинов и протеиназ: нейтральной протеиназы, эластазы и щелочной протеиназы [8, 9]. Однако особенности набора протеолитических энзимов патогенных штаммов *P. aeruginosa* и их накопления в культуре остаются недостаточно изученными. Ранее нами были изложены предварительные результаты только об отдельных особенностях набора внеклеточных протеиназ таких штаммов микроорганизма [10].

Цель работы — изучение особенностей набора внеклеточных «нейтральных» протеиназ патогенных штаммов *P. aeruginosa* и образования этих энзимов при росте микроорганизма на жидких питательных средах.

Материалы и методы. В работе использовали фенилметилсульфонилфторид (PMSF) (Sigma, США), диизопропилфторфосфат (DPF), бактоагар типа «Difco» (Ferak, Германия), кумасси голубой G-250 (Fluka, Швейцария), *p*-хлормеркурибензоат (*p*-CMB, Chemapol, Чехия), этилендиаминтетраацетат динатриевая соль (EDTA) (Reanal, Венгрия). Фибриноген человека был изготовлен РНПЦ гематологии и трансфузиологии Минздрава Республики Беларусь, казеин по Гаммерстену и желатин (для инъекций), а также другие реактивы квалификации «хч» или «чда» были произведены в странах СНГ, их использовали после соответствующей дополнительной очистки.

Штамм АТСС 15442 *P. aeruginosa*, полученный из музея Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича (Москва, РФ), любезно предоставлен сотрудниками ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» Минздрава Республики Беларусь. Госпитальные штаммы микроорганизма предоставлены сотрудниками лаборатории внутрибольничных инфекций ЦНИЛ Белгосмедуниверситета.

Монокультуру микроорганизма поддерживали и культивировали на питательном бульоне на основе гидролизата кильки (НПО «Микроген», Махачкала) как подробно описано нами ранее [11]. Динамику роста биомассы учитывали турбидиметрически при 600 нм. Пробы культуральной жидкости отбирали каждые 2 ч. Биомассу отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об./мин, супернатанты использовали для анализа. Осадок клеток отмывали 0,15М раствором NaCl, суспендировали в таком же растворе и использовали для анализа.

Протеолитическую активность определяли методом лизиса фибриновых пластин, а также по лизису белков-субстратов в тонком слое агар-агара как описано в нашей статье [12]. Концентрация белков составляла 5 или 10 г/л, агар-агара — 10 г/л. В качестве растворителя для приготовления пластин использовали 0,01 или 0,05М трис-HCl буфер pH 7,5. Пластины с нанесенными пробами инкубировали при 37°С в течение 24 ч. Зоны лизиса визуализировали обработкой белок-агаровых пластин 2 н. трихлоруксусной кислотой.

Удельную скорость накопления протеолитической активности рассчитывали в соответствии с рекомендациями [13].

Все исследования выполнены не менее чем 4-кратно. Результаты обработаны статистически с вычислением *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Исследования протеолитической активности восьми штаммов *P. aeruginosa,* выделенных от больных хирургических отделений стационаров г. Минска, показали, что этот признак значительно варьирует не только среди штаммов, но и в зависимости от использованного белка-субстрата. Причем такая картина характерна не только для протеиназ супернатантов культуральной жидкости, но и для энзимов, связанных с мембраной клетки микроорганизма (рисунки 1, 2).

Тем не менее, «нейтральная» протеолитическая активность присуща всем без исключения штаммам микроорганизма, хотя она была выражена в разной степени. Например, отмытые клетки микроорганизма не расщепляли сывороточный альбумин, за исключением шт. 3/3, и только клетки шт. 13_{p3} были способны расщеплять фибрин. Клетки ни одного из штаммов не имели «нейтральной» протеиназы, расщепляющей казеин. Следует, правда, отметить, что все исследования проведены без добавления в реакционную систему неорганического ортофосфата, существенно усиливающего расщепление белков протеиназами [14]. Однако и в этих условиях клетки всех штаммов достаточно интенсивно расщепляли тромбин и особенно — фибриноген быка (рисунок 1). Протеолитическая активность отмытых клеток псевдомонад и бесклеточной культуральной жидкости также различалась. Из материалов рисунков 1 и 2 видно, что в целом казеин не является оптимальным субстратом для исследования протеолитической активности патогенных штаммов *P. aeruginosa*. Более предпочтительно использование фибриногена, что позволяет выявить протеолитическую активность при нейтральных значениях pH у всех штаммов.

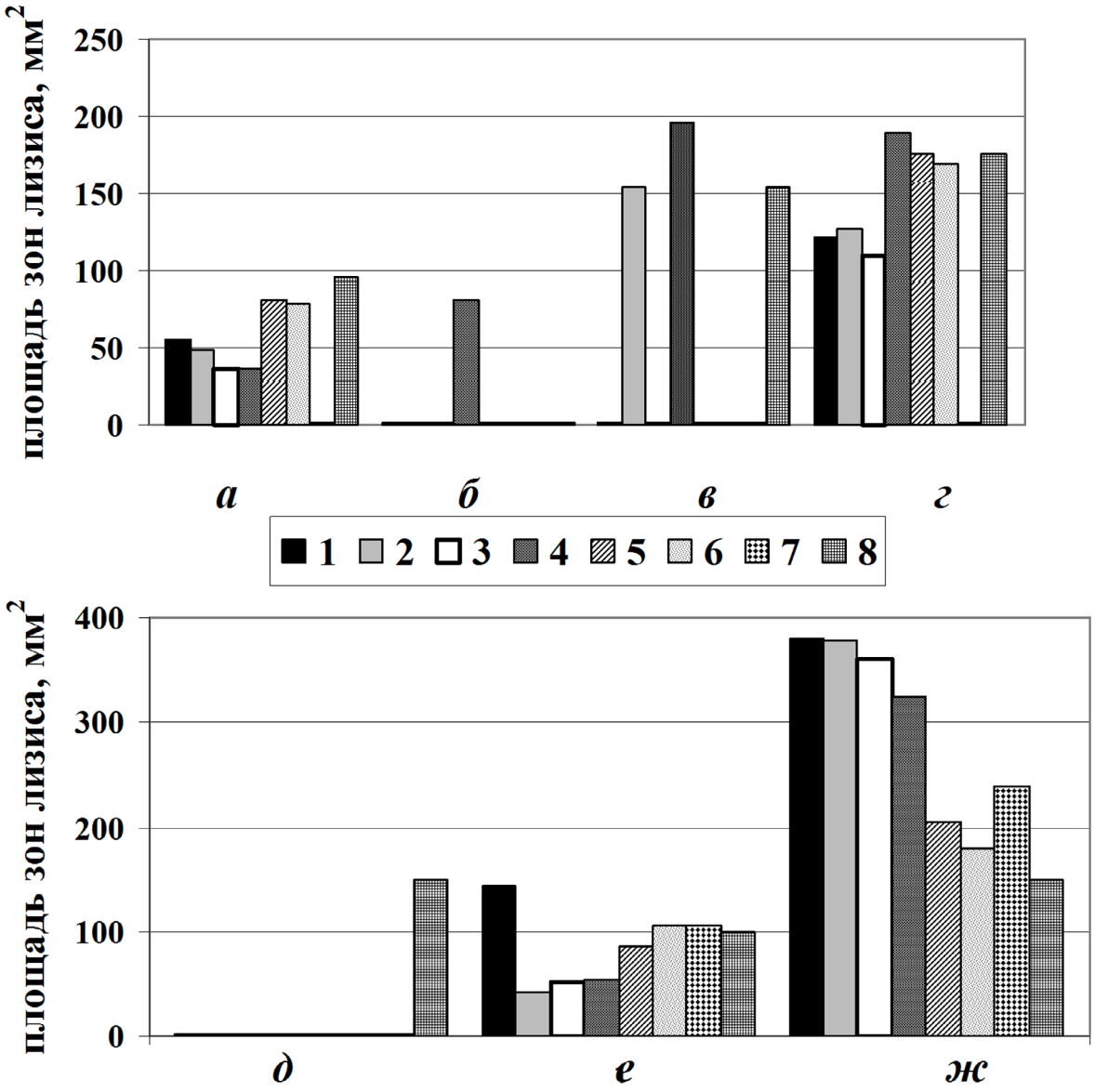


Рисунок 1 — Расщепление белков-субстратов (*а* — гемоглобин; *б* — сывороточный альбумин; *в* — желатин; *г* — тромбин; *д* — фибрин; *е* — фибриноген человека; *ж* — фибриноген быка) суспензией отмытых клеток патогенных штаммов *P. aeruginosa* (штаммы: 1 — $92/1_{гоб1}$; 2 — $74/5_{гоб4}$; 3 — $23/2_{гоб2}$; 4 — 3/3; 5 — $11/2_{рз}$; 6 — $12/2_{рз}$; 7 — $74/5_{гоб3}$; 8 — $13_{рз}$), возраст культуры — 24 ч; концентрация белков-субстратов — 5 г/л, растворитель — 0,01 М трис-HCl буфер pH 7,5

Уже эти данные показывают, что патогенные штаммы *P. aeruginosa* обладают довольно сложным набором «нейтральных» протеиназ. Учитывая способность их расщеплять фибриноген и тромбин, не возникает сомнений в существенной патогенетической роли протеолитических энзимов патогенных псевдомонад.

Ингибиторный анализ протеиназ пула супернатантов культуральной жидкости тех же 8 штаммов при использовании разных белков-субстратов показал, что нейтральные протеиназы во всех случаях наиболее сильно подавляются EDTA, что указывает на важную роль металлов в функции этих энзимов (рисунок 3).

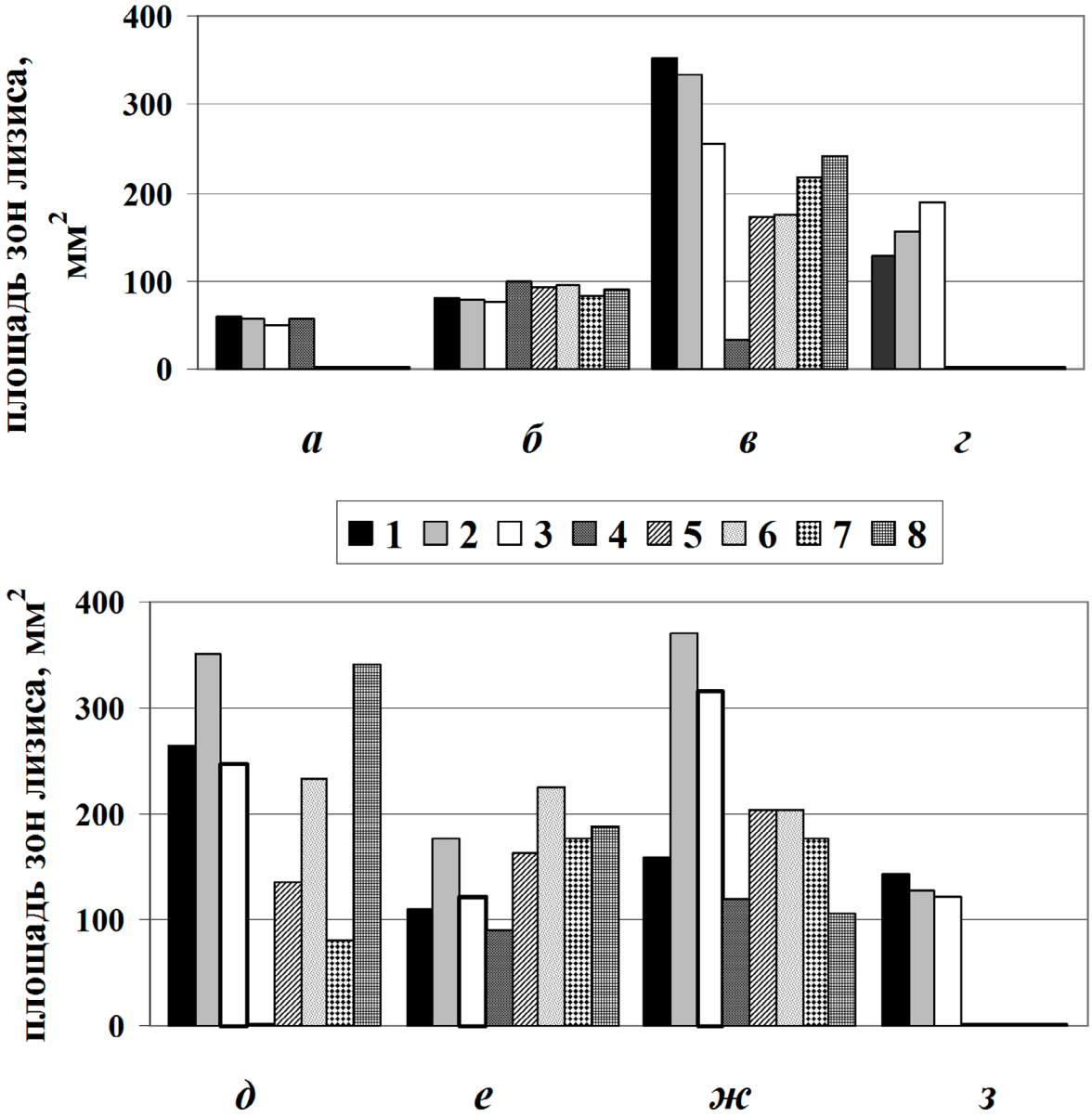


Рисунок 2 — Расщепление белков-субстратов (*а* — гемоглобин; *б* — сывороточный альбумин; *в* — желатин; *г* — тромбин; *д* — фибрин; *е* — фибриноген человека; *ж* — фибриноген быка; *з* — казеин) супернатантами культуральной жидкости патогенных штаммов *P. aeruginosa*. Остальные обозначения и условия те же, что в рисунке 1

Что касается расщепления желатина, то судя по действию ингибиторов, оно осуществляется металлопротеиназой. Фактически лишь при расщеплении казеина отмечено заметное угнетение протеолиза *о*-фенантролином и гидроксихинолином. Это дает основания считать, что желатин и казеин расщепляются разными протеиназами.

Ингибиторы сериновых и цистеиновых протеиназ оказали на расщепление использованных белков-субстратов весьма умеренное действие, не превышающее 30%. Подобный эффект позволяет считать, что упомянутые группы протеолитических энзимов не являются основными компонентами набора «нейтральных» протеиназ патогенных псевдомонад.

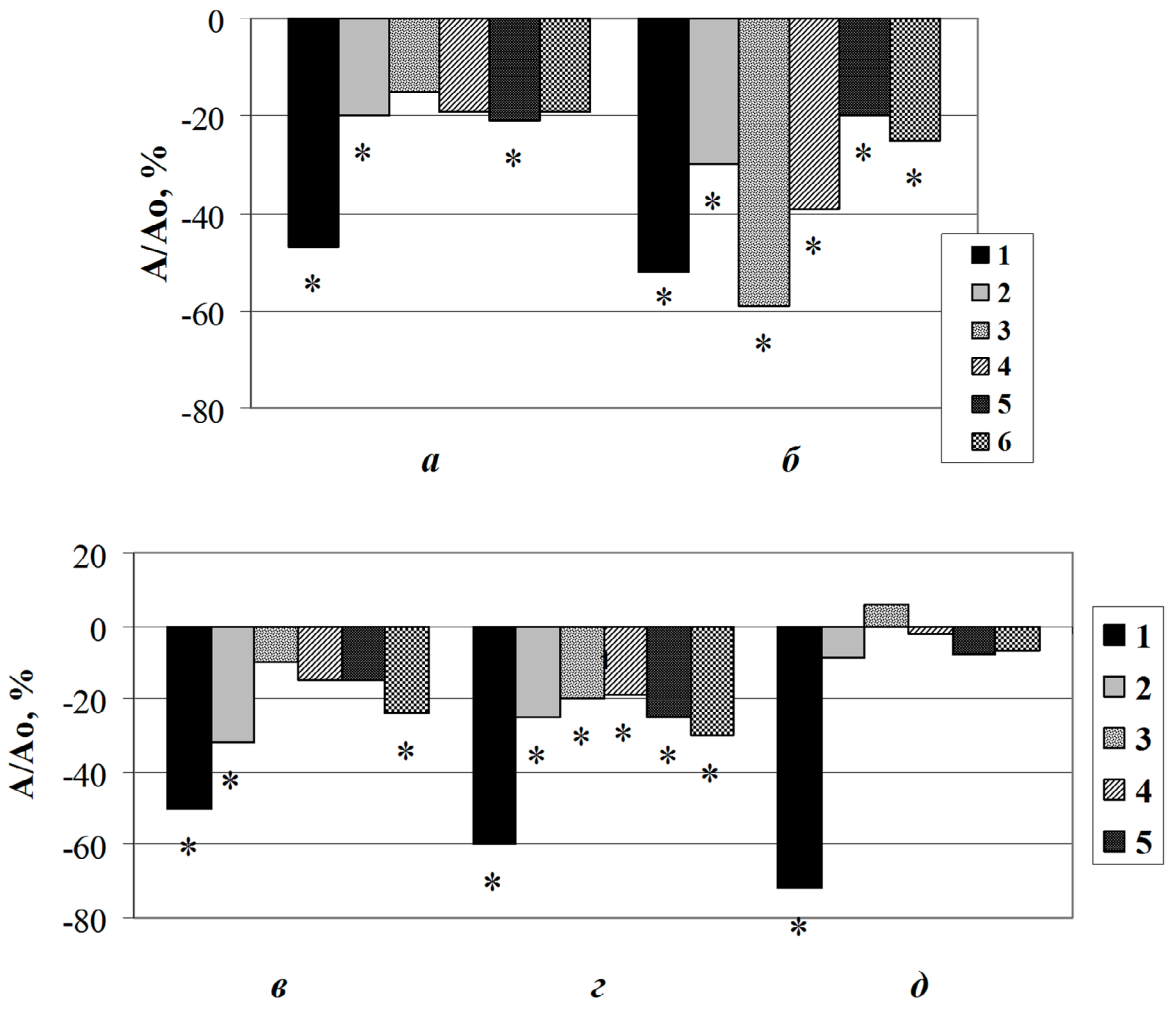


Рисунок 3 — Изменения (% к контролю) расщепления сывороточного альбумина (*а*), казеина (*б*), фибриногена человека (*в*), фибриногена быка (*г*) и желатина (*д*) в тонком слое агарового геля протеиназами пула супернатантов культуральных жидкостей патогенных штаммов *P. aeruginosa* (штаммы: 1 — 92/1$_{гоб1}$; 2 — 74/5$_{гоб4}$; 3 — 23/2$_{гоб2}$; 4 — 3/3; 5 — 11/2$_{рз}$; 6 — 12/2$_{рз}$; 7 — 74/5$_{гоб3}$; 8 — 13$_{рз}$) в присутствии группоспецифических ингибиторов (1 — EDTA, 2 — PCMB, 3 — *o*-phe, 4 — *ho*-qui, 5 — PMSF, 6 — DPF) в концентрации 10^{-3} М. Концентрация белков-субстратов — 10 г/л, растворитель — 0,05М трис-HCl буфер pH 7,5; *n* = 4; * — p≤0,05

Учитывая, что в стационарном режиме культивирования уже после 6 ч рост культур замедлялся, к 24 ч протеолитическая активность супернатантов культуральной жидкости может быть обусловлена не только внеклеточными протеиназами, но и энзимами переживающих и разрушающихся клеток.

Исследования динамики протеолитической активности в супернатантах культуральной жидкости проведены нами на трех белках-субстратах: казеине и желатине — субстратах, дающих основания усматривать наличие разных компонентов в наборе внеклеточных «нейтральных» протеиназ патогенных псевдомонад, и фибриногене — практически универсальном субстрате в нашем конкретном случае. Эксперименты проведены с использованием штаммов ATCC 15442 (эталонный), 23/2$_{гоб1}$, 23/2$_{гоб2}$ и 74/5$_{гоб3}$, различающихся особенностями метаболизма: шт. 23/2$_{гоб1}$ — наиболее активный продуцент пиоцианина, шт. 23/2$_{гоб2}$ отличался быстрым ростом на жидких питательных средах и хорошим урожаем биомассы, а шт. 74/5$_{гоб3}$ — высоким уровнем терморезистентного гемолиза [15].

Протеолитическая активность по всем трем субстратам обнаружена уже через 2 ч после начала культивирования микроорганизма (рисунок 4) Максимальная желатинолитическая активность всех штаммов к 18 ч была более низкой в сравнении с казеино- и фибриногенолитической. Обнаружены и другие особенности.

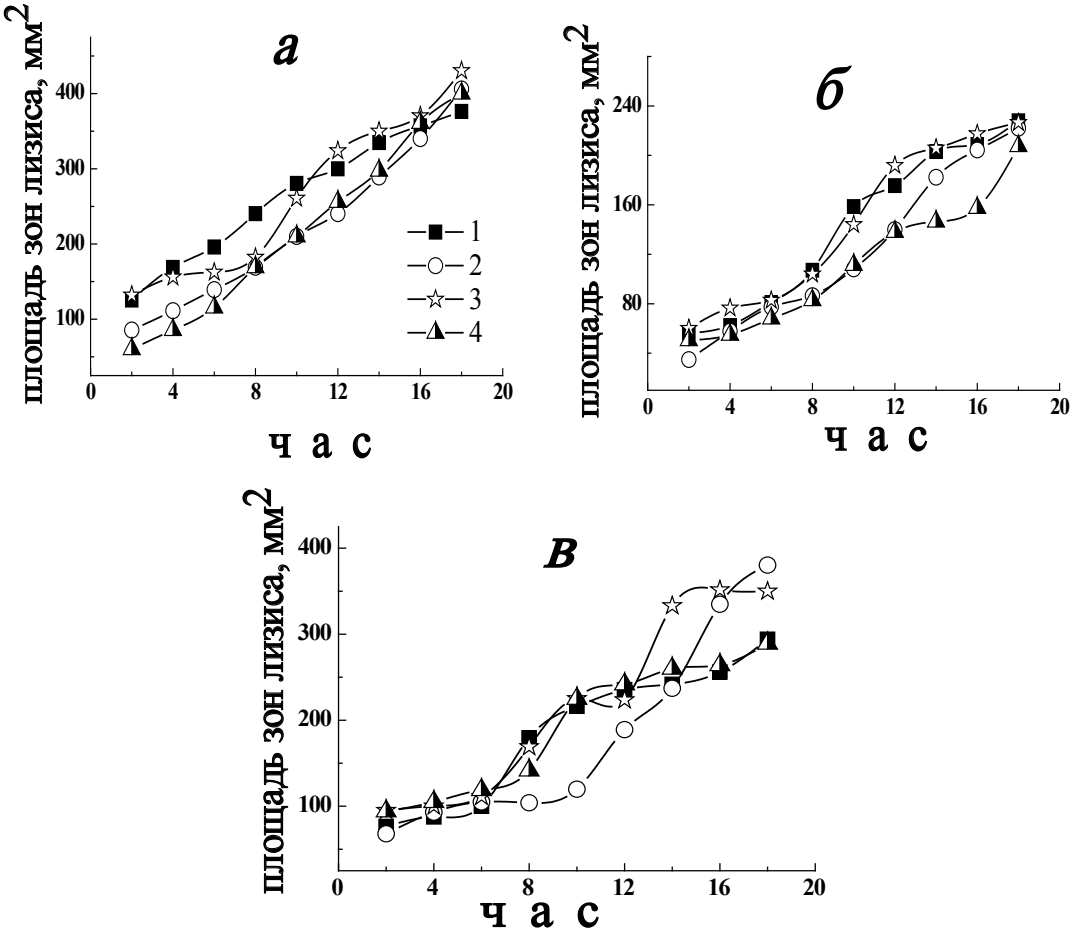


Рисунок 4 — Динамика казеинолитической (*а*), желатинолитической (*б*), фибриногенолитической (*в*) активности супернатантов культуральной жидкости штаммов *P. aeruginosa* (1 — АТСС 15442, 2 — $23/2_{гоб1}$, 3 — $23/2_{гоб2}$, 4 — $74/5_{гоб3}$) при росте на жидкой питательной среде; концентрация белков-субстратов — 5 г/л, растворитель — 0,01М трис-HCl буфер pH 7,5; *n* = 4

Штаммовые различия практически не проявлялись в динамике казеинолитической активности, характеризующейся почти прямолинейной зависимостью, за исключением шт. $23/2_{гоб2}$. К 18 ч эта активность была одинакова для всех штаммов. Уровень желатинолитической активности к этому сроку также был одинаков у всех штаммов. Однако графики зависимости носили более сложный характер с промежуточными плато или напоминая S-образную зависимость. По характеру изменения фибриногенолитической активности штаммы можно разделить на две группы: у шт. АТСС 15442 и $74/5_{гоб3}$ наблюдалась типичная S-образная зависимость с быстрым нарастанием уровня активности в период 6–10 ч и максимумом уже к 16 ч. У двух остальных штаммов усиленный рост активности отмечен, начиная с 10 ч, максимальный уровень ее превышал таковой предыдущей группы на 21–31% ($p<0,05$).

Более четко особенности динамики протеолитической активности выявлялись при анализе удельной скорости «накопления» протеолитической активности (рисунок 5).

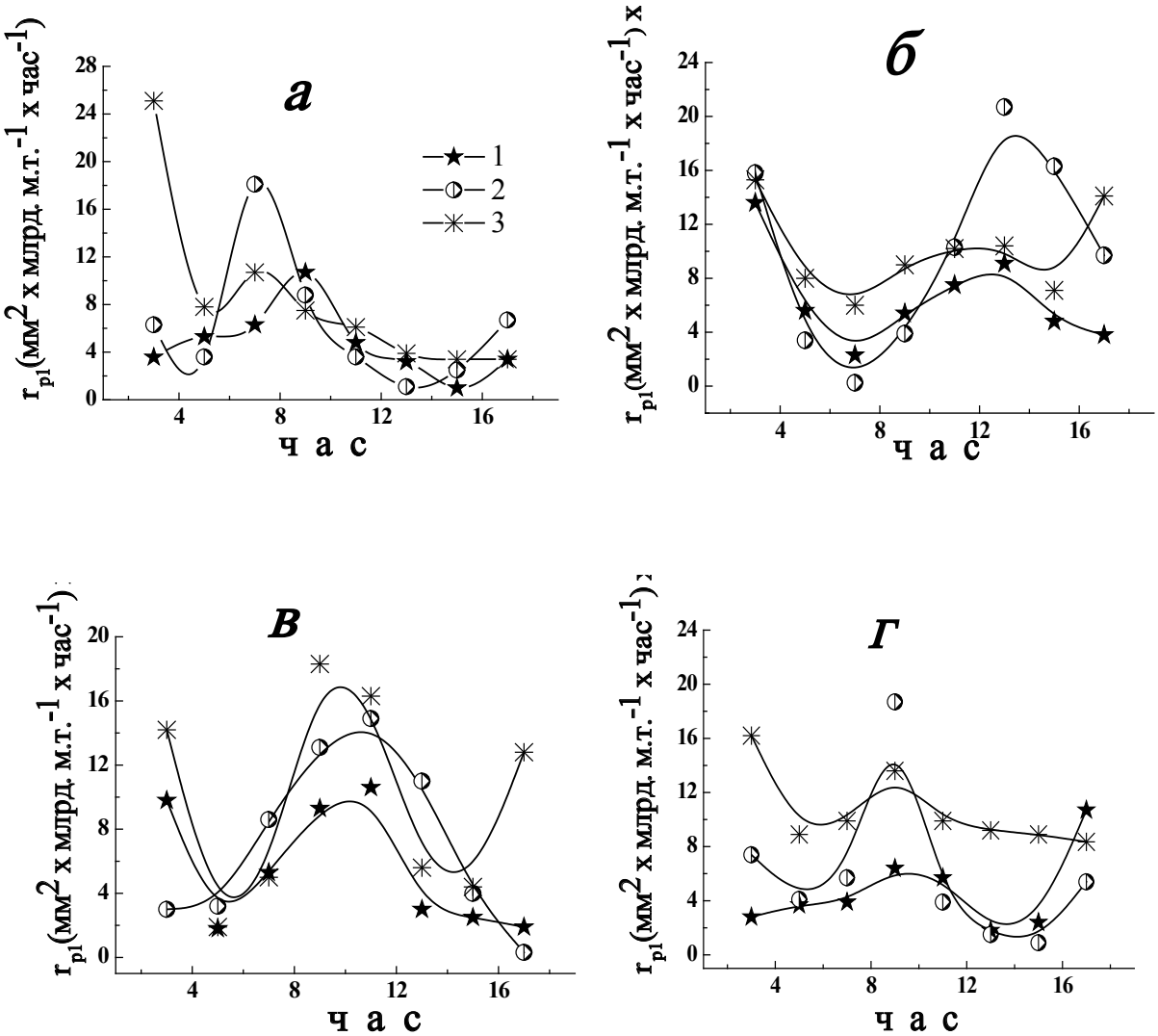


Рисунок 5 — Удельная скорость нарастания протеолитической активности (1 — желатинолитической, 2 — фибриногенолитической, 3 — казеинолитической) супернатантов культуральной жидкости в процессе роста культур штаммов *P. aeruginosa* (штаммы: *а* — АТСС 15442; *б* — 23/2$_{гоб1}$; *в* — 23/2$_{гоб2}$; *г* — 74/5$_{гоб3}$)

Причем наблюдались различия и между штаммами и между отдельными компонентами протеиназного набора. Так, у всех четырех штаммов максимальные значения удельной скорости накопления в целом характерны для желатинолитической активности. У шт. АТСС 15442 и 23/2$_{гоб2}$ этот максимум приходился на 8–9 ч, тогда как у шт. 23/2$_{гоб1}$ — через 3 ч после начала культивирования, а у шт. 74/5$_{гоб3}$ — в фазу замедления роста. Наиболее высоки максимальные значения удельной скорости накопления казеинолитической активности, за исключением шт. 23/2$_{гоб1}$, где таковые не отличались или уступали значениям удельной скорости накопления фибриногенолитической активности. Результаты, представленные на рисунке 5, также демонстрируют существенные штаммовые различия изменений удельной скорости накопления протеолитической активности по трем белкам-субстратам, свидетельствующие о функционально-метаболической специфике этих штаммов.

Заключение. Изложенные результаты свидетельствуют о способности патогенных штаммов *P. aeruginosa* образовывать протеолитические энзимы широкой субстратной специфичности, разрушающие ряд белков, включая фибриноген, тромбин и гемоглобин. Даже не анализируя биологическую активность продуктов протеолиза, можно заключить, что такие протеиназы при инфицировании организма хозяина будут играть заметную роль в патогенезе инфекции. Примечательно, что в

реализации активности этих протеиназ существенная роль принадлежит ионам металлов. Однако изложенные данные не раскрывают всех аспектов регуляции протеолитической активности патогенных штаммов псевдомонад. Более того, рассмотрена лишь протеолитическая активность, проявляющаяся в нейтральной зоне pH, тогда как микроорганизм может обладать и протеиназами иного типа.

Авторы выражают благодарность канд. мед. наук Г.А. Скороходу, канд. биол. наук А.Э. Пыж и И.В. Шныпп за помощь в проведении настоящей работы.

Литература

1. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome / C.I. Kang [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 37. — P. 745–751.

2. Rossolini, G.M. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* / G.M. Rossolini, E. Mantengoli // Clin. Microbiol. Infect. — 2005. —Vol. 11, suppl. 4. — P. 17–31.

3. BdlA, DipA and induced dispersion contribute to acute virulence and chronic persistence of *Pseudomonas aeruginosa* / Y. Li [et al.] // PLOS Pathogens. — 2014. — Vol. 10, № 6. — e1004168.

4. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium / N. Mesaros [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. — 2007. — Vol. 13. — P. 560–578.

5. Mugabe, C. Liposome-mediated gentamicin delivery: development and activity against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients / C. Mugabe, A.O. Azghani, A. Omri // J. Antimicrob. Chemother. — 2005. — Vol. 55, № 2. — P. 269–271.

6. Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalised patients: clinical features, risk-factors and outcomes / C.Y. Wang [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. — 2006. — Vol. 12. — P. 63–68.

7. Никандров, В.Н. Действие неорганических соединений и оксидоредуктантов *in vitro* на гемолитическую активность патогенного штамма *Pseudomonas aeruginosa* / В.Н. Никандров, А.Э. Пыж. // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2011. — № 3. — С. 25–28.

8. Синегнойная инфекция / под ред. А.Ф. Мороз. — М., 1988. — 256 с.

9. Karatuna, O. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates / O. Karatuna, F. Yagci // Clin. Microbiol. Infect. — 2010. — Vol. 16. — P. 1770–1775.

10. Никандров, В.Н. Проявление гемолитической и протеолитической активности госпитальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова, А.Э. Пыж // Актуальные вопросы инфекционной патологии: материалы междунар. Евро-Азиат. конгр. по инфекц. болезням. — Витебск, 2008. — Т. 1. — С. 25–26. .

11. Пыж, А.Э. Вклад сине-зеленых пигментов *Pseudomonas aeruginosa* в гемолитическую активность культуральной жидкости / А.Э. Пыж, В.Н. Никандров // Журн. микробиол. — 2011. — № 1. — С. 19–25.

12. Никандров, В.Н. Методы исследования протеолиза / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // Современные проблемы биохимии. Методы исследований. — Минск: Выш. шк., 2013. — Гл. 5. — С. 132–157.

13. Методические рекомендации по анализу и оптимизации процессов культивирования микроорганизмов в лабораторных и производственных условиях / И.А. Баснакьян [и др.]; утв. М-вом здравоохр. СССР 01.09.1978. — М., 1978. — 27 с.

14. Пыжова, Н.С. Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена / Н.С. Пыжова, В.Н. Никандров // Биоорган. химия. — 2008. — Т. 34, № 3. — С. 382–391.

15. Пыж, А.Э. Влияние меди на рост и образование гемолизинов госпитальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* / А.Э. Пыж, В.Н. Никандров // Новости мед.-биол. наук. — 2009. — № 3. — С. 70–75.

FEATURES OF THE "NEUTRAL" PROTEINASES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PATHOGENIC STRAINS

Pyzhova N.S., Nikandrov V.N.

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

With use of various protein substrates it was demonstrated that *Pseudomonas aeruginosa* pathogenic strains possess the proteinases which showing the activity at neutral pH range. Judging by results of the inhibitory analysis and dynamics of the proteolytic activity changes (caseino-, gelatino- and fibrinogenolytic), pathogenic pseudomonads synthesize some "neutral" proteinases. An important role in functional activity of these enzymes is played by metals. At the same time serine and cysteine proteinases aren't the main components of an extracellular proteinase arsenal of pseudomonads.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, pathogenic strains, "neutral" proteinases, inhibitory analysis, protein substrates.

Поступила 10.07.2014

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА С ПОМОЩЬЮ ТЕСТА АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ (КЛИНИЧЕСКИЙ ПРИМЕР)

Романова И.В., Гончаров А.Е.
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Диагностика гиперчувствительности 1-го типа является актуальной задачей современной медицины в силу значительного увеличения удельного веса аллергических заболеваний в мировой популяции за последнее столетие. Существующие методы *in vivo*, кожные и провокационные пробы не всегда обладают достаточной надежностью результатов, при этом провокационные пробы могут привести к опасному осложнению в виде анафилактического шока. В последние десятилетия совершенствуются *in vitro* методы, преимуществом которых является расширения показаний для пациентов, характеризующихся безопасностью и возможностью стандартизации. В данной статье приведен клинический пример возможности использования нового перспективного *in vitro* метода диагностики аллергического ринита — теста активации базофилов.

Ключевые слова: тест активации базофилов, аллергический ринит, CD63.

Введение. Частота атопических заболеваний во всем мире неуклонно растет, что требует совершенствования методов диагностики [1]. Золотым стандартом диагностики гиперчувствительности к аэроаллергенам считается выполнение провокационных проб с причинным аллергеном, которые, однако, используются сравнительно редко в виду риска развития тяжелого системного осложнения — анафилактического шока [2]. В качестве стандартных дополнительных методов используют определение концентрации специфических IgE и проведение кожных проб при отсутствии противопоказаний [3].

В последнее время для диагностики аллергии представляют интерес клеточные *in vitro* тесты, в частности, тест активации базофилов (ТАБ). ТАБ основывается на выявлении экспрессии маркеров дегрануляциии/или активации на поверхности базофилов в ответ на воздействие причинного аллергена [4]. При наличии сенсибилизации у пациента к тому или иному аллергену наблюдается дегрануляция базофилов. Идентификацию базофилов, а также оценку экспрессии маркеров активации и дегрануляции, самыми значимыми из которых являются молекулы LAMP-семейства (CD63, CD107a) [5], а также специфический маркер базофилов — молекула CD203c, осуществляют при помощи проточного цитометра. Данный метод диагностики привлекает своей (относительной) простотой, безопасностью для пациента, возможностью стандартизации метода.

Цель работы — описание возможности применения ТАБ для диагностики гиперчувствительности к аэроаллергенам.

Материалы и методы. *Кровь* для исследования забирали натощак из кубитальной вены. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. Постановку исследуемых проб осуществляли в течение 2–4 ч от момента забора крови. *Аллергены.* В исследовании использовали диагностические аллергены производства «Sevapharma» (Чехия). Для исследования готовили разведения аллергенов в буферном растворе 1:200: береза, рожь, райграс, ольха, ежа, клещ домашней пыли, тимофеевка. *Постановка ТАБ.* В качестве отрицательного контроля выступала кровь в фосфатно-солевом буферном растворе без добавления аллергенов. Положительным контролем служил иономицин (1мкг/мл) и ФМА (25 нг/мл). Одновременно проводили инкубацию исследуемых проб с аллергенами в разведении. Для усиления чувствительности метода осуществляли преинкубацию всех проб с интерлейкином (ИЛ)-3 (10 нг/мкл) в течение 15 мин при 37°С. Затем добавляли моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами (CD63 (FITC), CD123 (PE), CD203c (APC)) и инкубировали пробы при комнатной температуре в темноте на протяжении 15 мин. Лизис эритроцитов осуществляли с помощью лизирующего раствора, содержащего хлорида аммония в качестве основного компонента. Клетки отмывали в фосфатно-солевом буферном растворе с добавлением EDTA и 0,1%-м азида натрия для остановки процесса дегрануляции базофилов и учитывали пробы на проточном цитометре. *Учет на проточном цитометре и результаты.* Учет данных проводили на проточном цитометре FACSCalibur (BectonDickinson, США) с использованием программы «CellQuest» (BD, США). Данные анализировали при помощи программы «Weasel» версия 3.0.2 (WEHI, Австралия).

Результаты и их обсуждение. Для демонстрации результатов приведен следующий клинический пример.

Краткий анамнез заболевания. Пациент Н., 33 года, с подросткового возраста ежегодно страдает сезонным аллергическим ринитом вначале весны и до конца июля. Перед проведением ТАБ пациент обследован аллергологом, оториноларингологом. Жалоб на типичные клинические проявления поллиноза не предъявлял. Из лекарственных средств для купирования симптомов аллергии принимает кестин (эбастин) — препарат второго поколения блокаторов Н-1 гистаминовых рецепторов. Выполнены кожные пробы с диагностическими аллергенами. Результаты кожных проб: домашняя пыль «–» (отрицат.), шерсть домашних животных «–» (отрицат.), клещ домашней пыли «–» (отрицат.), береза «–» (отрицат.), ольха «–» (отрицат.), лещина «–» (отрицат.), вяз «–» (отрицат.), тополь «–» (отрицат.), клен «–» (отрицат.), дуб «–» (отрицат.), ежа «+++» (резкоположит.), овсянница луговая «++» (положит. ср. степени.), рожь многолетняя «+++» (резкоположит.), тимофеевка «++++» (очень резкоположит.), мятлик луговой «–» (отрицат.), полынь обыкновенная «++» (положит.), райграс «++++» (очень резкоположит.).

Тест активации базофилов. Поскольку базофилы обладают небольшими размерами и невысокой гранулярностью, на цитограмме прямого и бокового светорассеяния базофилы расположены среди мононуклеаров периферической крови, преимущественно в регионе лимфоцитов (рисунок Г) [6]. Выделение базофилов среди клеток периферической крови проводили путем логического гейтирования с помощью молекул CD203c и CD123. Базофилы экспрессируют молекулу CD123, альфа-цепь рецептора к ИЛ-3, активация которой приводит к усилению процесса дегрануляции базофилов, а также повышению реактивности базофилов в ответ на действие аллергенов и неспецифических стимулов [7]. В периферической крови молекула CD203c экспрессируется исключительно на базофилах, при этом интенсивность экспрессии этой молекулы усиливается в процессе активации клеток [8]. Однако поскольку увеличение интенсивности экспрессии CD203c под действием активирующего сигнала наблюдается практически для всей популяции базофилов, корректное разграничение неактивированных $CD203c^{lo}$ и активированных $CD203c^{hi}$клеток на проточном цитометре затруднено [9]. Поэтому данный маркер использовали исключительно для идентификации базофилов.

Отрицательный контроль свидетельствует о спонтанной активации клеток и позволяет разграничить уровень экспрессии молекул покоящихся клеток по сравнению с состоянием активации клетки. Положительный контроль используют для оценки способности базофилов дегранулировать в ответ на неспецифические стимулы (в настоящем исследовании иономицин и ФМА), что необходимо для исключения ложноотрицательных реакций.

Функциональный ответ базофилов на положительный контроль и аллергены определяли по усилению экспрессии маркера дегрануляции CD63. Молекула CD63 заякорена в мембране гистаминсодержащих гранул покоящихся базофилов и в процессе дегрануляции интегрируется с поверхностной мембраной [10]. Преимущество маркера CD63 является в том, что он напрямую отражает дегрануляцию базофилов по принципу «все или ничего» [11].

При спонтанной активации базофилов (отрицательный контроль) процент экспрессии маркера дегрануляции CD63 составил 19% (рисунок Б), при активации базофилов (положительный контроль) — 81,2% (рисунок В). Отсутствие усиления интенсивности экспрессии CD203c в положительном контроле можно объяснить неспецифическим действием иономицина и ФМА.

Аллерген-индуцированную активацию клеток оценивали, как процент дегранулированных базофилов по отношению к проценту экспрессии молекулы $CD63^{+}$ клеток в отрицательном контроле, выраженную в виде стимуляторного индекса (СИ). При достижении СИ выше 2,0 (двукратное увеличение экспрессии молекулы CD63) результат рассматривался диагностически значимым [12]. По данным выполненного теста активации базофилов можно предполагать наличие у пациента сенсибилизации к следующим аллергенам: рожь (CD63 — 68,3%, СИ = 3,6), райграс (CD63 — 71,7% СИ = 3,7), ежа (CD63 — 61,8% СИ = 3,3), тимофеевка (CD63 — 68,1% СИ = 3,6). Полученные результаты ТАБ соответствуют данным анамнеза и положительным результатам кожных проб, что может указывать на высокую специфичность и чувствительность метода.

Заключение. Тест активации базофилов в настоящее время весьма зарекомендовал себя в качестве дополнительного метода диагностики пищевой и респираторной аллергии, характеризуясь высокой чувствительностью и специфичностью. Данный метод представляется диагностически значимым для пациентов с атопией в том случае, когда выполнение провокационных исследований несет риск системных реакций, а для проведения кожных проб имеются противопоказания [13].

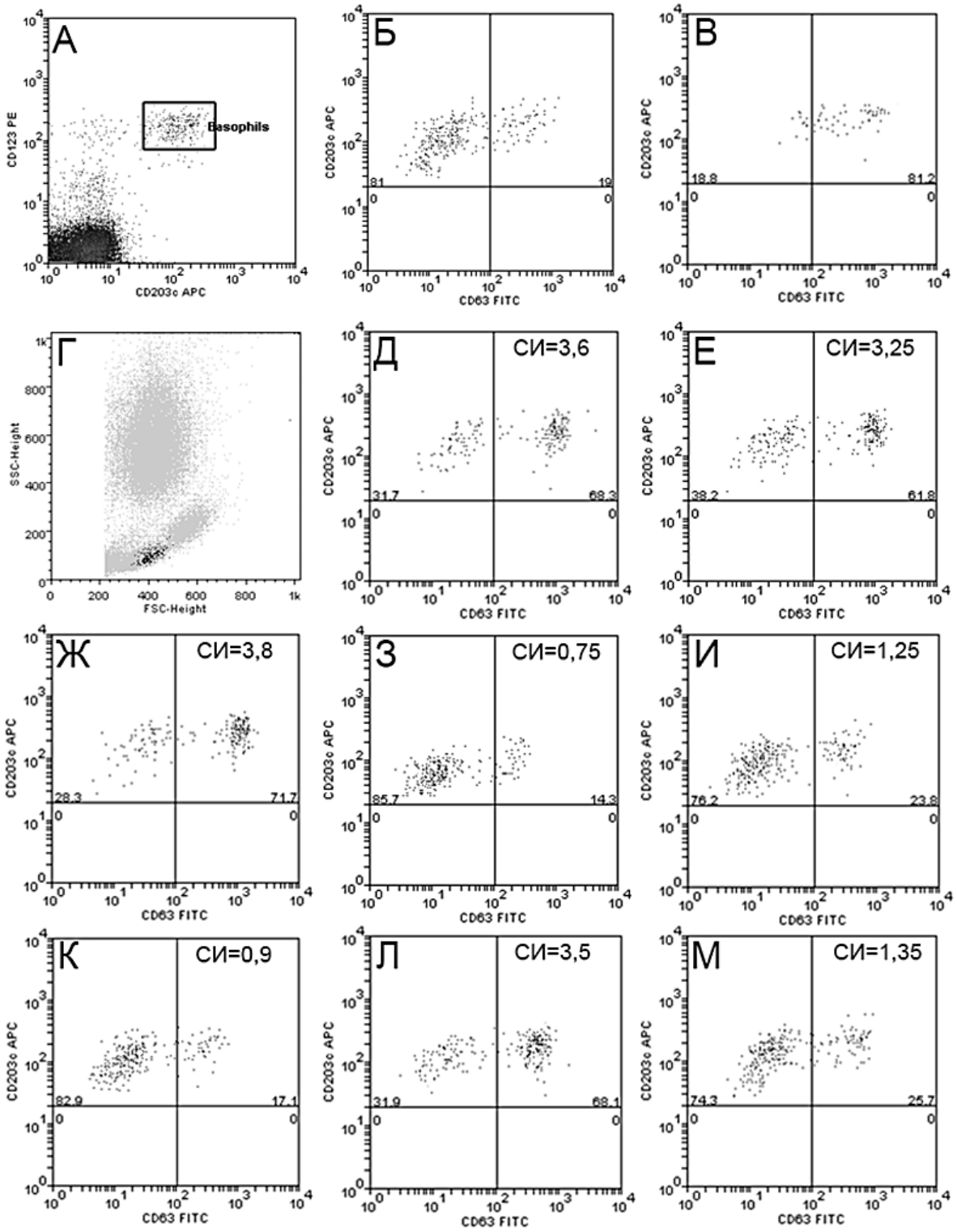


Рисунок — Анализ данных теста активации базофилов: А — выделение гейта базофилов по маркерам CD123^{+}CD203c^{+}; Б — оценка спонтанной активации базофилов (отрицательный контроль); В — активация базофилов под действием иономифина и ФГА (положительный контроль); Г — распределение базофилов среди клеток периферической крови по параметрам прямого и бокового светорассеяния (базофилы отображены черным цветом); Д–М — активация базофилов под действием различных аллергенов: Д — рожь, Е — ежа, Ж — райграс, З — ольха, И — клещ домашней пыли, К — перо птицы, Л — тимофеевка, М — береза

Литература

1. Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA / N.G. Papadopoulos [et al.] // Clin. Transl. Allergy. — 2012. — Vol. 2, № 1. —P. 1–21.
2. Allergen-specific nasal provocation testing: review by the rhinoconjunctivitis committee of the Spanish Society of Allergy and Clinical Immunology / M.T. Dordal [et al.] // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. — 2011. — Vol. 21, № 1. — P. 1–12.
3. Oppenheimer, J. Skin testing / J. Oppenheimer, H.S. Nelson // Ann. Allergy Asthma Immunol. — 2006. — Vol. 96. — P. 6–12.
4. Boumiza, R. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives / R. Boumiza, A.L. Debard, G. Monneret // Clin. Mol. Allergy. — 2005. — Vol. 30, № 3. — P. 1–9.
5. Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation/ F. Hennersdorf [et al.] // Cell Res. — 2005. — Vol. 15, № 5. — P. 325–335.
6. Flow Cytometric Evaluation of Human Basophils / P. Gane [et al.] // Cytometry. — 1993. — Vol. 14, № 3. — P. 344–348.
7. Kurimoto, Y. The effect of interleukin 3 upon IgE-dependent and IgE-independent basophil degranulation and leukotriene generation / Y. Kurimoto, A.L. De Weck, C.A. Dahinden // Eur. J. Immunol. — 1991. — Vol. 21, № 2. — P. 361–368.
8. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy / S. Mikkelsen [et al.] // Clin. Mol. Allergy. — 2010. — Vol. 8. — P. 1–9.
9. Flow cytometry for basophil activation markers: The measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy / A. Ocmant [et al.] // J. Immunol. Meth. — 2007. — Vol. 320, № 1–2. — P. 40–48.
10. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells / M.J. Metzelaar [et al.] // J. Biol. Chem. — 1991. — Vol. 266, № 5. — P. 3239–3245.
11. The surface membrane antigen phenotype of human blood basophils / W. Füreder [et al.] // Allergy. — 1994. — Vol. 49, № 10. — P. 861–865.
12. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals / A.W. Hauswirth [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. — 2002. — Vol. 110, № 1. — P. 102–109.
13. Potapińska, O. The usefulness of CD203c expression measurement on basophils after activation with grass pollen and Dermatophagoidespteronyssinus antigens. Preliminary study / O. Potapińska, E. Górska, A. Zawadzka-Krajewska // Pneumonol. Alergol. Pol. — 2009. — Vol. 77, № 2. — P. 138–144.

LABORATORY DIAGNOSIS OF ALLERGIC RHINITIS USING BASOPHIL ACTIVATION TEST (Clinical Example)

Ramanava I.U., Hancharou A.Y.
Republican Research & Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

Diagnosis of hypersensitivity type 1 is an actual problem of modern medicine because of the significant increase in the proportion of allergic diseases in the world population over the last century. Existing methods for in vivo, skin and provocative tests do not always have sufficient reliability of results, while provocative tests may lead to dangerous complications such as anaphylactic shock. In recent decades, in vitro methods have been improved, the advantage of which is the expansion of indications for patients characterized by safety and the possibility of standardization. This article provides a clinical example of the possibility of using a new promising method of diagnosis of allergic rhinitis *in vitro* — basophil activation test.

Keywords: basophil activation method, allergic rhinitis, CD63.

Поступила 10.047.2014

ВИРУСЫ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА И ДРУГИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ И ВИРУСНЫЕ ПАТОГЕНЫ ПРИ ФОНОВЫХ И ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА

Рубаник Л.В., Полещук Н.Н., Дейкун Д.А., Малиновская Ю.В.
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Проведено комплексное лабораторное обследование женщин с фоновыми (цервицит, эрозия шейки матки) и предраковыми (дисплазия) заболеваниями урогенитального тракта. Показано, что наряду с высокой частотой обнаружения вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) одновременно детектируются такие патогены, как *C. trachomatis*, вирусы семейства *Herpesviridae*, *T. vaginalis*. Полученные данные свидетельствуют о важности дальнейшего изучения патогенеза микст-инфекций урогенитального тракта и определения наряду с ВПЧ ВКР других кофакторов ведущих к клеточной онкотрансформации.

Ключевые слова: фоновые и предраковые заболевания, урогенитальный тракт, вирус папилломы человека, хламидии, герпесвирусы.

Введение. Важная роль в возникновении фоновых и предраковых состояний принадлежит инфекционным агентам, среди которых лидирующее место занимает вирус папилломы человека (ВПЧ). Однако многие исследователи считают, что ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) являются необходимым, но не единственным пусковым фактором развития рака шейки матки [1–5].

По мнению большинства авторов, при различных заболеваниях урогенитального тракта моноинфекции регистрируются только в 20–30% случаев. Гораздо чаще (70–80% случаев) отмечаются микст-инфекции. Общеизвестно также, что в условиях совместной репродукции в одном биотопе вирусы и бактерии оказывают взаимное влияние друг на друга (ингибирующее или стимулирующее). Наряду с доказанной ролью ВПЧ в генезе неопластических процессов значимость других инфекционных агентов в качестве кофакторов остается неясной. N. Popescu и др. (1981) предположили, что интеграция ВПЧ в геном млекопитающих может вызывать генетическую нестабильность и неконтролируемое деление клеток, делая их более уязвимыми для других вирусов, способных содействовать неопластической трансформации клеток [6]. Еще до обнаружения ВПЧ обсуждалась роль герпетической инфекции, поскольку в ряде исследований было показано, что до 80% женщин, больных раком шейки матки, имели признаки предшествующей инфекции ВПГ-2. Показано, что у женщин с герпесвирусной инфекцией половых органов наблюдалось повышение риска последующего развития рака шейки матки приблизительно в 2–4 раза [7]. Согласно данным V.T. Chow (1993), инфекция ВПГ-2 предшествует ВПЧ, однако более многочисленные исследования позволяют предположить, что ВПГ-2 оказывает действие на поздних стадиях канцерогенеза [8]. В экспериментах *in vitro* было показано, что ВПГ-1 типа не только стимулировал репликацию ВПЧ-18 типа, но и способствовал интеграции его генома в геном клетки-хозяина, что является важным условием опухолевой трансформации [8, 9]. В развитии рака шейки матки и взаимодействии с ВПЧ играют роль и другие вирусы герпеса. Показано, что цитомегаловирус человека также способен усиливать трансформацию клеток, инфицированных ВПЧ *in vitro*, и может участвовать в развитии цервикальных неоплазий [9]. Предполагается, что при ВИЧ-инфекции может развиться дисплазия, которая прогрессирует быстрее, чем обычно. Считают, что ВИЧ-индуцированная иммуносупрессия может ускорять прогрессию предшествующих поражений в более тяжелые состояния либо ВИЧ и ВПЧ могут взаимодействовать напрямую [10].

Помимо вирусов среди микроорганизмов, наиболее часто встречающихся у женщин с цервикальной интраэпителиальной неоплазией, представляют наибольший интерес такие патогены, как *Gardnerella vaginalis, Candida species, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealiticum, Chlamydia trachomatis* и др. Наличие клеточных атипий у пациентов с перечисленными инфекциями достигает 28%. Наблюдения ряда исследователей показали, что интраэпителиальные поражения шейки матки сопровождаются существенными качественными и количественными изменения вагинальной микрофлоры. Снижается частота выделения доминирующих представителей микробиоценоза влагалища и шейки матки здоровых женщин — лакто- и бифидобактерий. Наряду с этим отмечается повышение частоты выделения и избыточный рост представителей условно-патогенной микрофлоры. Энтеробактерии высевались в 2,5 раза, а энтерококки и стафилококки — в 2 раза чаще, чем у здоровых женщин. Возрастала частота обнаружения грамположительных анаэробных кокков (пептострептококов). Также отмечалась значительная контаминация влагалища и шейки матки дрожжеподобными грибками рода *Candida*. Более высокая частота встречаемости цервикальной интраэпителиальной неоплазии при сочетанной инфекции может свидетельствовать об утяжелении течения ВПЧ-инфекции и ухудшении прогноза заболевания [11].

В исследованиях последних лет было показано, что среди лиц с цервикальными дисплазиями, ассоциированными с папилломавирусами высокого канцерогенного риска, диагностируется и *C. trachomatis*. Наличие вирусассоциированных клеточных атипий у лиц с урогенитальной хламидийной инфекцией достигает не менее 30–40%. Многочисленные эпидемиологические исследования показали связь между *C. trachomatis,* ВПЧ и цервикальной сквамозной клеточной карциномой [12–18]. Данный возбудитель рассматривается как кофактор в развитии цервикального рака в связи со способностью ингибировать клеточный апоптоз, частой хронизацией инфекции, поражением одних и тех же клеток-мишеней, облигатным внутриклеточным циклом развития и способностью вы-

зывать трансформацию клеток. Считают, что известные 19 генотипов *C. trachomatis* отличаются по вирулентности, патогенности, репродуктивной активности. Показано, что такие генотипы возбудителя, как G, I и D, наиболее часто детектируются при раке шейки матки [19].

Цель работы — изучение спектра выявляемых патогенов при фоновых и предраковых заболеваниях урогенитального тракта

Материалы и методы. Проведено клинико-лабораторное обследование 81 женщины с фоновыми и предраковыми заболеваниями урогенитального тракта. Все пациентки были разделены в соответствии с клиническим диагнозом на три группы. В первую группу вошли 15 женщин (18,5%) с дисплазиями слабой степени. Вторую группу составили 19 пациенток (23,5%) с эрозией шейки матки (ЭШМ), в третью группу были включены 47 женщин (58%) с цервицитом. В каждой группе было проведено лабораторное исследование соскобного материала из урогенитального тракта (цервикального канала, влагалища и уретры) с использованием культурального метода, метода флуоресцирующих антител (МФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Дополнительно у всех обследуемых пациенток определено наличие противохламидийных антител в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Взятие соскобного материала осуществляли универсальным зондом или ложкой Фолькмана перед началом (за 2–4 дня) или сразу после менструации. Забранный материал распределяли на предметном стекле, высушивали на воздухе и фиксировали метанолом.

Для выделения возбудителей в культуре клеток McCoy соскобный материал, взятый от пациенток, помещали в транспортную среду, обеспечивающую выживание возбудителей при транспортировке и хранении (–20С, 1–2 сут). Доставка материала осуществлялась в течение 2 ч.

Цитологический метод. Окраску мазков-соскобов по Романовскому–Гимза проводили по общепринятой методике. Учет результатов осуществляли на световом микроскопе «Nikon E50i» (Nikon, Япония) при увеличениях x400, x1000. Одновременно с поиском специфических изменений клеток, вызываемых папиломавирусом, вирусами герпеса, хламидиями, учитывали количество лейкоцитов, как показатель воспаления, а также наличие сопутствующей бактериальной микрофлоры, дрожжеподобных грибов, трихомонад.

Метод культуры клеток. Соскобным материалом, полученным из урогенитального тракта пациентки, инфицировали 2-суточную культуру клеток McCoy, выращенную на покровных стеклышках. Всю процедуру выделения хламидий в культуре клеток McCoy проводили согласно методическим рекомендациям «Метод выделения хламидий в культуре клеток McCoy. Определение чувствительности хламидий к противомикробным препаратам». Выделение хламидий в культуре клеток включало следующие этапы: удаление среды роста из пенфлаконов с культурой клеток McCoy, инокуляция соскобных образцов, центрифугирование пенфлаконов при 3000 об./мин в течение 1 ч, инкубация в термостате при 37°.

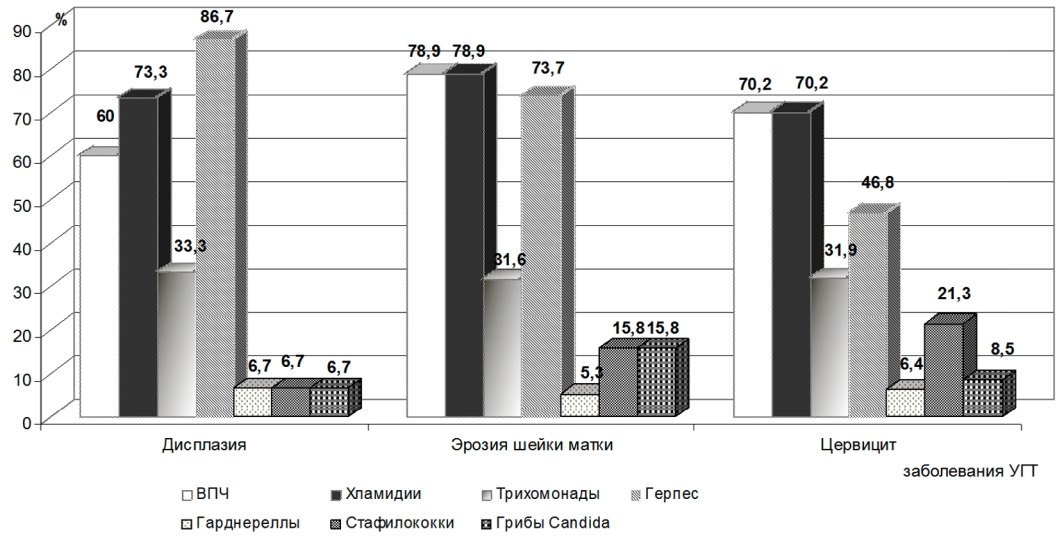


Рисунок 1 — Частота выявления различных возбудителей УГИ в обследуемых группах

Как видно из представленного графика, частота обнаружения возбудителей, в т. ч. *C. trachomatis* и ВПЧ ВКР при ЭШМ, цервиците и дисплазии, не имеет значимых различий, за исключением наиболее высокого (86,7%) обнаружения вирусов группы герпеса при дисплазии. При этом только у 1 из 15 (6,7%) женщин II группы (ЭШМ) и у 4 из 33 (12,1%) женщин III группы (цервицит) детектирован вирус папилломы в качестве единственного возбудителя. Ни у одной женщины I группы (дисплазия) не регистрировалась папилломавирусная моноинфекция, а во всех случаях ВПЧ ВКР детектировался в виде различных ассоциаций с другими патогенами. Данные по выявляемости моно- и микст-инфекций урогенитального тракта представлены на рисунке 2.

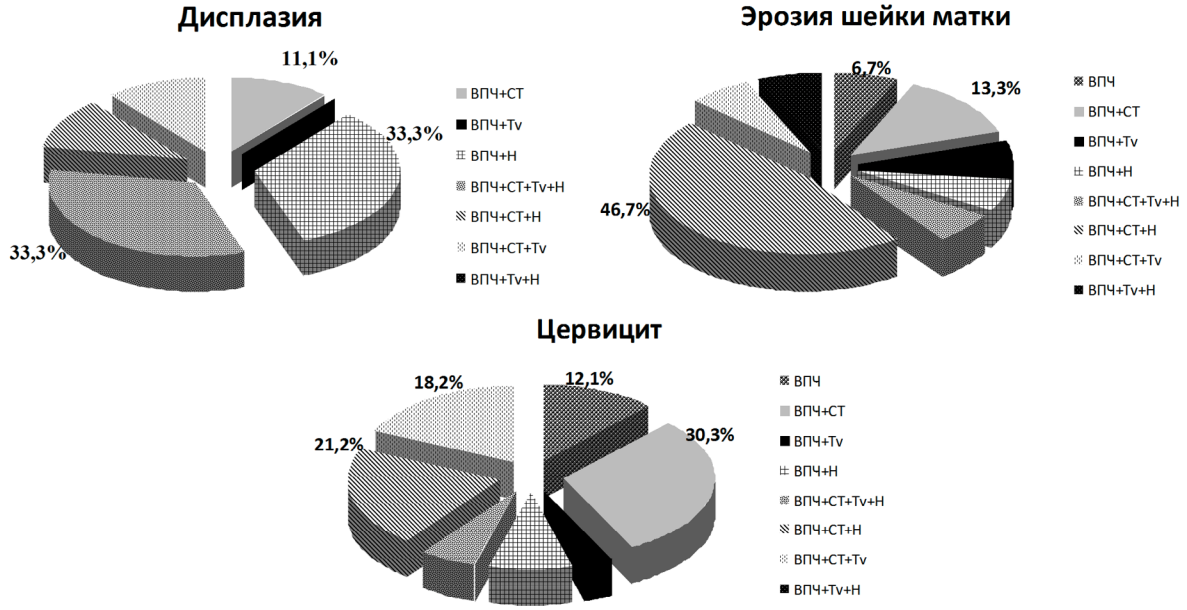


Рисунок 2 — Частота выявления моно- и микст папилломавирусной инфекции в обследуемых группах

Как видно из представленного рисунка, у женщин I группы (дисплазия) наиболее часто (по 33,3%) диагностировалась ассоциация папилломавирусной и герпетической инфекций и микст из *C. trachomatis*, ВПЧ ВКР, *T. vaginalis*, вирусов семейства *Herpesviridae*. Хламидийно-папилломавирусная инфекция отмечалась в 11,1%. У женщин II группы (ЭШМ) наиболее часто (46,7%) диагностировалась ассоциативная хламидийно-папилломавирусно-герпетическая инфекция. Хламидийно-папилломавирусная инфекция отмечалась в 13,3%. У женщин III группы (цервицит) наиболее часто (30,3%) регистрировалась хламидийно-паппиломавирусная инфекция. Ассоциации ВПЧ, *C. trachomatis*, вирусов семейства *Herpesviridae* и ВПЧ, *C. trachomatis*, *T. vaginalis* у 21,2% и 18,2% соответственно.

Заключение. Клинико-лабораторное обследование 81 женщины с фоновыми и предраковыми заболеваниями урогенитального тракта показало, что частота обнаружения возбудителей, в т. ч. ВПЧ ВКР и *C. trachomatis* при эрозии шейки матки, цервиците и дисплазии, не имеет значимых отличий, за исключением наиболее высокого (86,7%) обнаружения вирусов группы герпеса при дисплазии (против 46,8% при цервиците и 73,7% при ЭШМ). При этом только у 1 из 15 (6,7%) женщин II группы (ЭШМ) с папилломавирусной инфекцией и у 4 из 33 (12,1%) женщин III группы (цервицит) детектирован вирус в качестве единственного возбудителя. Ни у одной женщины I группы (дисплазия) не регистрировалась папилломавирусная моноинфекция, а во всех случаях ВПЧ ВКР обнаруживался в виде различных ассоциаций с другими патогенами.

Независимо от обследуемой группы *C. trachomatis* всегда регистрировалась в ассоциации с другими патогенами урогенитального тракта. У женщин I группы (дисплазия) наиболее часто (по 33,3%) диагностировалась ассоциация папилломавирусной и герпетической инфекций и микст из *C. trachomatis*, ВПЧ ВКР, *T. vaginalis*, вирусов семейства *Herpesviridae*. Хламидийно-папилломавирусная инфекция отмечалась в 11,1%. У женщин II группы (ЭШМ) наиболее часто (46,7%) диагностировалась ассоциативная хламидийно-папилломавирусно-герпетическая инфекция. Хламидийно-папилломавирусная

инфекция отмечалась в 13,3%. У женщин III группы (цервицит) наиболее часто (30,3%) регистрировалась хламидийно-папилломавирусная инфекция. Ассоциации ВПЧ, *C. trachomatis*, вирусов семейства *Herpesviridae* и ВПЧ, *C. trachomatis*, *T. vaginalis* у 21,2% и 18,2% соответственно.

В группе женщин с фоновыми и предраковыми заболеваниями урогенитального тракта наряду с обнаружением ВПЧ ВКР чаще всего детектируются такие патогены, как *C. trachomatis*, вирусы семейства *Herpesviridae*, *T. vaginalis*. При этом аспекты патоморфоза микст-инфекций, включая хламидийно-папилломавирусную инфекцию, остаются малоизученными. Дальнейшие исследования морфогенеза *C. trachomatis* на фоне персистенции ВПЧ позволят установить на субклеточном уровне характерные ранние маркеры «онкострессового» состояния клеток-мишеней. Это приведет к снижению риска возникновения рецидивов и осложнений, предотвращению развития фоновых и предраковых заболеваний, усовершенствованию тактики этиопатогенетической терапии.

Литература

1. Папилломавирусная инфекция урогенитального тракта женщин (эпидемиология, клинико-патогенетические особенности, методы диагностики, лечение, профилактика): информ.-метод. пособие / Е.В. Фоляк [и др.]. — Новосибирск: Вектор-Бест, 2010. — 88 с.
2. Doorbar, J. The papillomavirus life cycle / J. Doorbar // J. Clin. Virol. — 2005. — Vol. 32. — P. 7–15.
3. Попова, Н.А. Модели экспериментальной онкологии / Н.А. Попова // Сорос. образов. журн. — 2000. — Т. 6, № 8. — С. 33–38.
4. *In vitro* progression of human papillomavirus 16 episome-associated cervical neoplasia displays fundamental similarities to integrant-associated carcinogenesis / E. Gray [et. al.] // Cancer Res. — 2010. — Vol. 70. — P. 4081–4091.
5. Катханова, О.А. Роль ВПЧ в генезе неопластических процессов шейки матки. Оптимизация лечебной тактики / О.А. Катханова // Врач. — 2010. — № 3 — С. 61–65.
6. Popescu, N.C. Relationship of carcinogen-induced sister chromatid exchange and neoplastic cell transformation / N.C. Popescu, S.C. Amsbaugh, J.A. DiPaolo // Int. J. Cancer. — 1981. — Vol. 28, № 1. — P. 71–77.
7. HSV-2-induced tumourigenicity in HPV16-immortalized human genital kerayinocytes / J.A. DiPaolo [et al.] // Virology. — 1990. — Vol. 177, № 2. — P. 777–779.
8. Chow, V.T. Cancer and viruses / V.T. Chow // Ann. Acad. Med. Singapore. — 1993. — Vol. 22, № 2. — P. 163–169.
9. Macnab, J.C.M. Herpes simplex virus and human cytomegalovirus: their role in morphological transformation and genital cancers / J.C.M. Macnab // J. Gen. Virol. — 1987. —Vol. 68. — P. 2525–2550.
10. Lipsey, L.R. Anogenital neoplasia in patients with HIV infection / L.R. Lipsey, D.W. Northfelt // Curr. Opin. Oncol. — 2003. — Vol. 5, № 5. — P. 861–866.
11. Исследование биоценозов урогенитального тракта у женщин с патологией шейки матки с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном масштабе времени / Л.Д. Андросова [и др.] // Совр. технологии в медицине. — 2011. — № 4. — С. 113–117.
12. Paavonen, J. *Chlamydia trachomatis* and cancer / J. Paavonen // Sex. Transm. Infect. — 2001. — Vol. 77. — P. 154–156.
13. Seroprevalence of human papillomaviruses and Chlamydia trachomatis and cervical cancer risk: nested case–control study / P. Naucler [et al.] // J. Gen. Virol. — 2007. — Vol. 88. — P. 814–822.
14. Zenilman, J.M. Chlamydia and cervical cancer: a real association? / J.M. Zenilman // JAMA. — 2001. — Vol. 285. — P. 81–83.
15. Vuksanovic, V. *Chlamydia trachomatis* — connection with cervical cancer in women with positive results of human papillomavirus / V. Vuksanovic, J. Vucovic, F. Vukmirovic // Natura Montenegrina, Podgorica. — 2012. — Vol. 11, № 3. — P. 563–576.
16. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines / J.S. Smith [et al.] // J. Infect. Dis. — 2002. — Vol. 185. — P. 324–331.
17. *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for invasive cervical cancer / P. Koskela [et al.] // Int. J. Cancer. — Vol. 85. — P. 35–39.
18. The role of *Chlamydia trachomatis* infection in the development of cervical neoplasia and carcinoma / J. Markowska [et al.] // Med. Wieku Rozwoj. — 2005. —Vol. 9, № 1. — P. 83–86.
19. *Chlamydia trachomatis* serovar distributions in Russian men and women: a comparison with Dutch serovar distribution / V. Smelov [et. al.] // Drugs of Today. — 2009. — Vol. 45. — P. 33–38.

HUMAN PAPILLOMAVIRUS OF HIGH CARCINOGENIC RISK AND OTHER BACTERIAL AND VIRAL PATHOGENS AT THE BACKGROUND AND PRECANCEROUS DISEASES OF THE FEMALE UROGENITAL TRACT

Rubanik L.V., Poleshchuk N.N., Deykun D.A., Malinowska Y.V.

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

A comprehensive laboratory study of women with background (cervicitis, cervical erosion) and precancerous (dysplasia) diseases of the urogenital tract were conducted. It was shown that along with the

high frequency of detection of human papillomavirus of high carcinogenic risk (HPV HCR) such pathogens as *C. trachomatis*, herpes viruses, *T. vaginalis,* etc. were detected simultaneously. The results obtained suggest the importance of further study of the combined infections pathogenesis of the urogenital tract and the detection along with the HPV HCR other cofactors leading to cell oncotransformation.

Keywords: background and precancerous diseases, urogenital tract, human papillomavirus, chlamydia, herpes virus.

Поступила 30.07.2014

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЫЯВЛЕНИЯ *MYCOPLASMA GENITALIUM* В РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Руденкова Т.В.[1], Костюк С.А.[1], Шиманская И.Г.[1], Кулага О.К.[2], Руденко Д.Н.[2]
[1]Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск;
[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Реферат. Изучена чувствительность использования различных видов биологического материала для выявления *Mycoplasma genitalium*. В ходе исследования установлено, что для мужчин и новорожденных наиболее оптимальным является использование комбинированного материала, включающего осадок мочи и соскоб эпителиальных клеток слизистой уретры (для мужчин) или мазок отпечаток слизистой носоглотки (для новорожденных). Для женщин использование стандартной схемы взятия соскоба эпителиальных клеток слизистой уретры и цервикального канала является оптимальным для получения достоверных результатов ПЦР-анализа по выявлению *Mycoplasma genitalium*.

Ключевые слова: *Mycoplasma genitalium*, ПЦР, урогенитальный тракт, биологический материал.

Введение. Поражение урогенитального тракта человека связано, как правило, с 3 видами *Mollicutes*: *Ureaplasma urealyticum* (*Ur. urealyticum*), *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*), *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) [1]. При этом *Ur. urealyticum* и *M. hominis* хорошо растут на специальных питательных средах и легко идентифицируются, а *M. genitalium* является трудно культивируемым видом, для обнаружения которого требуется применение методов, основанных на идентификации генетического материала возбудителя [2].

Доказано, что *M. genitalium* является причиной развития воспалительных процессов урогенитального тракта у мужчин (негонококковый уретрит) и женщин (аднексит, цервицит, кольпит) [3, 4]. Есть данные о влиянии этого патологического агента на течение беременности, а также здоровье новорожденных [5].

Методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) являются преимущественным методом для выявления *M. genitalium* в биологическом материале ввиду трудности культивирования и высокой антигенной вариабельности данного микроорганизма, что затрудняет применение классических методов (культурального и серологического) клинической лабораторной диагностики для его идентификации [6].

Изучение чувствительности и специфичности коммерческих ПЦР-тест-систем, применяемых для выявления *M. genitalium*, проводится как самими производителями данных тест-систем, так и в ходе выполнения различных исследовательских проектов. Однако изучению вопросов, связанных с выбором вида биологического материла, наиболее подходящего для использования в ходе выполнения ПЦР-анализа, посвящено лишь небольшое количество публикаций [7]. Среди исследователей нет единого мнения о том, какой вид биологического материала является наиболее чувствительным для выявления *M. genitalium*.

Цель работы — изучение возможности использования и информативности различных видов биологического материала для выявления *Mycoplasma genitalium* с применением метода ПЦР в режиме реального времени.

Материалы и методы. Группу исследования составили 27 пар половых партнеров (мужчин и женщин) и их новорожденные дети. Пациенты были включены в исследование на основании выяв-

ления у беременных инфекций урогенитального тракта, обусловленных присутствием *M. genitalium*. Далее пациенты-мужчины и новорожденные были обследованы на наличие ДНК *M. genitalium*.

В качестве биологического материала были использованы:

1. У мужчин — осадок мочи, соскоб эпителиальных клеток со слизистой уретры, осадок мочи + соскоб эпителиальных клеток со слизистой уретры.

2. У женщин — осадок мочи, соскоб эпителиальных клеток слизистой уретры и цервикального канала, осадок мочи + соскоб эпителиальных клеток слизистой уретры и цервикального канала.

3. У новорожденных — осадок мочи, мазок-отпечаток слизистой носоглотки, осадок мочи + мазок-отпечаток слизистой носоглотки.

Для выделения ДНК из образцов биологического материала использовали набор реагентов для выделения ДНК «РеалБест – экстракция 1» («ВекторБест», РФ). Для выявления ДНК *M. genitalium* в образцах биологического материала проводили ПЦР в режиме реального времени с использованием тест-систем «РеалБест ДНК *Mycoplasma genitalium*» («ВекторБест», РФ).

Для статистической обработки данных использовали непараметрические методы статистического анализа (критерий Манна–Уитни) (SPSS 15.0).

Результаты и их обсуждение. Для определения чувствительности различных видов биологического материала при выявлении *M. genitalium* у мужчин проводили взятие первой порции утренней мочи и соскоба эпителиальных клеток слизистой уретры. В ходе исследований с использованием в качестве биологического материала осадка мочи и комбинированного материала, включающего осадок мочи и соскоб эпителиальных клеток, ДНК *M. genitalium* была выявлена в 88,89% (n = 24) случаев. При использовании в качестве биологического материала только соскоба эпителиальных клеток выявляемость *M. genitalium* составила 66,67% (n = 18) (таблица 1).

Таблица 1 — Чувствительность различных видов биологического материала при выявлении *M. genitalium* у мужчин

Вид биологического материала	Количество положительных результатов	
	абс.	%
Осадок мочи	24	88,89
Соскоб слизистой	18	66,67
Осадок мочи + соскоб слизистой	24	88,89

У всех пациентов, у которых ДНК *M. genitalium* была выявлена в соскобах эпителиальных клеток (n = 18, 66,67%), она была обнаружена и в осадке мочи, и в комбинированном материале. Однако у 6 пациентов (22,22%) результаты исследования соскоба эпителиальных клеток не смогли выявить присутствие ДНК *M. genitalium* в урогенитальном тракте, в то время как использование в качестве биологического материала осадка мочи и комбинированного материала позволило идентифицировать наличие инфекционного агента у данных пациентов. Это можно объяснить более высокой локализацией возбудителя в урогенитальном тракте мужчин, т. к. соскоб берется только из нижней трети уретры.

Анализ полученных данных с применением непараметрических методов статистического анализа (критерий Манна–Уитни) позволил установить достоверность различий между показателями выявляемости ДНК *M. genitalium* с применением в качестве биологического материала комбинированных проб (осадок мочи + соскоб слизистой) и соскобов эпителиальных клеток слизистой урогенитального тракта как единственного источника клеточного материала ($p<0,05$).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о достоверно более низкой информативности результатов ПЦР-анализа по выявлению ДНК *M. genitalium* при использовании в качестве биологического материала соскобов эпителиальных клеток из уретры. Необходимо также обращать внимание на качество взятия соскобов из уретры, т. к. взятие мазка должно осуществляться при введении зонда в уретру на глубину 1,5–2,5 см, в противном случае информативность результатов ПЦР снижается.

Совпадение результатов по выявлению ДНК *M. genitalium* в парах половых партнеров составило 88,89%, по данным анамнеза, никто из партнеров-мужчин не получал до проведения исследований специфического лечения, направленного на элиминацию *M. genitalium*, однако в 2 случаях

(7,41%) было отмечено проведение неспецифической антибактериальной терапии, связанной с респираторными инфекционными процессами.

Определение чувствительности различных видов биологического материала при выявлении *M. genitalium* у женщин проводили с использованием трех видов материала: осадок первой порции утренней мочи, соскоб эпителиальных клеток уретры и цервикального канала, а также комбинированного материла, включающего осадок мочи и соскоб эпителиальных клеток. Результаты, полученные при использовании в качестве биологического материала для исследования соскоба эпителиальных клеток из уретры и цервикального канала и комбинированного материала, полностью совпали, и при этом ДНК *M. genitalium* была выявлена в 100% случаев (n = 27). Использование осадка мочи как единственного источника биологического материала позволило выявить наличие ДНК инфекционного агента только в 59,25% (n = 16) (таблица 2).

Таблица 2 — Чувствительность различных видов биологического материала при выявлении *M. genitalium* у женщин

Вид биологического материала	Количество положительных результатов	
	абс.	%
Осадок мочи	16	59,25
Соскоб слизистой	27	100,0
Осадок мочи + соскоб слизистой	27	100,0

Полученные результаты позволили установить низкую информативноть результатов по выявлению ДНК *M. genitalium* при использовании в качестве биологического материала только осадка мочи. Это может быть связано с тем, что преимущественным местом локализации возбудителя является цервикальный канал, а уретра является вторичным очагом локализации патологического агента и не во всех случаях подвергается инфицированию.

Применение непараметрических методов статистики (критерий Манна–Уитни) для анализа полученных данных позволил установить достоверность различий между процентом выявляемости ДНК *M. genitalium* с применением в качестве биологического материала комбинированных проб (осадок мочи + соскоб слизистой) и соскобов эпителиальных клеток слизистой уретры и цервикального канала в сравнении с применением осадка мочи как источника клеточного материала ($p<0,05$).

Для определения чувствительности различных видов биологического материала при выявлении *M. genitalium* у новорожденных проводили взятие мочи и мазков-отпечатков со слизистой носоглотки. Выбор данных эпитопов продиктован местами наиболее характерного инфицирования новорожденных в ходе родового процесса. Полученный биологический материал исследовали как отдельно, так и в комбинации. Результаты, полученные при использовании в качестве биологического материала комбинированных проб, позволили установить, что в ходе родового процесса инфицированию подверглись 6 новорожденных (22,22%). Использование в качестве биологического материала осадка мочи и мазков-отпечатков слизистой позволило выявить инфицирование новорожденных *M. genitalium* в 18,52 (n = 5) и 14,81% (n = 4) случаев (таблица 3).

Таблица 3 — Чувствительность различных видов биологического материала при выявлении *M. genitalium* у новорожденных

Вид биологического материала	Количество положительных результатов	
	абс.	%
Осадок мочи	5	18,52
Мазок-отпечаток слизистой	4	14,81
Осадок мочи + мазок-отпечаток слизистой	6	22,22

При анализе результатов обследования новорожденных совместное инфицирование двух эпитопов (урогенитального и респираторного трактов) было установлено в 11,11% (n = 3) случаев, при этом ДНК *M. genitalium* была обнаружена и в осадке мочи, и в мазках-соскобах со слизистой носоглотки. Инфицирование только урогенитального тракта было выявлено в 7,41% (n = 2) случаев (ДНК *M. genitalium* выявлена только в осадке мочи), а только респираторного тракта — в 3,7% (n = 1) случаев (ДНК *M. genitalium* выявлена только в мазке-отпечатке слизистой).

Использование методов непараметрического статистического анализа не позволило установить достоверных различий в проценте выявляемости ДНК *M. genitalium* в зависимости от вида используемого биологического материала у новорожденных, однако, очевидно, что применение комбинации биологического материала из урогенитального (осадок мочи) и респираторного трактов (мазок-отпечаток со слизистой носоглотки) позволяет повысить выявляемость инфекционного агента.

Заключение. Для получения достоверных результатов при выборе вида биологического материала необходимо учитывать локализацию возбудителя в урогенитальном тракте пациента, строго соблюдать правила взятия биологического материала. От того насколько грамотно и правильно взят материал для исследования зависит достоверность и информативность конечного результата по выявлению возбудителя инфекционного процесса.

Анализ результатов, полученных в ходе исследования, позволил сделать вывод, что у мужчин и новорожденных использование для анализа комбинированного биологического материала, включающего клеточный материал из нескольких возможных мест локализации инфекционного агента, увеличивает шансы на выявление этиологической причины воспалительного процесса.

У женщин, исходя из данных, полученных в ходе исследования, результаты при использовании комбинированного материала полностью согласуются с результатами, полученными при анализе соскобов эпителиальных клеток из уретры и цервикального канала. Это можно объяснить как преимущественной локализаций возбудителя в цервикальном канале, так и тем, что стандартная процедура забора биологического материала у женщин предусматривает взятие клеток, как из цервикального канала, так и из уретры, т. е. из нескольких эпитопов.

Литература

1 Прилепская, В. К вопросу о роли микоплазм в урогенитальной патологии / В. Прилепская, В. Кисина, Е. Соколовский // Гинекология. — 2007. — № 9. — С. 31–38.

2 Немченко, О.И. Урогенитальный микоплазмоз (обзор литературы) / О.И. Немченко, Е.В. Уварова // Consilium Medicum. — 2007. — №1. — С. 45–51.

3 Современные подходы к диагностике и лечению негонококковых уретритов / В.И. Кисина [и др.] // Consilium Medicum. — 2005. — Т.7, №1.

4 Haggerty, C.L. Evidence for a role of *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease / C.L. Haggerty // Curr. Opin. Infect. Dis. — 2008. — Vol. 21. — P. 65–69.

5 Оценка риска инфицирования новорожденных при моно- и микст-инфекциях урогенитального тракта у родильниц / Т.В. Руденкова [и др.] // ARSmedica. — 2011. — № 15 (51). — С. 334–335.

6 Jensen, S.J. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples / S.J. Jensen, S.A. Uldum, J. Sondergard-Andersen // J. Clin. Microbiol. — 1991. — Vol. 29. — P. 46–50.

7 Comparison of first void urine and urogenital swab specimens for detection of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* by PCR in patients attending a sexually transmitted disease clinic / J.S. Jensen [et al.] // Sex. Transm. Dis. — 2004. — Vol. 31. — P. 499–507.

COMPERATIVE ANALYSIS *MYCOPLASMA GENITALIUM* DETECTION IN DIFFERENT SPECIMENS

Rudenkova T.V.[1], Kostiuk S.A.[1], Shimanskaya I.G.[1], Kulaga O.K.[2], Rudenko D.N.[2]
[1]Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk;
[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Different specimens sensivity research for *Mycoplasma genitalium* detection was performed. During this research, urine sediment and urogenital tract epithelial cells scrape combination was established as an optimal specimen for *Mycoplasma genitalium* DNA detection in male, and urine sediment and respiratory tract epithelial cells scrape combination was established as an optimal specimen for *Mycoplasma genitalium* DNA detection in newborn. For women urethra and cervix epithelial cells standard sampling procedure was established as an optimal specimen for Mycoplasma genitalium DNA detection.

Keywords: *Mycoplasma genitalium*, PCR, urogenital tract, specimen.

Поступила 10.07.2014

ИНФЕКЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ МЕТАТОНЗИЛЛЯРНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ

Рыбак Н.А.[1], Рыбак Р.Ф.[2], Цыркунов В.М.[1]
[1]Гродненский государственный медицинский университет, Гродно;
[2]Гродненская областная клиническая больница, Гродно, Беларусь

Реферат. Проанализированы частота и характер метатонзиллярных осложнений хронического тонзиллита с учетом микробиоценоза миндалин у 102 пациентов с разным стажем болезни. Установлено, что на развитие осложнений преимущественное влияние оказывают стафилококки и стрептококки, которые при развитии артропатий ассоциированы с грибами рода *Candida ssp.*, при нефропатиях с неферментируемыми грамм (минус) бактериями, кардиопатиях — энтеробактериями. Развитие осложнений у 61–83% пациентов происходит в первые 5 лет. Основной причиной их развития является прогредиентный патологический процесс в миндалинах, обусловленный хроническим дисбиозом ротоглотки, формирование которого происходит за счет постоянной контаминации миндалин ассоциациями микробных сообществ.

Ключевые слова: хронический тонзиллит, нёбные миндалины, дисбиоз.

Введение. Метатонзиллярные осложнения при декомпенсированном хроническом тонзиллите (ХТ) встречаются от 28 до 80% случаев [1, 2]. Их развитие является основным показанием для проведения тонзилэктомии, т. к. пролонгирование инфекционного процесса в миндалинах может привести к другим, не менее опасным осложнениям, включая генерализацию инфекции и летальный исход [3]. Этиологическими агентами, поддерживающими медленное течение воспаления в миндалинах, являются многочисленные микроорганизмы, обуславливающие интоксикацию и сенсибилизацию организма [4].

Цель работы — выявление взаимосвязи спектра микробных сообществ из глубоких отделов миндалин с частотой и характером метатонзиллярных осложнений у пациентов с различной продолжительностью ХТ.

Материалы и методы. Объектом исследования стали 102 пациента с декомпенсированной формой ХТ, которым в период 2011–2012 гг. была проведена плановая тонзилэктомия. Диагноз ХТ установлен на основании стандартных методов обследования. Забор материала для бактериологического исследования проведен из глубоких отделов лакун нёбных миндалин через дополнительный разрез со стороны капсулы удаленной миндалины после выполнения двусторонней тонзилэктомии [5]. Выделение и идентификация аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов производились в тот же день на микробиологическом анализаторе «Vitec» (США).

Среди пациентов преобладали женщины 60,8%, жители города (82,4%), среднего возраста (33,6±5,7 года). Длительность ХТ у 75 (73,5%) человек составила до 5 лет, у 20 (19,6%) — от 6 до 10 лет и у 7 (6,9%) — 11 и более лет. Ассоциированные с ХТ осложнения были представлены артропатией — у 39 (38,2%) пациентов, кардиопатией — у 18 (17,6%), нефропатией — у 16 (15,7%). Диагноз паратонзиллита установлен у 8 (7,8%) пациентов.

Обработка результатов проводилась методами вариационной статистики с использованием стандартной лицензионной программы Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение. В результате бактериологического исследования материала нёбных миндалин у 102 пациентов с ХТ из глубоких отделов было выделено 36 микроорганизмов, которые были разделены на 8 групп.

1-я группа: стрептококки (*Str. Pluranimalium*, *Str. Cristatusc*, *Str. Pneumoniae*, *Str. Parasanguinis*, *Str. Saliuarius*, *Str. Oralis*, *Str. Mithis*, *Str. Spicius*, *Str. Thermophilis*, *Str. Sanguinis*, *Granulicatella adiacens* (последний возбудитель по своим свойствам относится к альфа-гемолитическому стрептококку).

2-я группа: стафилококки (*St. Aureus*, *St. Epidermidis*, *St. Warneri*, *St. Haemolyticus*, *St. Capitis*, St. гр (+) кокки).

3-я группа: микрококки (*Rothia mucilaginosa*, *Kocuria rosea*, *Dermacoccus nishinomiyaensis*, *Kytococcus sedentarius*).

4-я группа: энтеробактерии (*Eschrichia coli*, *Klebsiela pneumonia*, *Enterobakter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Enterobakter aerogenosae*).

5-я группа: неферментируемые грамм (–) бактерии: (*Pseudomonas aeruginosae*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia group*).

6-я группа: энтерококки (*Enterococcus faecalis*, *Erysipelothrix rhusiopahiae*).

7-я группа: *Leukonostos mesenteroides ssp. cremori*, *Lotynebacteriaceae*.

8я- группа: грибы рода *Candida* (*C. albicans*, *C. famata*, *Candida ssp.*).

Наиболее частыми представителями микроорганизмов, персистирующими в глубине миндалин, были стафилококки, выделенные у 65,7% пациентов, и стрептококки, верифицированные у половины пациентов. Приблизительно с одинаковой частотой определялись энтеробактерии и грибы и значительно реже — другие представители. Важным результатом было то, что у большинства пациентов выделенные микроорганизмы были не в монокультуре (у 34 пациентов, 33,3%), а в различных ассоциациях с другими микроорганизмами (у 68 пациентов, 66,7%).

Среди первой группы микроорганизмов, представленных стрептококками, доминирующими по частоте были 3 представителя семейства стрептококков (*Str. Mithis*, *Str. Oralis* и *Str. Spicius*), суммарно составившие свыше 50%. Несколько реже выделялись другие стрептококки (*Granulicatella adiacens*, *Str. Pneumoniae*, *Str. Parasanguinis* и *Str. Saliuarius*), суммарная частота которых не превышала 40%. Единичными представителями группы, суммарно составившие около 5%, были *Str. Sanquis*, *Str. Thermophilis*, *Str. Thoraltensis* и *Str. Pluranimalium*.

Возбудители рода *Streptococcus* чаще встречались в ассоциациях как с другой условно-патогенной флорой (УПФ), так и внутри своей группы. Следует отметить, что из-за наличия множественных ассоциаций *Streptococcus* (от 1 пациента выделялось до 3 штаммов стрептококков) суммарное количество выделенных штаммов стрептококков превысило 100% показатель. Анализируя количественные данные установлено, что в глубоких отделах миндалин количество микроорганизмов равное 10^3 и 10^4 КОЕ в сумме составило 90%. Преобладание низких концентраций, вероятно, было связано с увеличением стажа ХТ, особенностями морфологического субстрата при декомпенсации ХТ (уменьшение паренхиматозного компонента и увеличение стромального) [6].

Микроорганизмы, принадлежащие к 1-й серогруппе, не были выделены ни у одного пациента, несмотря на то, что β-гемолитический стрептококк группы А (*Str. Pyogenes*), по данным литературы, является основным патогеном при ХТ [7, 8]. Представители 2-й серологической группы *Streptococcus* также не выделены, наиболее многочисленной оказалась 3-я серогруппа *Streptococcacea*, в которую вошли стрептококки, обладающие α и γ гемолитической активностью.

Среди 5 идентифицированных штаммов стафилококков наблюдалось преобладание золотистого стафилококка (*St. Aureus*), частота выделения которого превысила 83%. Значительно реже выделялись эпидермальный и гемолитический (*St. Epidermitis*, *St. Haemolitycus*) штаммы, суммарно составившие 12%. В монокультуре стафилококки выделялись значительно реже, чем в ассоциации с другой УПФ, в то же время внутривидовых ассоциаций стафилококков не было ни у одного пациента. Анализируя количество микроорганизмов, выделенных из глубины лакун, установлено, что с большей частотой (свыше 50%) стафилококки выделялись в концентрации с 10^3 КОЕ (53,7%).

Третьей группой микроорганизмов были микрококки, среди которых преобладали 2 представителя, составившие свыше 70% (*Rothia mucilaginosa*, *Kocuria rosea*), другие штаммы не имели большого значения. Преобладало выделение микрококков в ассоциации с другими возбудителями (свыше 85%) над монокультурами. Концентрация микрококков в миндалинах была не высокой, из глубины органа у 100% пациентов их количество было 10^3 КОЕ.

Среди энтеробактерий в миндалинах персистировали 5 возбудителей, которых преобладала клебсиелла, выделенная у половины пациентов с ХТ. Реже были идентифицированы *Enterobakter cloacae* и *Enterobakter aerogenosae* (по 16,7%) и лишь у одного пациента выделена *Serratia marcescens* (8,3%). Как и другие возбудители, энтеробактерии выделялись преимущественно в виде микст-культур (83,3%), доминирующей концентрацией по частоте была 10^3, выявленная у 50,0% пациентов.

Представителями условно-патогенных, неферментирующих бактерий (НФБ), выделенных у 7 (6,9%) пациентов из глубоких отделов миндалин, стали 3 представителя, среди которых с одинаковой частотой (свыше 42%) выделены *Burkholderia gladioli* и *Burkholderia cepacia group*, а одного пациента — *Pseudomonas aeruginosae*. Практически у всех (100%) пациентов НФБ были выделены в виде микст-культур с преобладающей концентрацией 10^3 КОЕ (71,4%).

Энтерококки (*Eterococcus faecalis* и *Erysipelothrix rhusiopahiae*), представляющие одну из малочисленных групп микроорганизмов, были выделены у единичных пациентов в микст-культуре (100%) и в небольшой концентрации (10^3 КОЕ) у 2 пациентов.

Сапрофитная микрофлора (*Leukonostos mesenteroides ssp.cremori* и *Lotynebacteriaceae*) была выделена у 3 пациентов в микст-культуре (2) и невысокой концентрации (10^3 КОЕ у 3 человек).

Среди грибов преобладали недифференцированные штаммы грибов *Candida ssp.*, а среди верифицированных — *Candida famata*, составившая 27,3% от всех штаммов в данной группе. У всех пациентов грибы выделялись в ассоциациях с другими возбудителями и в низкой концентрации у половины пациентов.

При сопоставлении результатов бактериологического анализа с развитием осложнений при ХТ в зависимости от стажа ХТ было установлено, что самая высокая частота артропатий была у пациентов, у которых из миндалин были выделены стрептококки и стафилококки в виде микст-культур (46,2 и 35,9%), преимущественно ассоциированные с грибами (10,3%). В монокультуре стафилококки несколько чаще, чем стрептококки выделялись из миндалин при данном осложнении. Другие возбудители на развитие артропатий существенного влияния не оказывали.

Схожие результаты по частоте развития осложнений были у пациентов с нефропатиями. В этой группе у половины пациентов (56,3%) причиной поражения почек были стафилококки, выделяемые в микст-культуре, несколько реже — стрептококки, которые, тем не менее, выделялись чаще, чем стафилококки в виде монокультуре при данной варианте осложнений. Ассоциации стафило- и стрептококков, влияющих на развитие нефропатии, были преимущественно с неферментируемыми грамм (минус) бактериями (12,5%).

Обращал на себя внимание показатель частоты развития кардиопатий, при которых не зафиксировано ни одного случая выделения стрептококков, стафилококков и другой микрофлоры в монокультуре. Кроме того, обращала на себя внимание высокая частота кардиопатий у пациентов с выделением этих же возбудителей в микст-культуре с энтеробактериями (22,2%), которые при других осложнениях выделялись значительно реже.

О преимущественной роли стафилококков и стрептококков в развитии осложнений свидетельствует значительная частота их выделения при паратонзиллите, включая 25%-й показатель монокультуры стафилококков, что важно учитывать при лечении осложнений.

При оценке влияния стажа ХТ на развитие осложнений показано, что осложнения у пациентов с ХТ регистрировались в более ранний период (до 5 лет), что и предполагалось, т. к. именно в этой группе у 73,5% пациентов была проведена тонзилэктомия. С другой стороны, открытым остается вопрос о морфологическом состоянии миндалин у пациентов со столь небольшим стажем ХТ, что планируется исследовать в дальнейшем. В то же время выявление у 75% пациентов со стажем болезни до 5 лет паратонзиллита и выделение у 87,5% из них стафилококков из глубины миндалин свидетельствовало о наличии существенных признаков снижения сопротивляемости организма пациента, обусловленного дефектами местного и общего иммунного ответа на микст-инфекцию.

Заключение. Миндалины при ХТ являются резервуаром микробных сообществ (формирующихся биопленок, представленных стафилококками, стрептококками и их многочисленными ассоциациями). На развитие метатонзиллярных осложнений преимущественное влияние оказывает микст-инфекция, которая при развитии артропатий преимущественно ассоциирована грибами рода *Candida ssp.*, при нефропатиях — неферментируемыми грамм (минус) бактериями, кардиопатиях — энтеробактериями. Преимущественной причиной развития паратонзиллита являются стафилококки. Развитие метатонзиллярных осложнений у 61–83% пациентов происходит в течении первых 5 лет, причиной которых является прогредиентный патологический процесс в миндалинах (хронический дисбиоз ротоглотки), формирование которого происходит за счет постоянной контаминации миндалин ассоциациями микробных сообществ, приводящей к снижению иммунитета, гиперсенсибилизации организма и аутоиммунным реакциям.

Литература

1. Децик, Ю.И. К диагностике тонзиллогенной миокардиодистрофии / Ю.И. Децик, Р.Я. Дутка // Врач. дело. — 1982. — № 6. — С. 69–72.

2. Функциональные методы исследования в диагностике тонзиллогенных кардиопатий в плане дифференциальной диагностики с ревматизмом / Ф.Ф. Карцева [и др.] // Раннее выявление, диагностика, лечение и реабилитация больных с заболеваниями сердечно-сосудистой системы: тез. докл. всесоюз. конф. — Новосибирск, 1976. — С. 53–54.

3. Метатонзилярные осложнения в практике оториноларинголога и кардиолога / А.Ю. Овчинников [и др.] // Consilium medicum. — 2009. — Т. 11, № 11. — С. 49–52.

4. Bacteremia during tonsillectomy / I. Kaygusuz [et al.] // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. — 2001. — Vol. 58, № 1. — P. 69–73.
5. Цыркунов, В.М. Микробиоценоз при хроническом тонзиллите / В.М. Цыркунов, Н.А. Рыбак, Р.Ф. Рыбак // Вестн. оториноларингологии. — 2012. — № 5. — С. 260–261.
6. Патоморфологические изменения в нёбных миндалинах при хроническом тонзиллите / Н.А. Рыбак [и др.] // Актуальные вопросы оториноларингологии на современном этапе: тез. док. 7 Съезда оториноларингологов Респ. Беларусь. — Минск, 2013. — С. 184–186.
7. Мальцева, Г.С. Применение лабораторных методологий в этиологической диагностике хронического тонзиллита / Г.С. Мальцева, Ю.К. Янов // Росс. оториноларингология. — 2007. — № 2. — С. 46–55.
8. Роль микрофлоры в этиологии хронического тонзиллита / А.И. Крюков [и др.] // Вестн. оториноларингологии. — 2010. — № 3. — С. 4–6.

INFECTIOUS ASPECTS OF METATONSILLAR COMPLICATIONS

Rybak N.A.[1], Rybak R.F.[2], Tsyrkunov V.M.[1]
[1]Grodno State Medical University, Grodno;
[2]Grodno Regional Clinical Hospital, Grodno, Belarus

The frequency and nature of metatonsillar complications of chronic tonsillitis considering microbiocenosis of tonsils were analyzed in 102 patients with different experience of illness. It has been established that principally staphylococci and streptococci influence the development of complications, at arthropathy these microorganisms are associated with fungi of the genus *Candida ssp.*, at nephropathies — with non-fermentable grams (minus) bacteria, at cardiomyopathy — with enterobacteria. The development of complications in 61–83% of patients occurs during the first 5 years. The main reason for their development is the progression of the pathological process in the tonsils caused by chronic dysbiosis oropharynx, the formation of which is due to constant contamination tonsils associations of microbial communities.

Keywords: chronic tonsillitis, palatine tonsils, dysbiosis.

Поступила 10.07.2014

ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА ВИРУСА ПУУМАЛА, ЭКСПРЕССИРОВАННОГО В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ *E.COLI*, РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Счесленок Е.П., Дубков Н.А., Школина Т.В., Фомина Е.Г., Семижон П.А., Владыко А.С.
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Используя двухэтапную схему очистки (металлохелатная хроматография и гель-фильтрация на автоматическом хроматографе ÄKTAexplorer 100), получен высокоочищенный рекомбинантный полипептид, представляющий антигензначимый участок нуклеокапсидного белка вируса Пуумала.

Ключевые слова: рекомбинантные полипептиды, жидкостная хроматография, металлохелатная аффинная хроматография, гель-фильтрация.

Введение. Использование рекомбинантных полипептидов в качестве антигенов в иммунобиологических тест-системах, а также для иммунизации животных с целью получения специфических антител, предполагает высокие требования к степени их очистки для достижения высокой специфичности и чувствительности диагностикумов. Жидкостная хроматография представляет группу методов, способных обеспечить требуемую степень чистоты. Среди лабораторных методов очистки, фракционирования и анализа структуры белков, нуклеиновых кислот и их компонентов совокупность различных хроматографических методов занимает центральное место. Автоматизация процесса очистки биологических компонентов существенно упростила выполнение хроматографических анализов, увеличив их точность и воспроизводимость. Для очистки белков хроматографией обычно используется комбинация хроматографических методов, включающих гель-фильтрацию (ГФ), ионообменную и аффинную хроматографию. Аффинная хроматография является уникальной технологией очистки, поскольку позволяет очистить макромолекулы на основе их биологических функций или химической структуры [1]. Разделение белков и других макромолекул при ГФ основа-

но на механизме молекулярного сита: матрицы, используемые в ГФ, состоят из гранул, содержащих поры различного диаметра, и механизм разделения основан на способности молекул дифференцированно проникать в поры сорбента. Мелкие молекулы проникают в поры, в то время как крупные молекулы по стереохимическим причинам проходят между гранулами сорбента и элюируются из колонки в первую очередь [2]. В большинстве случаев гель-фильтрация используется как конечный этап доочистки белковых компонентов.

Цель работы — получение высокоочищенного препарата рекомбинантного полипептида, представляющего антигензначимый участок нуклеокапсидного белка вируса Пуумала, с использованием различных видов жидкостной хроматографии на автоматическом хроматографе ÄKTAexplorer 100.

Материалы и методы. Для получения рекомбинантного полипептида использовали экспрессирующую плазмиду pJC40/NP PUU, задепонированную в Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (№ депонента NP8/00), и бактериальный штамм *Escherichia coli BL21 (DE3).*

Подготовка компетентной клеточной культуры и трансформация клеток плазмидной ДНК. Получение компетентной культуры клеток *E. coli,* штамм *BL21 (DE3),* и трансформацию клеток гибридной плазмидой pJC40/N PUU проводили согласно описанным ранее методикам [3].

Металлохелатная аффинная хроматография (МХАХ). Очистку рекомбинантных полипептидов осуществляли с использованием колонки HisTrap Chelating HP (GE Healthcare) объемом 5 мл с иммобилизованными катионами никеля на автоматическом жидкостном хроматографе ÄKTAexplorer 100 (GE Healthcare).

Эксклюзионная хроматография. Дополнительную очистку рекомбинантных полипептидов осуществляли методом гель-фильтрации с использованием колонки Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) на автоматическом жидкостном хроматографе ÄKTAexplorer 100 (GE Healthcare).

Анализ рекомбинантных полипептидов в полиакриламидном геле (ПААГ) осуществляли согласно методу, предложенному *Laemmli* [4].

Результаты и их обсуждение. Для экспрессии рекомбинантного полипептида, представляющего антигензначимый участок нуклеокапсидного белка вируса Пуумала, гибридной плазмидой pJC40/N PUU были трансформированы пермиссивные компетентные клетки *E. coli*, штамм *BL21(DE3)*. Полученные трансформанты выращивали на жидкой питательной среде LB, содержащей 0,2% глюкозы и 50 мкг/мл ампициллина. Для получения рекомбинантного полипептида в препаративных количествах трансформанты выращивали в большом объеме питательной среды — 4 флакона по 100 мл LB-бульона. В момент достижения бактериальной культурой оптической плотности OD_{600} = 0,3 осуществляли индукцию биосинтеза рекомбинантного полипептида путем внесения в среду изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида до конечной концентрации 0,4 mM, после чего клетки инкубировали еще в течение 3,5 ч. Оценку уровня экспрессии рекомбинантного полипептида вируса Пуумала осуществляли методом электрофоретического анализа в полиакриламидном геле.

Первоначально для очистки рекомбинантного полипептида от бактериальных белков был использован метод металлохелатной аффинной хроматографии. Данный метод основан на взаимодействии содержащихся в составе рекомбинантных полипептидов гистидиновых остатков (последовательность, кодирующая синтез гистидинового «хвоста», содержится в составе экспрессирующего вектора pJC40) с ионами металлов, иммобилизованными на матриксе колонки. Известно, что более полная солюбилизация рекомбинантных полипептидов и освобождение остатков гистидина происходят в денатурирующих условиях, поэтому все стадии аффинной хроматографии были выполнены в присутствии 6М мочевины [5].

Очистку полипептида осуществляли на автоматическом жидкостном хроматографе ÄKTAexplorer 100 с использованием колонки HisTrap Chelating HP (GE Healthcare) с иммобилизованными катионами Ni^{2+}. Колонку уравновешивали 10 объемами связывающего буфера (20 мМ Трис-HCl, 0,5М NaCl, 5 мМ имидазол, 6М мочевина, pH 7,9). Затем на колонку наносили образец при скорости потока 0,2 мл/мин. После нанесения материала колонку отмывали десятью объемами связывающего буфера. Элюцию проводили десятью объемами элюирующего буфера (20 мМ Трис-HCl, 0,5М NaCl, 300 мМ имидазол, 6М мочевина, pH 7,9), отбирая фракции объемом 2 мл. Отмывку и элюирование осуществляли при скорости потока 0,4 мл/мин. На всех этапах осуществляли измерение оптической

плотности при 280 нм относительно связывающего буфера (рисунок 1). Оценку уровня экспрессии и степени очистки рекомбинантного полипептида осуществляли методом электрофореза в ПААГ (рисунок 2). Результаты электрофореза показали, что фракция элюции (рисунок 2, дорожка 5) содержит мажорную полосу рекомбинантного полипептида (17 кДа) в предполагаемой области распределения относительно маркерных белков. Однако из рисунка видно, что фракция элюции помимо целевого белка содержит также значительное количество примесей бактериальных белков.

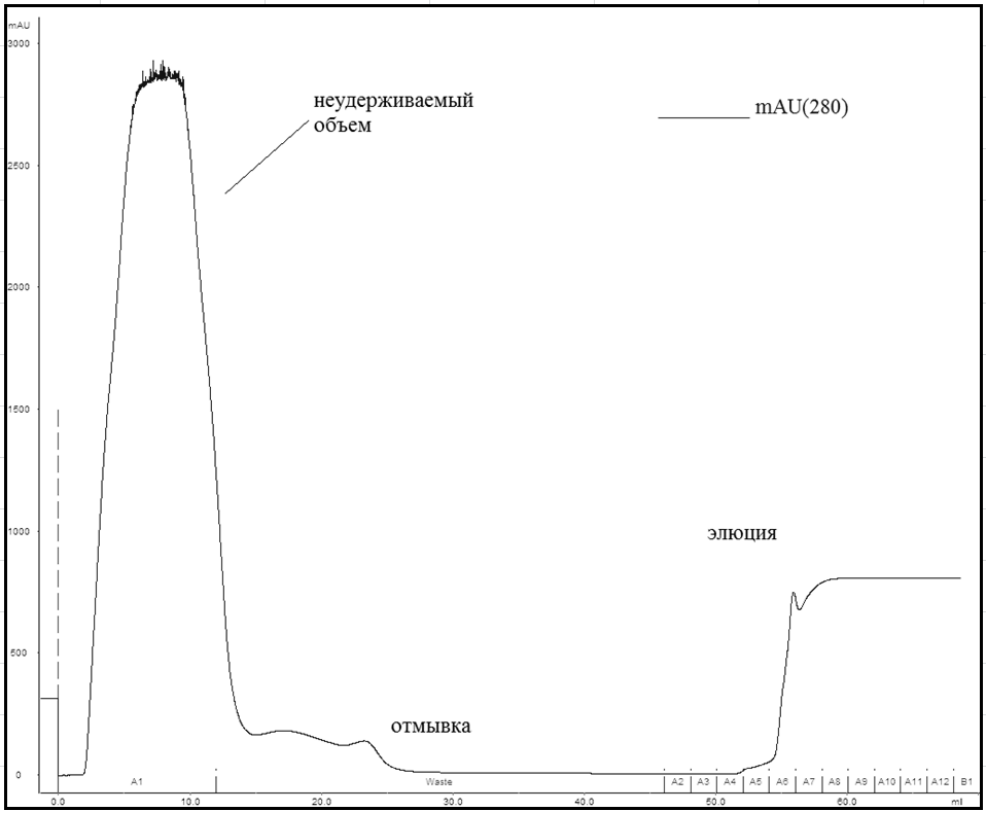


Рисунок 1 — Спектрофотометрический анализ хода очистки рекомбинантного полипептида вируса Пуумала методом МХАХ в денатурирующих условиях

Использование металлохелатной хроматографии гистидин-меченых белков способно обеспечить удаление до 90% примесей [5], что является недостаточным для получения высокоочищенных препаратов рекомбинантных полипептидов. В связи с этим в качестве этапа доочистки рекомбинантного полипептида вируса Пуумала был использован метод эксклюзионной хроматографии (гель-фильтрация). Для этого фракции элюции, содержащие искомый полипептид, объединяли и осуществляли концентрирование рекомбинантного полипептида с постепенным обессоливанием и заменой буфера путем ультрафильтрации через фильтр Amicon Ultra-4. Замена растворов осуществлялась в следующей последовательности: 6М мочевина, 4М мочевина, 2М мочевина, буфер для гель-фильтрации (50 мМ фосфатный буфер, 150 мМ NaCl, pH 7,0). В пробу дополнительно вносили 200 мкг апротинина в качестве контроля нанесения пробы на колонку. Гель-фильтрацию проводили с использованием колонки Superdex 75 10/300 GL с эффективным диапазоном разделения 3000–70000 M_r на автоматическом жидкостном хроматографе ÄKTAexplorer 100. Колонку уравновешивали двумя объемами буфера (50 мМ фосфатный буфер, 150 мМ NaCl, pH 7,0). Нанесение пробы на колонку и разделение проводили со скоростью 0,5 мл/мин. На всех этапах осуществляли фракционирование (заданный объем фракций — 1 мл) и измерение оптической плотности при длине волны 280 нм относительно буфера (рисунок 3). Из рисунка 3 видно, что при нанесении рекомбинантного полипептида и апротинина в равных количествах (~200 мкг) отмечается совершенно различный уровень поглощения излучения при длине волны 280 нм. Исходя из того, что поглощение света белками при данной длине волны в основном определятся содержанием оснований тирозина и триптофана в белке (и в незначительной степени фенилаланином и дисульфидными связями) [6], была проанализирована первичная аминокислотная последовательность рекомбинантного полипептида.

Структура рекомбинантного полипептида, кодируемого гибридной плазмидой pJC40/NP PUU, приведена на рисунке 4. Длина полипептида с учетом векторной части составляет 148 аминокислотных остатков, молекулярная масса, рассчитанная при помощи компьютерной программы Proteins calculator, 16,8 кДа [7]. Анализ показал, что рекомбинантный полипептид содержит лишь два тирозиновых основания, чем может объясняться низкий уровень поглощения излучения при данной длине волны. С учетом этого факта было повторно проведено разделение рекомбинантного полипептида вируса Пуумала гель-фильтрацией в тех же условиях при параллельном отслеживании на спектрофотометре уровня поглощения света при длине волны 280 нм и в области дальнего ультрафиолета при длине волны 205 нм. Данная длина волны близка к максимуму поглощения пептидной связи (190 нм).

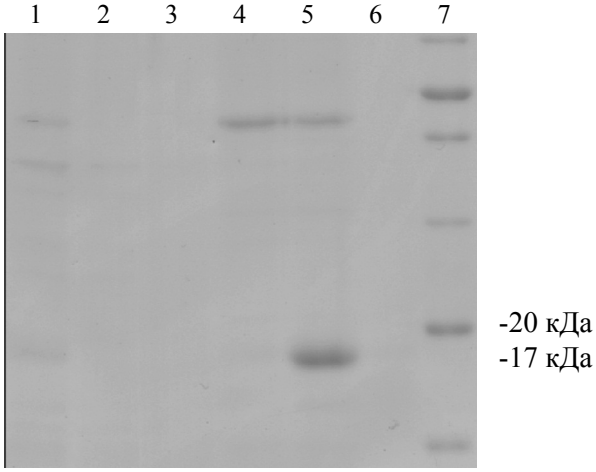


Рисунок 2 — Электрофоретический анализ фракций металлохелатной хроматографии рекомбинантного полипептида вируса Пуумала: 1, 2 — лизат бактериальных клеток, содержащий рекомбинантный полипептид, до (1) и после нанесения на колонку (2); 3 — фракция отмывки колонки после сорбции; 4–6 — фракции элюции рекомбинантного полипептида; 7 — маркер молекулярных масс

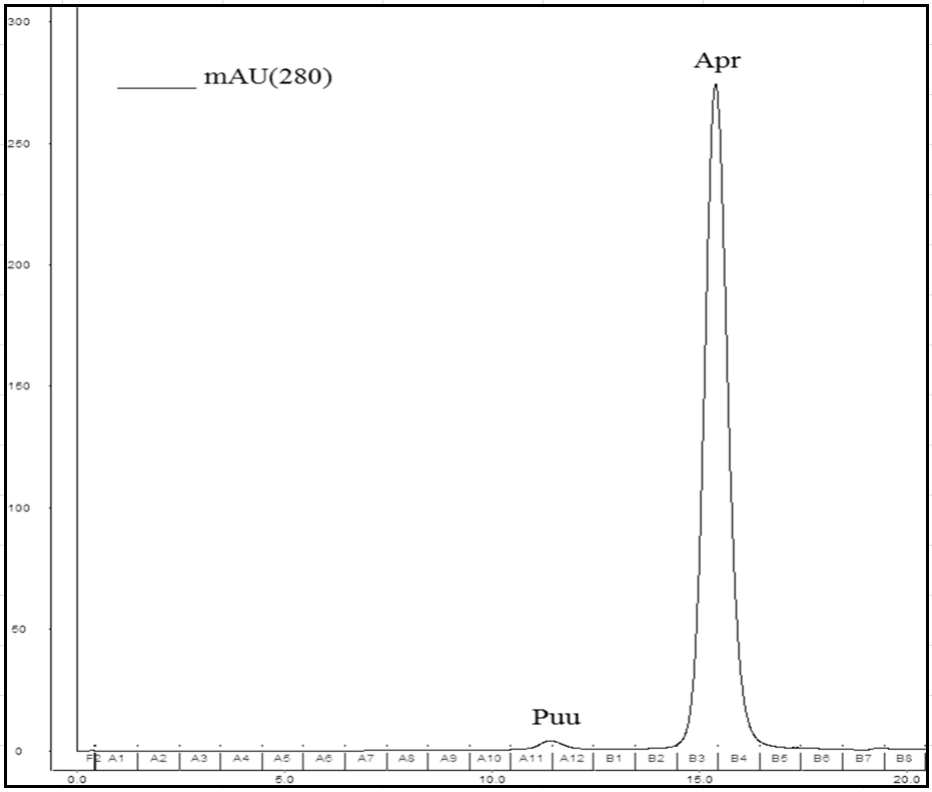


Рисунок 3 — Спектрофотометрический анализ хода очистки рекомбинантного полипептида вируса Пуумала методом гель-фильтрации

MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRHMKLMSDLTDIQED
ITRHEQQLIVARQKLKDAERAVEVDPDDVNKNTLQ
ARQQTVSALEDKLAD***Y***KRRMADAVSRKKMDTKP
TDPTGIEPDDHLKERSSLR***Y***GNVLDVNAIDIEEPSG
QTAGSRALAN

Рисунок 4 — Аминокислотная структура рекомбинантного полипептида вируса Пуумала (жирным курсивом выделены тирозиновые основания)

Результаты гель-фильтрации (рисунок 5) показали, что в предполагаемой области распределения наблюдается повышенный уровень поглощения излучения при длине волны 205 нм в отличие от длины волны 280 нм, что является подтверждением нашего предположения. Фракции, соответствующие повышенному уровню оптической плотности, анализировали электрофорезом в ПААГ (рисунок 6). Из рисунка видно, что фракция гель-фильтрации (рисунок 6, дорожка 5) содержит мажорную полосу рекомбинантного полипептида соответствующего размера (17 кДа). Но в отличие от рекомбинантного полипептида, содержащегося во фракции элюции, полученной при проведении металлохелатной аффинной хроматографии (рисунок 6, дорожка 1), данная фракция не содержит примесей бактериальных белков и представлена только искомым рекомбинантным полипептидом.

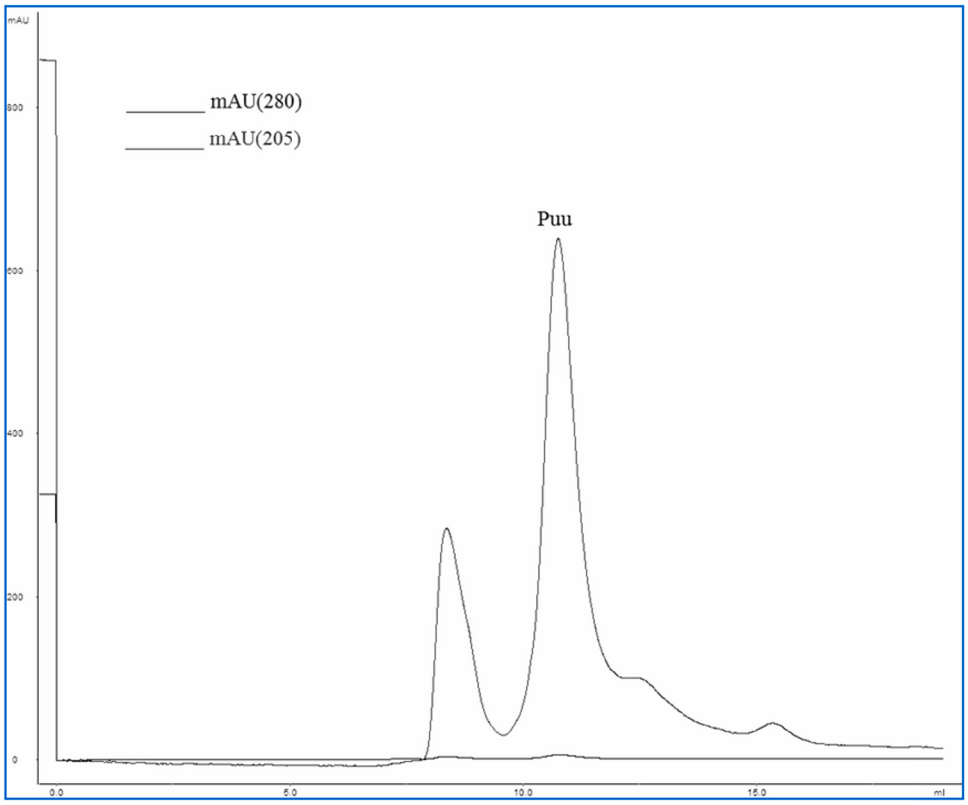


Рисунок 5 — Спектрофотометрический анализ хода очистки рекомбинантного полипептида вируса Пуумала методом гель-фильтрации при разных длинах волн

Таким образом, в результате исследований отработаны хроматографические методы очистки рекомбинантного полипептида вируса Пуумала на автоматическом хроматографе ÄKTAexplorer 100. Последовательное использование металлохелатной аффинной хроматографии и гель-фильтрации позволило получить рекомбинантный полипептид, не содержащий следовых количеств примесей бактериальных белков. Применение двухэтапной схемы очистки рекомбинантных полипептидов позволит получать высокоочищенные препараты, использование которых в качестве специфических антигенов в диагностических тест-системах повысит качество разрабатываемых иммунобиологических диагностикумов.

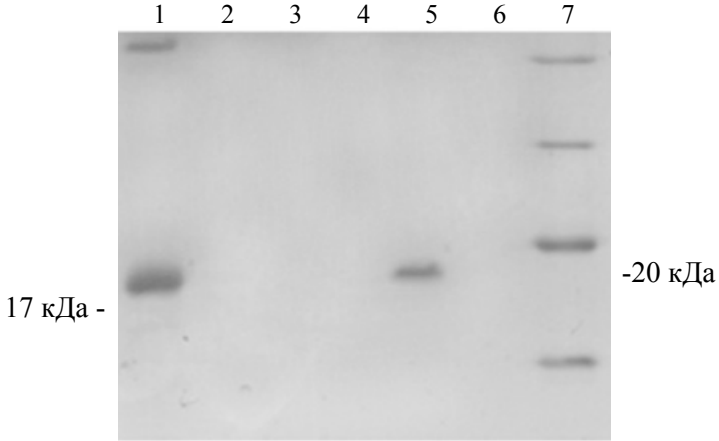


Рисунок 6 — Очистка рекомбинантного полипептида вируса Пуумала гель-фильтрацией: 1 — фракция элюции при МХАХ; 2–6 — фракции элюции при ГФ; 7 — маркер молекулярных масс

Литература

1. Poole, C.F. The Essence of Chromatography / C.F. Poole. — Elsevier, 2003. — 925 p.
2. Size-exclusion chromatography / J. Silberring et al. // Chromatography. Fundamentals and Applications of Chromatography and Related Differential Migration Methods / ed. by E. Heftman. — 6th ed. — Part A. Fundamentals and Techniques // J. Chromatograph. library. — 2004. — Vol. 69A, Ch. 5. — P. 213–253.
3. Антигенные свойства рекомбинантного полипептида, содержащего повторы антигенной детерминанты нуклеокапсидного белка вируса гепатита С / П.А. Семижон [и др.] // Здравоохранение. — 2006. — № 11. — С. 35–37.
4. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. — 1970. — Vol. 227, № 5259. — P. 680–685.
5. The QIAexpressionist. A Handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. — 5th ed. — QIAGEN, 2003. — 126 p.
6. Aitken, A. Protein Determination by UV Absorption / A. Aitken, M.P. Learmonth // The Protein Protocols Handbook / ed. by J.M. Walker. — 2nd ed. — Humana Press, 2002. — 1146 p.
7. Protein Calculator v.3.4 [Electronic resource]. — Mode of access: http://protcalc.sourceforge.net/. — Date of access: 09.06.2014.

PURIFICATION OF PUUMULA VIRUS RECOMBINANT POLYPEPTIDE EXPRESSED IN *E.COLI* BACTERIAL CELLS BY THE DIFFERENT LIQUID CHROMATOGRAPHY METHODS

Scheslenok E.P., Dubkov N.A., Shkolina T.V., Fomina E.G., Semizhon P.A., Vladyko A.S.
Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

Highly purified recombinant polypeptide representing antigen active domain of Puumala virus nucleocapsid protein was obtained using two-stage purification scheme (immobilized metal-ion affinity chromatography and gel-filtration) on automatic chromatographic system ÄKTAexplorer 100.

Keywords: recombinant polypeptides, liquid chromatography, immobilized metal-ion affinity chromatography, gel-filtration.

Поступила 10.07.2014

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АМПЛИКОНОВ, КОДИРУЮЩИХ CH_2 ДОМЕН ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА КЛАССА G И CH_3 ДОМЕН ИММУНОГЛОБУЛИНА КЛАССА M

Устинович Е.В., Фомина Е.Г., Счесленок Е.П., Семижон П.А., Владыко А.С.
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Получены ампликоны, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие CH_2 домен иммуноглобулина человека класса G и CH_3 домен иммуноглобулина челове-

ка класса M. Ампликоны включают в себя последовательности, комплементарные праймерам, и сайты для рестриктаз HindIII и XhoI, подобранные для встраивания в полилинкер плазмиды pJC40. Ампликоны будут использованы для клонирования и получения экспрессирующих векторов с целью наработки рекомбинантных полипептидов, соответствующих CH_2 домену иммуноглобулина человека класса G и CH_3 домену иммуноглобулина человека класса M.

Ключевые слова: ампликоны, антивидовые антитела, CH_2 домен иммуноглобулина G, CH_3 домен иммуноглобулина M.

Введение. Уровни специфических иммуноглобулинов классов G и M в крови человека являются важным диагностическим признаком при многих инфекционных заболеваниях [1]. Количественное определение специфических иммуноглобулинов G и M на современном этапе проводят с использованием иммуноферментных диагностических тестов, где в качестве антивидовых меченых ферментом иммуноглобулинов выступают поли- или моноклональные антитела. В свою очередь антивидовые антитела получают при иммунизации лабораторных животных препаратами иммуноглобулинов человека [2]. Основные требования к антивидовым иммуноглобулинам заключаются в необходимости достижения максимальных параметров по чувствительности и специфичности. Эти показатели зависят от чистоты используемых иммуногенов и отработанной схемы иммунизации лабораторных животных. Обычно для получения препаратов антивидовых антител в качестве иммуногенов выступают макроглобулины (IgM) или иммуноглобулины (IgG), полученные фракционированием человеческих сывороток крови хроматографическими методами [3].

Основным недостатком при получении иммуногенов таким способом является наличие в их составе посторонних белков-примесей, вызывающих иммунный ответ на нежелательные пептиды. В результате полученные препараты могут давать перекрестные реакции с другими белками, что приводит в конечном итоге к неспецифическим реакциям, а следовательно, к появлению ложно-положительных либо ложно-отрицательных результатов.

Выбор CH_2 домена иммуноглобулина G и CH_3 домена иммуноглобулина M в качестве объектов для получения рекомбинантных полипептидов был сделан, исходя из анализа структуры иммуноглобулинов. Так, CH_1 домен тяжелой цепи иммуноглобулинов G и M участвует в формировании паратопа — локуса связывания с антигеном. CH_3 домен иммуноглобулина G и CH_4 домен иммуноглобулина M в эволюционном плане выполняют функцию закрывания в мембране и в связи с эти имеют более гидрофобный профиль аминокислотной последовательности. В то же время CH_2 домен иммуноглобулина G и CH_3 домен иммуноглобулина M по функциональной активности ответственны за выполнение эффекторных функций и имеют более гидрофильный аминокислотный профиль [4]. В связи с этим эти домены были выбраны нами в качестве объектов для получения антивидовых антител.

Рекомбинантные полипептиды будут получены при использовании генно-инженерных методов. Для получения препаративных количеств таких полипептидов будет использован высокоспецифический способ очистки, основанной на хелатировании металлами гистидиновых аминокислотных остатков, что позволит достичь высокой степени чистоты получаемых препаратов, соответствующих CH2 домену иммуноглобулина человека класса G и CH3 домену иммуноглобулина человека класса M. Задачей первого этапа данного направления исследований являлось получение кДНК (ампликонов), кодирующих информацию об интересующих доменах.

Цель работы — получение ампликонов, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие CH_2 домен иммуноглобулина человека класса G и CH_3 домена иммуноглобулина человека класса M, для последующего клонирования их в плазмидные векторные конструкции и получения в экспрессирующих векторах препаративных количествах доменных белков.

Материалы и методы. *Получение РНК.* РНК выделяли из клеток человеческой лимфомы линий IM-9 и Namalva с использованием коммерческого набора реагентов TRI Reagent®BD T3809 (SIGMA-ALDRICH) согласно прилагаемой инструкции. Выделенная РНК служила матрицей в реакции обратной транскрипции для получения кДНК. Реакция обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) была проведена с использованием случайных праймеров и реагентов RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase «Thermo Scientific» (Литва) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученная кДНК была использована для постановки ПЦР.

Амплификация. Реакцию амплификации проводили в присутствии специфических праймеров, подобранных на основании полноразмерных нуклеотидных последовательностей, кодирующих тяжелые цепи иммуноглобулинов G и M (GenBank).

Анализ продуктов амплификации. Фрагменты ДНК после амплификации анализировали в 1,5%-м агарозном геле. Электрофорез проводили при напряжении тока 10В/см геля в ТРИС-боратном буфере, pH 8,0, в течение 45 мин. Визуализацию фрагментов ДНК осуществляли с помощью интеркалирующего в ДНК агента-этидиум бромида этидием с последующим просмотром в УФ.

Результаты и их обсуждение. Стратегия получения рекомбинантных полноразмерных молекул иммуноглобулина G человека с использованием трансфецированных клеток млекопитающих описаны многими авторами [5]. Также известны способы получения фрагментов человеческих иммуноглобулинов при клонировании генов человека в прокариотических экспрессирующих системах [6]. В то же время интересующей нас информации относительно нуклеотидной последовательности прямого и обратного праймеров и экспрессирующего вектора мы не нашли.

В качестве источника для получения ДНК-ампликонов были использованы клетки человеческой лимфомы линий IM-9 и Namalva. Праймеры подбирались таким образом, чтобы максимально амплифицировать CH_2 и CH_3 домены интересующих иммуноглобулинов.

В результате современных генно-инженерных манипуляций нами были получены ДНК фрагменты (ампликоны), включающие последовательности, кодирующие фрагменты иммуноглобулинов человека, соответствующие CH_2 домену иммуноглобулина человека класса G и CH_3 домену иммуноглобулина человека класса M (рисунок). Полученные ампликоны включают последовательности праймеров, а также сайты для гидролиза ферментами рестрикции — рестриктаз HindIII и XhoI (с учетом нуклеотидных последовательностей полилинкеров у плазмиды для клонирования и плазмиды для экспрессии полипептидов).

Как видно из рисунка, полученные ДНК фрагменты (ампликоны) соответствуют теоретически рассчитанным по нуклеотидным основаниям CH_2 домену иммуноглобулина человека класса G (дорожка 1) и CH_3 домену иммуноглобулина человека класса M (дорожка 3).

Ампликоны планируется использовать для конструирования векторов с целью получения рекомбинантных полипептидов в прокариотической экспрессирующей системе, соответствующих CH_2 домену иммуноглобулина человека класса G и CH_3 домену иммуноглобулина человека класса M.

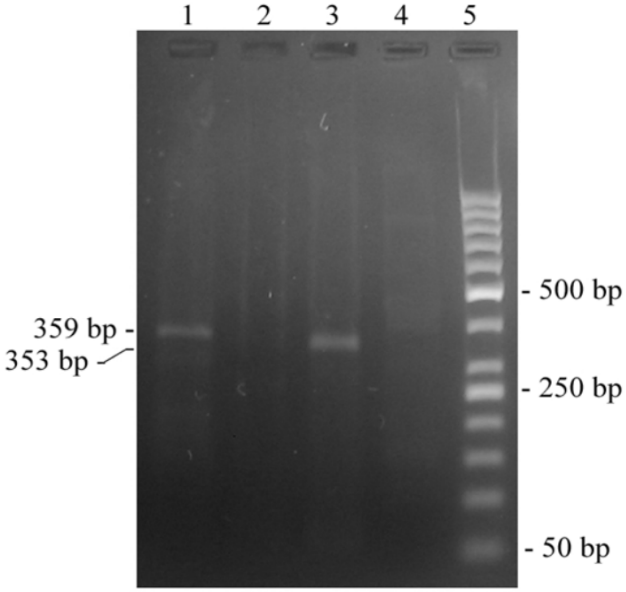


Рисунок — Электрофоретический анализ продуктов амплификации на матрице РНК, выделенной из клеток человеческой лимфомы линий IM-9 и Namalva. Дорожки: 1 — результат амплификации CH_2 домена иммуноглобулина человека класса G, полученного на матрице РНК со специфическими праймерами; 3 — результат амплификации CH_3 домена иммуноглобулина человека класса M, полученного на матрице РНК со специфическими праймерами; 5 — ДНК- маркер GeneRuler 50 b.p. DNA Ladder (Fermentas)

Экспрессированными белками планируется иммунизировать лабораторных животных для получения антивидовых (античеловеческих) иммуноглобулинов, специфичных к IgG и IgM человека и их мечения ферментами, либо флуоресцирующими препаратами.

Литература

1. Рабсон, А. Основы медицинской иммунологии / А. Рабсон, А. Ройт. — М.: Мир, 2006. — 320 с.
2. Назаренко, Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г.И. Назаренко, А. Кишкун. — М.: Медицина, 2000. — 533 с.
3. Способ получения флуоресцирующего антивидового конъюгата против IgG человека или животного для реакции непрямой иммунофлуоресценции: пат. 2240823 Росс. Федерации, МПК7 A 61 K 39/395, G 01 N 33/531 / О.А. Тимашева, С.А. Басалгина; заявитель ФГУП НПО по мед. иммунобиол. препаратам «Микроген» м-ва здравоохр. Росс. Федерации. — № 2002126372/15; заявл. 02.10.2002; опубл. 27.03.2004 // Изобрет. Полез. модели. — 2004. — № 33.
4. Nimmerjahn, F. Molecular and Cellular Mechanisms of Antibody Activity / F. Nimmerjahn. — Springer; Auflage, 2013.
5. Human and murine immunoglobulin expression vector cassettes / G.R. McLean [et al.] // Mol. Immunol. — 2000. — Vol. 37. — P. 837–845.
6. Extracellular production of human immunoglobulin epsilon-chain/gamma 1-chain chimeric Fc polypeptide by Escherichia coli / S. Nakamura [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1992. — Vol. 56, № 2. — P. 349–350.

OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF AMPLICONS ENCODING OF CH2 DOMAIN OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN G AND CH3 DOMAIN IMMUNOGLOBULIN M

Ustsinovich E.V., Fomina E.G., Scheslenok E.P., Semizhon P.A., Vladyko A.S.
Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

The amplicons, containing nucleotide sequences encoding the CH_2 domain of human immunoglobulin G, and CH_3 domain of human immunoglobulin M were obtain. The amplicons include the sequences complementary to the primers and the sites for restriction enzymes HindIII and XhoI, selected for insertion into the polylinker of the plasmid pJC40. The amplicons are used for cloning and preparation of expression vectors for the purpose of use of the recombinant polypeptides corresponding to the CH_2 domain of human immunoglobulin G, and CH_3 domain of human immunoglobulin M.

Keywords: amplicons, antispecies antibody, CH2 domain of human immunoglobulin G, CH3 domain of human immunoglobulin M.

Поступила 10.07.2014

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК-ГЕНОМА ВИРУСА ЛИМФОЦИТАРНОГО ХОРИОМЕНИНГИТА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Фомина Е.Г., Винокурова Н.В., Счеслёнок Е.П., Дубков Н.А., Владыко А.С.
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Беларусь;
ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России, Москва, Россия

Реферат. Целью исследований было изучение возможности использования «Тест-системы диагностической для выявления РНК-генома вируса лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ) методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии для тестирования иммунобиологических препаратов (вакцин), в производственном цикле которых использовался мозг лабораторных животных (мышей). В сравнительном эксперименте показано, что разработанная тест-система по своей специфичности и чувствительности не уступает предложенному в литературе Crotty S. методу постановки ПЦР с детекцией продуктов реакции в агарозном геле и может быть использована для тестирования вакцинных препаратов.

Ключевые слова: вирус лимфоцитарного хориоменингита, тест-система для выявления генетического материала вируса ЛХМ, иммунобиологические препараты.

Введение. Риск вирусной контаминации является общим для всех иммунобиологических препаратов, получаемых с использованием клеточных линий и продуктов животного происхождения [1]. Лабораторные животные — наиболее уязвимое звено биотехнологического производства, по-

скольку могут являться носителями широкого спектра вирусных инфекций. Многие из них протекают в латентной форме, и детектировать их можно только путем целенаправленного скрининга возбудителя. Перечень инфекционных агентов, рекомендованных для индикации у лабораторных грызунов, включает вирусы (в т. ч. вирус лимфоцитарного хориоменингита), потенциально опасные для человека и других приматов, а также возбудители зоонозных инфекций (для которых нет прямых доказательств инфицирования людей). Ранее было обнаружено, что внешне здоровые лабораторные мыши могут быть носителями вируса ЛХМ. В технологический процесс производства многих биологических препаратов (вакцин) включен этап культивирования вируса через мозг лабораторных мышей. В результате дополнительного искусственного инфицирования вакцинным штаммом вирусы, не вызывающие заболевания в обычных условиях, на фоне снижения резистентности организма повышают свою вирулентность и нередко становятся причиной гибели животного. В таких условиях определить этиологическую роль испытуемого вирусного агента и учесть результаты опыта невозможно. Именно поэтому одно из главных требований к лабораторным животным — отсутствие латентной инфекции. К латентным инфекциям мышей вирусного происхождения относятся: эктромелия, лимфоцитарный хориоменингит, вирусная пневмония, полиомиелит мышей, гепатит мышей, вирусный энтерит, лейкоз мышей и др. Следует отметить, что вирус ЛХМ способен вызывать латентную инфекцию не только у мышей, но и у морских свинок, хомяков и обезьян. Именно этот вирус занимает одно из первых мест в рейтинге рекомендаций по выявлению данного вирусного агента у лабораторных животных при производстве иммунобиологических препаратов [2].

Вирус лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ) является возбудителем одноименного инфекционного заболевания у людей, сопровождающегося преимущественным поражением мозговых оболочек и сосудистых сплетений центральной нервной системы. Клинически ЛХМ у людей протекает как гриппоподобное заболевание, иногда с картиной асептического менингита или менингоэнцефалита. Мыши и хомяки служат основным естественным резервуаром вируса, а также первичным хозяином, у которого инфекция, как правило, протекает бессимптомно.

Отсутствие высокочувствительных и специфичных тест-систем для выявления вирусов, способных вызывать латентные инфекции, приводит к тому, что в настоящее время производственный входной контроль лабораторных животных при получении из питомников на наличие латентных вирусных инфекций (в т. ч. ЛХМ) не проводится.

В РНПЦ эпидемиологии и микробиологии разработана «Тест-система для выявления РНК-генома вируса лимфоцитарного хориоменингита с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени». Целью совместного исследования ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России и РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Беларусь) являлось выявление генетического материала вируса ЛХМ в образцах инактивированных вакцин **и** полуфабрикатов, в процессе приготовления которых проводились серийные пассажи вакцинных штаммов через мозг беспородных белых мышей и в первичной культуре клеток.

Материалы и методы. Для исследования были отобраны образцы маточного и посевного материала вакцинного штамма вируса клещевого энцефалита, главного и рабочего посевного материала вакцинного штамма вируса бешенства, пассированных через мозг мышей, а также образцы вакцин клещевого энцефалита следующих серий: 371207; 210808; 030308.

Подготовку проб вакцин для определения содержания антигена вируса лимфоцитарного хориоменингита проводили в два этапа [3]. Для этого 1 мл исследуемой вакцины центрифугировали при комнатной температуре 5 мин в одноразовых пробирках (Eppendorf) при 6000 об./мин. Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку и анализировали в полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени (Real-time PCR) на полноту сорбции антигена. К осадку добавляли раствор А (содержит: 0,1% желатина; 0,4М натрия фосфорнокислого двузамещенного; 0,11% ЭДТА; 0,1% Твин 20) до конечного общего объема 1 мл. Полученный раствор тщательно перемешивали и оставляли на ночь при температуре +4ºС. Пробу центрифугировали 5 мин при комнатной температуре при 6000 об./мин. Надосадочную жидкость исследовали в ПЦР для определения антигена вируса лимфоцитарного хориоменингита.

Для выделения РНК из биологических проб использовали набор «РИБОпреп» производства «AmpliSens» (РФ) в соответствии с инструкцией по применению. Генетический материал выделяли из 100 мкл каждого образца. В каждую исследуемую пробу добавляли внутренний контроль об-

разца (ВКО) (10 мкл) для контроля выделения генетического материала, процессов обратной транскрипции и постановки ПЦР.

Выявление РНК вируса лимфоцитарного хориоменингита в пробах проводили с использованием тест-системы производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии «Тест-система диагностическая для выявления генома вируса лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ) методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени «Белар-ЛХМ-ПЦР/РВ» по описанной в Инструкции по применению схеме.

Результаты и их обсуждение. Данное исследование проводилось совместно с НПО «Микроген» с целью определения (наличия/отсутствия) РНК-генома вируса лимфоцитарного хориоменингита в образцах вакцинных вирусных штаммов и инактивированных вакцин производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, в технологическом цикле которых используется мозг лабораторных мышей.

Разработанная в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии диагностическая тест-система для выявления генома вируса ЛХМ потенциально может быть использована в трансплантологии, а также для верификации случаев вирусной этиологии (ЛХМ) при нейроинфекциях и выявления случаев врожденного ЛХМ. Интересным представляется еще один аспект применения данной тест-системы: для детекции вируса в вакцинных препаратах, что значительно расширяет область ее применения.

Основой диагностической тест-системы являются специфические олигонуклеотиды (праймеры) и гибридизационная проба, комплементарные нуклеотидной последовательности генома вируса ЛХМ в 3´-нетранслируемой области S-сегмента и фланкирующие фрагменты генома размером 156 нуклеотидных оснований. Разработанная тест-система укомплектована внутренним контролем образца (ВКО), который вносится в каждый исследуемый образец (10 мкл) до начала процедуры выделения РНК из клинических образцов для контроля этапов выделения генетического материала, процессов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией продуктов в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу ROX для регистрации накопления продуктов амплификации фрагментов ДНК вируса ЛХМ и по каналу FAM для регистрации продукта амплификации ДНК ВКО.

Результаты исследований представлены на рисунке 1.

А Б

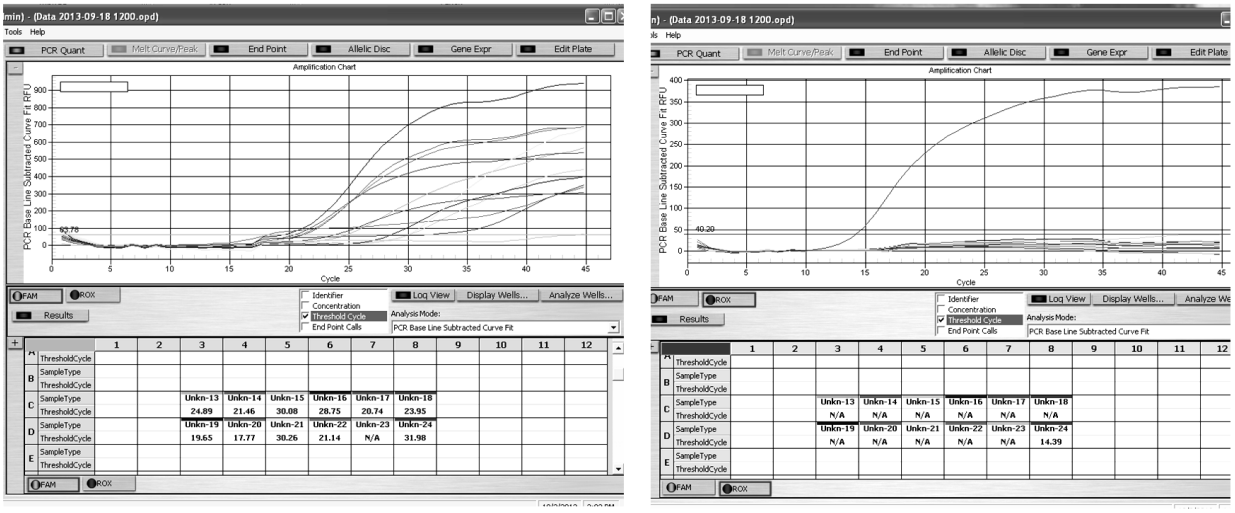


Рисунок 1 — Результаты амплификации генетического материала, выделенного из проб вакцинных штаммов вирусов, с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени: А — по каналу FAM; Б — по каналу ROX (пропись проб: Unkn 13–22, зашифрованные образцы маточного и посевного материалов вакцинных штаммов вируса клещевого энцефалита, главного и рабочего посевного материала вакцинного штамма вируса бешенства; Unkn 23 — отрицательный контрольный образец, не включающий ВКО; Unkn 24 — положительный контрольный образец, включающий ВКО)

Как видно из представленных результатов, во всех пробах (Unkn 13–22, 24) кроме отрицательного контроля (Unkn 23) по каналу FAM (рисунок 1А) детектируется наличие сигмовидных кривых, которые пересекают пороговую линию и указывают на то, что в исследуемых пробах этапы выделения генетического материала, процессы обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции прошли успешно. Несмотря на то, что в каждую пробу было внесено одинаковое количество внутреннего контроля образца (10 мкл, что соответствует 250 копиям РНК в конечном объеме реакции), уровень флуоресцентного сигнала варьирует от 900 до 300 единиц флуоресценции. Разброс уровня флуоресценции может быть объяснен наличием ингибирующих реакцию агентов в образцах. Тем не менее, все исследуемые пробы, кроме отрицательного контроля, дали четко детектируемый сигнал наличия генетического материала ВКО.

Анализ сигнала флуоресценции по каналу ROX (определение наличия /отсутствия РНК-генома вируса ЛХМ) показал, что только образец положительного контроля пересекает пороговую линию на 14-м цикле амплификации, во всех остальных пробах уровень флуоресценции ниже порогового. Полученные данные указывают на то, что в исследуемых образцах не содержится РНК вируса лимфоцитарного хориоменингита. Таким образом, образцы маточного, посевного и рабочего материалов штаммового запаса вирусов клещевого энцефалита и бешенства, которые пассировались через мозг, не контаминированы вирусом ЛХМ.

Дополнительно были проведены исследования на наличие генома вируса ЛХМ в образцах вакцин клещевого энцефалита следующих серий: 371207, 210808, 030308 (рисунок 2).

А Б

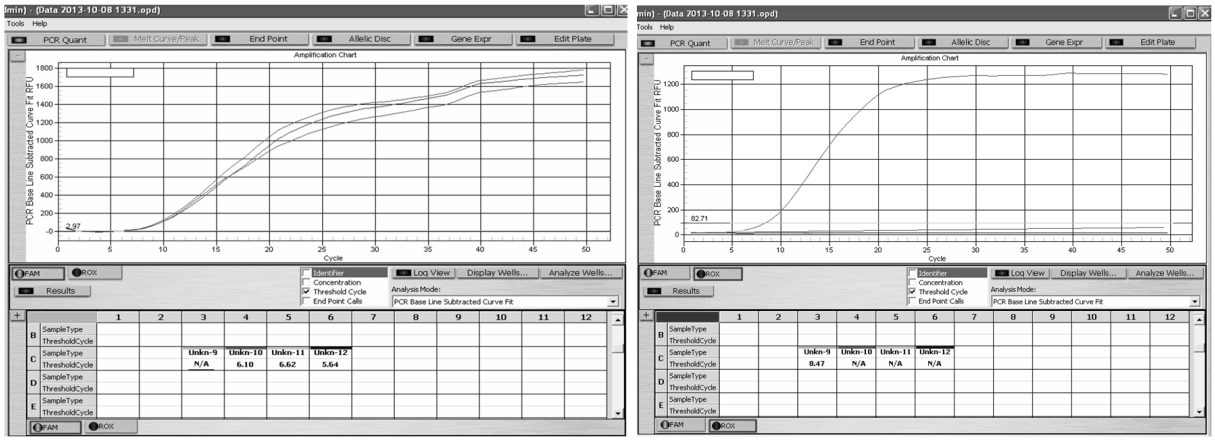


Рисунок 2 — Результаты амплификации генетического материала, выделенного из проб вакцин клещевого энцефалита, с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени: А — по каналу FAM; Б — по каналу ROX (пропись проб: Unkn 9 — положительный контроль, не содержащий ВКО; Unkn 10 — вакцина серии 371207; Unkn 11 — вакцина серии 210808; Unkn 12 — вакцина серии 030308)

Как видно из представленных материалов, исследуемые пробы не содержат генетического материала вируса ЛХМ. Во всех пробах, кроме отрицательного контроля (рисунок 2А), четко детектируется сигнал по каналу FAM, не превышающий граничного значения Ct, что указывает на амплификацию генетического материала ВКО в пробах (контроль этапа выделения РНК, процессов обратной транскрипции и ПЦР).

Уровень флуоресцентного сигнала по каналу ROX (рисунок 2Б) ниже пороговой линии для всех проб, кроме положительного контроля.

В связи с тем, что коммерческие тест-системы для выявления генома вируса ЛХМ в мире не разработаны и не производятся, а существуют лишь описания методов определения генома вируса на основе полимеразной цепной реакции, оценку наличия генетического материала вируса ЛХМ проводили в сравнительном аспекте: по выявлению генома вируса ЛХМ в биопробах вакцин с использованием разработанной тест-системы и методом ПЦР с парой праймеров, рекомендованных в литературе [4]. Такие исследования позволяют не только оценить специфичность подобранной пары праймеров и гибридизационной пробы, но и выявить наличие неспецифических перекрестных ре-

акций при исследовании биологических образцов. Crotty S. с соавторами рекомендует использовать оптимизированную пару праймеров, комплементарную нуклеотидной последовательности, кодирующей поверхностный гликопротеин (GP) [4]. Праймеры имеют следующий состав нуклеотидов: GP-R (S pos. 970–991) GCAACTGCTGTGTTCCCGAAAC; GP-F (S pos. 877–901) CATTCACCTGGA CTTTGTCAGACTC.

На рисунке 3 представлены репрезентативные данные по выявлению генома вируса ЛХМ в вакцинных препаратах с использованием пары праймеров, входящих в состав разработанной тест-системы, с праймерами, рекомендованными в литературе, с детекцией продуктов реакции в агарозном геле. В качестве биологических проб в данном эксперименте были использованы 13 проб вакцинных препаратов, описанных в экспериментах, представленных на рисунках 1 и 2. Пробы ДНК, исследованные в «режиме реального времени» (рисунок 1, 2), были параллельно нанесены на агарозный гель. Данные представлены на рисунке 3. Как видно из рисунка, в каждой из исследуемых проб выявляется специфическая полоса амплификации размером 97 п.н., соответствующая фрагменту нуклеотидной последовательности гена, кодирующего зеленый флуоресцирующий белок — *gfp* (внутренний контроль образца), что свидетельствует о том, что этап выделения РНК, а также реакции обратной транскрипции и ПЦР прошли успешно. В контрольном положительном образце (дорожка 1) дополнительно имеется специфический фрагмент, размером 156 нуклеотидных пар, соответствующий диагностируемому фрагменту генома вируса ЛХМ. Тем не менее, специфической полосы амплификации в пробах РНК, выделенных из вакцинных проб, выявлено не было. Таким образом, исследуемые с использованием разработанной тест-системы пробы (образцы вакцин) не содержат генетический материал вируса лимфоцитарного хориоменингита.

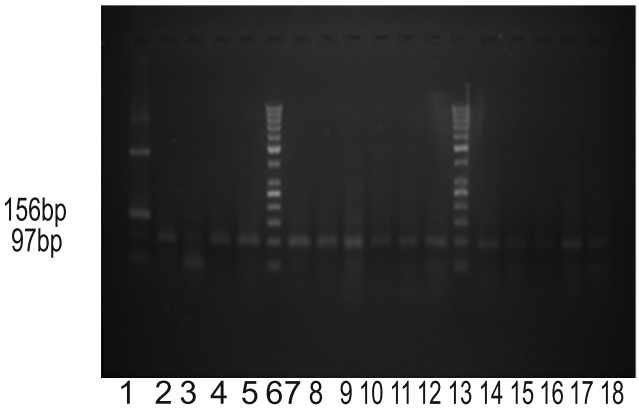


Рисунок 3 — Электрофореграмма амплифицированных фрагментов вируса ЛХМ с использованием разработанной тест-системы. Дорожки: 1 — положительный контроль амплификации — ОТ ПЦР РНК, выделенная из штамма Armstrong, депонированного в специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека; 6, 13 — маркер молекулярных масс (Ladder 50 bp, Thermo scientific); 2–12 — пробы ОТ ПЦР РНК, выделенной из маточного и посевного материалов вакцинных штаммов вируса клещевого энцефалита, главного и рабочего посевного материала вакцинного штамма вируса бешенства; 14, 15, 17 — пробы ОТ ПЦР РНК, выделенной из вакцин серии 371207; 210808; 030308 соответственно); 16, 18 — пробы отрицательного контроля, содержащие ВКО

Помимо этого все пробы были параллельно амплифицированы с парой праймеров, рекомендованных в литературе. Результаты, полученные после проведения гель-электрофореза исследуемых проб, представлены на рисунке 4.

Как показали исследования, после амплификации генетического материала, выделенного из вакцинных препаратов с использованием пары праймеров, рекомендованных Crotty S. с соавторами, геном вируса ЛХМ не обнаружен. Специфическая полоса амплификации 114 пар нуклеотидов присутствует только в пробе положительного контроля (дорожка 1).

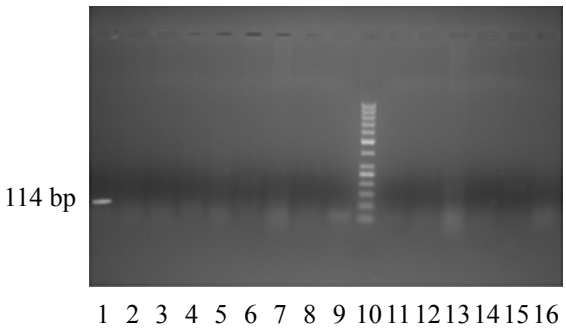


Рисунок 4 — Электрофореграмма амплифицированных фрагментов вируса ЛХМ с использованием пары праймеров, рекомендованных в литературе. Дорожки: 1 — положительный контроль амплификации; 10 — маркер молекулярных масс (Ladder 50 bp, Thermo scientific); 2–12 — пробы ОТ ПЦР РНК, выделенной из маточного и посевного материалов вакцинных штаммов вируса клещевого энцефалита, главного и рабочего посевного материала вакцинного штамма вируса бешенства; 13, 14, 15 — пробы ОТ ПЦР РНК, выделенной из вакцин серии 371207, 210808, 030308 соответственно); 16 — отрицательный контроль амплификации

Полученные результаты полностью совпадают с данными, представленными на рисунках 1–3 по амплификации этих же проб с использованием разработанной тест-системы для выявления генома вируса ЛХМ с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени с одновременным контролем проб с помощью гель-электрофореза.

Заключение. Определение генетического материала вирусных агентов, способных вызывать латентные инфекции у лабораторных животных, представляется важной задачей при производстве иммунобиологических препаратов. Одним из шагов к решению этой задачи является создание тест-систем, а также разработка современных методов, которые позволили бы с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять эти инфекционные агенты. В РНПЦ эпидемиологии и микробиологии разработана тест-система для выявления генома вируса лимфоцитарного хориоменингита методом ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени. Как показали исследования, тест-система способна с высокой специфичностью и чувствительностью выявлять генетический материал вируса ЛХМ. Эти исследования позволяют расширить сферу применения разработанной тест-системы. Помимо использования тест-системы для лабораторного подтверждения диагноза «вирусный лимфоцитарный хориоменингит» и анализа эпидемиологической ситуации по ЛХМ в потенциальных природных очагах, она может быть использована для тестирования иммунобиологических препаратов (вакцин), в производственном цикле которых используется мозг лабораторных мышей.

Литература

1. Каркищенко, Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. — М.: Профиль, 2010. — 358 с.
2. Note for guidance on quality of biotechnological products: viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin EMEA. — London, 1997.
3. Физико-химическая и иммунологическая характеристика вакцины «Геп-а-инвак» при различных условиях хранения / Ю.Л. Андреев [др.] // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2008. — С. 26–28.
4. McCausland, M.M. Quantitative PCR technique for detecting lymphocytic choriomeningitis virus *in vivo* / M.M. McCausland, S. Crotty // J. Virol Methods. — 2008. — Vol. 147, № 1. — P. 167–176.

USING «REAL-TIME PCR KIT FOR THE DETECTION OF LIMPHOCYTIC CHORIOMENINGITIS VIRUS (LCMV) RNA GENOME» FOR TESTING OF IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS

Fomina E.G., Vinokurova N.V., Scheslenok E.P., Dubkov N.A., Vladyko A.S.
Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;
«Microgen» Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

The aim of the research was to investigate the possibility of using the "Real-time PCR kit for the detection of LCMV RNA genome" manufactured in the Republican Research and Practical Center for

Epidemiology and Microbiology for testing of immunobiological preparations (vaccines). The comparative experiment demonstrated that the test system can be used for testing vaccine preparations.

Keywords: lymphocytic choriomeningitis virus, a test system for the detection of LCMV RNA genome, immunobiological preparations.

Поступила 12.07.2014

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА БИОПЛЕНОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО В ПОСТЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПЕРИОД

Харсеева Г.Г.[1], Фролова Я.Н.[1], Герасимов В.Н.[2], Гасретова Т.Д.[2]

[1]Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону;
[2]Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Московская обл., Серпуховский р-н, Оболенск, Россия

Реферат. Показано, что возбудитель дифтерии обладает способностью к биопленкообразованию, что сопровождается образованием экзополисахаридного матрикса. При этом происходит изменение морфологических (уменьшение размеров бактерий), культуральных (уменьшение размеров колоний, R-S-диссоциация) свойств и антибиотикочувствительности. Наиболее эффективными в отношении возбудителя дифтерийной инфекции являются цефотаксим, гентамицин, линкомицин, канамицин и цефазолин, к которым чувствительность *Corynebacterium diphtheriae* в составе биопленки не изменяется.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae* tox+, биопленка, антибиотикочувствительность.

Введение. Микробные биопленки ответственны за этиологию и патогенез многих острых и особенно хронических бактериальных инфекций человека [1–3]. К инфекционным заболеваниям, этиологическими агентами которых являются микроорганизмы в составе биопленки, наряду с тонзиллитами, бронхитами, пневмониями [3, 4] относят и дифтерию [5, 6].

В течение всего времени существования полимикробные фиксированные сообщества микроорганизмов синтезируют полимерный матрикс, состоящий из экзополисахарида [7]. Внедренные в матрикс микроорганизмы изменяют свои биологические свойства, что в значительной степени защищает их от действия факторов врожденного иммунитета, клеточных и гуморальных факторов адаптивного иммунитета [2, 4]. Исследование способности возбудителя дифтерии формировать биопленку приобретает в настоящее время особую актуальность в связи с продолжающейся циркуляцией штаммов токсигенных *Corynebacterium diphtheriae* среди бактерионосителей в постэпидемический период [5, 8].

Цель работы — изучение основных свойств биопленочной культуры циркулирующего в постэпидемический период токсигенного штамма *C. diphtheriae*.

Материалы и методы. Объектом для исследования послужил циркулирующий штамм *C. diphtheriae* gravis tox+, выделенный в 2000 г. от больного с диагнозом «локализованная форма дифтерии» бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» г. Ростова-на-Дону.

Тестирование штамма на способность формировать биопленку проводили по методике P.L. Watnick et al. [9]. Для исследования использовали 720-часовую биопленочную культуру *Corynebacterium diphtheriae* gravis tox+.

Морфологические, культуральные, биохимические, токсигенные свойства типовой и биопленочной культур циркулирующего штамма *C. diphtheriae* tox+ определяли через 48 ч культивирования в соответствии с рекомендациями [10].

При проведении сканирующей электронной микроскопии приготовление препарата биопленочной культуры токсигенного циркулирующего штамма *C. diphtheriae* gravis tox+, адгезированного к подложке, подвергали химической фиксации. Затем фиксированные образцы биопленки помещали на предметный столик сканирующего электронного микроскопа и напыляли золотом в напылительной вакуумной установке EicoIB-3 ion coater («Eico», Япония) при ионном токе 6–8 мА. Полученный препарат биопленочной культуры циркулирующего штамма исследовали в сканирующем электронном микроскопе S-450 («Hitachi», Япония) при ускоряющем напряжении 30кВ.

Чувствительность к антибактериальным препаратам токсигенной биопленочной культуры штамма возбудителя дифтерии определяли методом серийных разведений (микрометодом) в жидкой питательной среде согласно методическим указаниям [11].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических пакетов «Microsoft Office 2007» и «Statistica 6.0» для Windows XP. Достоверность полученных данных оценивали при уровне значимости $P \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Экспериментальная модель биопленки циркулирующего токсигенного штамма *C. diphtheriae* gravis tox+ позволила оценить изменение биологических свойств его типовой культуры. В качестве основных параметров при сравнении типовой и биопленочной культур дифтерийных бактерий послужили морфология бактерий, характер выросших колоний, способность к расщеплению сахаров, токсигенность и чувствительность к действию антибактериальных препаратов.

При использовании сканирующей электронной микроскопии (рисунок) были получены изображения, отражающие особенности морфологии биопленочной культуры дифтерийных бактерий. Образованная возбудителем дифтерии биопленка представляла собой погруженный в экзополисахаридный матрикс конгломерат клеток, который варьировал по плотности, создавая открытые области, являющиеся, вероятно, водными каналами. Экзополисахарид имел вид множества слизистых, соединяющихся между собой «тяжей паутины», которые покрывали микробные клетки общим слоем.

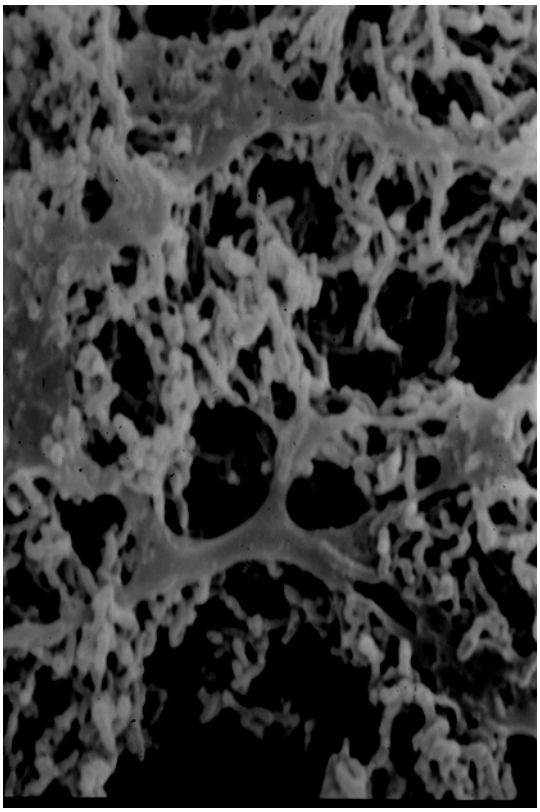


Рисунок — Сканирующая электронная микроскопия фрагмента биопленочной культуры штамма *C. diphtheriae* gravis tox+ (циркулирующий) при культивировании в течение 720 ч. Ув. х4000

Типовая и биопленочная культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae* отличались по морфологическим свойствам (рисунок). Известно, что размеры микробных клеток типовой культуры *C. diphtheriae* варьируют по ширине в пределах 0,3–0,8 мкм, по длине — 1,5–8,0 мкм [5]. У биопленочной культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae* gravis tox+ на 720 ч культивирования ширина микробных клеток находилась в тех же пределах (0,4±0,001 мкм), а длина уменьшилась ($P \leq 0,05$) до значений 1,3±0,05 мкм (таблица).

Таблица — Свойства типовой и биопленочной культур циркулирующего штамма *C. diphtheriae* gravis tox+

Биологические свойства	Типовая культура *C. diphtheriae* gravis tox+ (мкм)	Биопленочная культура циркулирующего штамма *C. diphtheria* gravis tox+ (мкм)
Морфология (ширина × длина клеток, мкм)	0,3–0,8 × 1,5–8,0	0,4±0,001 × 1,3±0,05
Культуральные свойства: размер колоний, мм	3–4	2–4
Форма колоний	Округлая	Округлая
Цвет колоний	Молочный (КА), черный (КТА)	Молочный (КА), черный (КТА)
Характер поверхности	Выпуклая, шероховатая, блестящая	Выпуклая, гладкая, матовая
Характер края	Бахромчатый	Волнистый
Консистенция	Крошащаяся	Сметанообразная
Ферментативные свойства:		
глюкоза	+	+
мальтоза	+	+
сахарозы	–	–
крахмала	+	+
Редуцирование нитратов:	+	+
уреаза	–	–
цистиназа	+	+
Токсигенность	+	+
Чувствительность к антибиотикам (МПК: M±m): ванкомицин	1,3±0,3	1,7±0,6
цефотаксим	7,8±1,0	6,2±0,7
анаэроцеф	0,5±0,04	0,3±0,04*
гентамицин	1,0±0,7	1,8±0,6
цефтриаксон	4,5±1,0	9,0±1,2*
линкомицин	6,1±0,9	7,7±1,3
канамицин	1,0±0,2	1,8±0,6
цефазолин	1,0±0,2	1,1±0,3
бензилпенициллин	0,4±0,05	4,1±1,0*

Примечание — *Достоверные отличия (P≤0,05) между МПК типовой и бипленочной культурами циркулирующего штамма *C. diphtheriae* gravis tox+.

При сравнительном исследовании культуральных свойств обнаружили, что размеры колоний биопленочной культуры были меньше (2–4 мм), чем типовой (3–4 мм). При этом колонии типовой культуры *C. diphtheriae* имели выпуклую, шероховатую, блестящую поверхность с зернистой, легко крошащейся структурой, а колонии биопленочной культуры обладали гладкой, матовой поверхностью и сметанообразной консистенцией.

При изучении биохимических свойств различий между типовой и биопленочной культурами коринебактерий обнаружено не было.

При определении чувствительности к антибиотикам, рекомендованным для лечения дифтерии [8] циркулирующего токсигенного штамма *C. diphtheriae* gravis установили, что его типовая культура была чувствительна ко всем перечисленным препаратам, МПК которых варьировала в пределах от 0,4±0,05 до 7,8±1,0мкг/мл. При исследовании антибиотикочувствительности 720-часовой биопленочной культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae* gravis было отмечено понижение чувствительности (P≤0,05) по отношению к цефтриаксону, МПК которого составила 9,0±1,2 мкг/мл и бензилпенициллину (4,1±1,0 мкг/мл). В отношении анаэроцефа (цефокситина) наблюдалась обратная зависимость: у 720-часовой биопленочной культуры циркулирующего штамма чувствитель-

ность к анаэроцефу была выше ($p \leq 0,05$), чем у типовой культуры этого же штамма (МПК составила 0,3±0,04 и 0,5±0,04 мкг/мл соответственно).

Установлено, что возбудитель дифтерии обладает способностью к биопленкообразованию. Как известно, процесс формирования биопленки сопровождается образованием экзополисахаридного матрикса — продукта жизнедеятельности самих микробных клеток [2, 12]. При формировании экзополисахарида микробными клетками циркулирующего штамма *C. diphtheriae* gravis tox+ отмечали изменение их размеров и пространственной организации. При максимальном содержании экзополисахарида, которое приходилось на 720 ч культивирования, наблюдали уменьшение размеров клеток коринебактерий. Электронно-сканирующая микроскопия показала, что бактериальные клетки циркулирующего штамма *C. diphtheriae* в составе биопленки представляли собой палочки с хорошо видными зернами волютина, располагавшиеся хаотично и собранные в плотно сцепленные кластеры, между которыми находилось свободное пространство, формирующее, вероятно, водные каналы. Экзополисахаридный матрикс в виде «тяжей паутины» покрывал микробные клетки общим слоем. Выявленные морфологические особенности бактериальных биопленок возбудителя дифтерии, вероятно, связаны с тем, что клетки в составе биопленки растут значительно медленнее, чем планктонные, в результате чего происходит замедление метаболических процессов, приводящее к диссоциации R-формы колоний в S-форму, за счет чего биопленки оказываются более стабильными, чем планктонные формы клеток [6, 13]. Такие состояния бактерий могут запускать механизмы адаптации, а именно устойчивости к антибиотикам [14].

Установлено, что понижение антибиотикочувствительности циркулирующего штамма *C. diphtheriae* связанно с его способностью формировать в организме микробную биопленку. Биопленки имеют гетерогенный экзополисахаридный матрикс, который не только образует единую структуру, но и заполняет межклеточные пространства, образуя трехмерную фильтрующую систему [3]. В результате биопленки экранируют пепдидогликан и угнетают доставку антибактериальных препаратов к бактериальным клеткам. Использованные нами антибактериальные препараты обладают способностью полностью или частично нарушать синтез как пептидогликана (цефазолин, цефатоксим, бензилпенициллин), так и ингибируют фермент транспептидазу, участвующую в биосинтезе мукопептида клеточной стенки (ванкомицин, цефтриаксон, анаэроцеф). Вследствие этого МПК антибиотика повышается, а чувствительность биопленочной культуры снижается [6]. Вероятное использование данных антимикробных препаратов при лечении дифтерийной инфекции может привести к формированию антибиотикорезистентных культур бактерий, входящих с состав биопленки *C. diphtheriae*. При этом создаются условиях для длительной персистенции возбудителя дифтерии в организме бактерионосителей, что осложняет антибиотикотерапию.

Выводы:

1. Возбудитель дифтерии обладает способностью к образованию биопленки, что повышает его способность к колонизации эпителия верхних дыхательных путей, защиту от воздействия факторов иммунной системы и, как следствие, персистенцию в организме.

2. При длительном сроке культивирования (720 ч) у циркулирующего штамма *C. diphtheriae* gravis tox происходит изменение морфологических и культуральных свойств.

3. Наиболее эффективными в отношении возбудителя дифтерийной инфекции являются такие антибактериальные препараты, как цефотаксим, гентамицин, линкомицин, канамицин и цефазолин, к которым чувствительность *C. diphtheriae* в составе биопленки не изменяется.

Литература

1. Black, C.E. Current concepts regarding the effect of wound microbi-al ecology and biofilms on wound healing / C.E. Black, J.W. Costerton // Surg. Clin. North Am. — 2010. — Vol. 90. — P. 1147–1116.

2. Hall-Stoodley, L. Envolving conceptsin biofilm infections / L. Hall-Stoodley // Cell Microbiol. — 2009. — Vol. 11, № 7. — P. 1034–1043.

3. Costerton, J.W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // Sci. — 1999. — Vol. 284. — P. 1318–1322.

4. Froeliger, E.H. Streptococcus parasanguis fimbria-associated adhesinfapl is required for biofilm formation / E.H. Froeliger, P. Fives-Taylor // Infect. Immun. — 2001. — Vol. 69, № 4. — P. 2512–2519.

5. Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты / под ред. Г.Г. Харсеевой. — М.: Практическаямедицина, 2014. — 241 с.

6. Способность к формированию биопленки возбудителем дифтерии / Г.Г. Харсеева [и др.] // Клин. лаб. диагностика. — 2013. — № 3. — С. 36–38.

7. Molecular basis of bacterial adhesion / M. El-Azizi [et al.] // Ann Clin. Microbiol. Antimicrob. — 2005. — № 7. — P. 29–41.
8. Иванова, В.В. Бактерионосительство токсигенных коринебактерий дифтерии на эпидемическом спаде заболеваемости дифтерией / В.В. Иванова, О.В. Родионова, Т.Б. Корженевская // Росс. мед. журн. — 2003. — № 5. — С. 38–41.
9. Watnick, P. Biofilm, city of microbes / P. Watnick, R. Kolter // J. Bacteriol. — 2000. — Vol. 182, № 10. — P. 2675–2679.
10. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции. — М.: Информ.-издат. центр Госкомсанэпиднадзора, 2013. — 106 с.
11. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: МУ 4.2.1890-04. — М., 2004. — 91 с.
12. Lewis, K. Multidrug tolerance of biofilms and persistercells / K. Lewis. — Heidelberg: Springer Verlag, 2008. — 322 p.
13. Генетическая паспортизация и изучение способности к формированию биопленок лактобациллами, выделенными из полости рта здоровых людей / Ю.В. Червинец [и др.] // Клин. лаб. диагностика. — 2011. — № 2. — С. 44–46.
14. Cook, G. Direct confocal microscopy studies of the bacterial colonization in vitro of a silver-coated heart valve sewing cuff / G. Cook, J.W. Costerton, R.O. Darouiche // Int. J. Antimicrob. Agents. — 2000. — Vol. 13, № 3. — P. 169–173.

THE MAIN PROPERTIES OF BIOFILM CULTURE OF THE CAUSATIVE AGENT OF DIPHTHERIA CIRCULATING DURING THE POST-EPIDEMIC PERIOD

Kharseeva G.G.[1], Frolova Ya.N.[1], Gerasimov V.N.[2], GasretovaT.D.[2]
[1]Rostovsky State Medical University of the Ministry of Health, Rostov-on-Don;
[2]State Scientific Center of Applied Microbiology & Biotechnology, Obolensk, Russia

Task — studying the main properties of biofilm culture of *C. diphtheriae* toxigenic strain circulated in post epidemic period. It was revealed that causative agent of diphtheria has the ability to biofilm formation that accompanied with exopolysaccharide matrix formation. Simultaneously it lead to changes of morphologic (decreasing of bacteria in size), cultural (decreasing in size of colonies, R-S-dissociation) properties and antibiotic susceptibility. The most effective towards to Diphtheriae causative agent are cefotaxime, gentamycin, linkomycin, kanamycin and cefazolin, because they have no changes in susceptivity of *C. diphtheriae* in the biofilm structure.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*, biofilm, biological properties, sensitivity to antibiotics.

Поступила 18.06.2014

ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ВИРУС БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА: ОСОБЕННОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ У ЖИВОТНЫХ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Хмара М.Е., Гудков В.Г.
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. В данной статье представлены собственные экспериментальные данные о противоопухолевой активности вируса болезни Ньюкасла (ВБН) у белых мышей с аденокарциномой молочной железы (опухоль Эрлиха) и результаты клинической практики (по литературным источникам), полученные при неоадъювантной терапии рака молочной железы, предшествующей хирургическому удалению опухоли.

Ключевые слова: вирус болезни Ньюкасла (ВБН), аденокарцинома молочной железы мышей (опухоль Эрлиха), неоадъювантная терапия.

Введение. В настоящее время в научно-инновационной лаборатории ГУ РНПЦ эпидемиологии и микробиологии проводятся исследования по разработке противоопухолевого средства на основе продуктов культивирования онколитического вируса болезни Ньюкасла с целью подавления роста аденокарциномы молочной железы у экспериментальных животных. Актуальность и необходимость интенсификации исследований по терапии указанного типа злокачественных новообразований определяется высокой частотой этой патологии в клинической практике. Так, по данным канцер-регистра ГУ РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, опубликованном в 2011 г., рак молочной железы среди женщин Беларуси, как и многих других стран, является актуальной медико-социальной проблемой, составляя по стандартизованному показателю заболеваемости 2010 г. 46,6 на 100 тыс. женского населения, что сравнимо с наиболее высоким показателем заболеваемости раком легкого (63,1 на 100 тыс.).

Концепция терапии опухолей репродуцирующимися вирусами появилась в начале XX столетия, когда было замечено, что у пациентов с различными онкологическими заболеваниями имеет место спонтанная регрессия опухолей после вакцинации против бешенства или после перенесенных вирусных инфекций. Термин «онколитические вирусы» был введен для вирусов, которые в ходе своей репликации могут прямым или непрямым способом избирательно убивать раковые клетки. Как со временем выяснилось, это свойство присуще многим вирусам, однако имевшая место первичная регрессия опухолей завершалась, и вскоре заболевание снова прогрессировало [1]. Общим недостатком прямого онколиза являлась непродолжительность действия, требующая повторных введений массивных доз инфекционных вирусов. Поэтому их использование в лечении онкологических заболеваний развивалось далее в направлении применения вирусных онколизатов. Основная задача такой терапии — повышение иммуногенности опухолевых клеток, культивируемых *in vitro*. Известно, что опухолевые клетки пациента, полученные при операции или биопсии, широко используются в мировой онкологической практике для создания иммунотерапевтических препаратов вследствие их вирусной модификации [2]. Последний подход рассматривается в качестве наиболее технологичного при применении вируса, селективно заражающего опухолевые клетки. Таковым является вирус болезни Ньюкасла (ВБН), штамм МТН-68/ Н, апатогенный для млекопитающих, противоопухолевые свойства которого при раке молочной железы были показаны в ряде англоязычных публикаций [3, 4]. Авторами было показано, что этот вирус в опухолевых клетках человека размножается в 10000 раз лучше, чем в нормальных клетках [2, 5]. Проведенные к настоящему времени исследования демонстрируют, что опухолевые клетки зараженные вирусом, могут быть уничтожены непосредственно этим патогенном или косвенно через активацию иммунной системы, включая атаку цитотоксическими клетками (киллеры и цитотоксические Т-лимфоциты), выработку антител и цитокинов. Структура ВБН и особенности его репликации подробно изложены в ряде руководств по вирусологии [6, 7]. На наш взгляд, особы интерес представляют данные о способности ВБН вызывать апоптоз, т. е. гибель раковых клеток без разрушения плазматической мембраны. Впервые такой тип гибели наблюдали при инфицировании ВБН куриных эмбрионов, связывая это с активацией протеолитических ферментов (каспаз 8,9 и 12 типов), а также с так называемым эндоплазматическим ретикулярным стрессом, обеспечивающим целостность клеточной мембраны [8–14]. Все это приводило к противоопухолевому иммунному ответу, благодаря презентации вирусных гликопротеидов, экспрессируемыми на поверхности опухолевых клеток, регуляторному влиянию главного комплекса гистосовместимости и клеточной адгезии молекул, которые активировали опухоль — специфические лимфоциты и макрофаги [15].

Цель работы — изучение влияния вируссодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ) и культурального вируса, пассируемого на первично-трипсинизированных фибробластах эмбриона кур, на выживаемость животных при их однократном (совместном) внутрибрюшинном введении с опухолью Эрлиха, а также влияние культурального вируса, вводимого мышам трехкратно через 4 дня после внутрибрюшинного введения опухоли.

Материалы и методы. Использовали белых мышей весом 19–20 г, на которых путем внутрибрюшинного введения перевивали опухоль Эрлиха в объеме 0,2 мл. ВБН культивировали на 9–10-дневных куриных эмбрионах, а также на фибробластах эмбриона кур. Титр вируса и гемагглютинирующая активность составили соответственно 7,0 Lg $ТЦД_{50/0,1}$ и 1:256 ГАЕ.

Результаты и их обсуждение.

Таблица 1 — Влияние вируссодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ) и культурального вируса на выживаемость мышей с аденокарциомой молочной железы (опухоль Эрлиха)

Группы	Инфекционность и гемагглютинирующая активность ВБН в группах 1 и 2	Срок жизни животных, дни
ВАЖ оп. Эрлиха	7,0 Lg ТЦД 50/0,1 мл 1:256 ГАЕ	360^{x}
Культуральный вирус + оп. Эрлиха	7,0 Lg ТЦД 50/0,1 мл 1:256 ГАЕ	17

Примечание — Х — срок наблюдения.

В приведенных выше данных опухолевые клетки выдерживали в термостате с вируссодержащей аллантоисной жидкостью или суспензией культурального вируса в течение 1 ч, а затем вводили животным внутрибрюшинно. Как видно, при использовании культурального вируса животные погибли через 17 дней, тогда как в случае вируссодержащей аллантоисной жидкости животные прожили 360 дней (срок наблюдения). Необходимо отметить, что как инфекционная, так и гемагглютинирующая активность используемого ВБН была одинаковой. Поэтому, учитывая ранее приводимые литературные данные [8, 9, 15], можно предположить, что в первой группе под влиянием ВБН и эмбриональных протеолитических белков (каспаз) имело место образование раковых клеток в состоянии апоптоза. Это стимулировало адекватный иммунологический ответ, определивший выживание животных.

В таблице 2 представлены данные о влиянии культурального вируса на выживаемых животных при его многократном внутрибрюшном введении, которое начинали через 4 дня после аналогичного введения опухолевых клеток и продолжали затем через каждые 3 дня.

Таблица 2 — Влияние культурального ВБН на продолжительность жизни животных

Группы	Продолжительность жизни, дни
Опухоль Эрлиха + ВБН	50 + 1,2
Опухоль Эрлиха + физ. р-р (контроль)	15 + 0,7
Достоверность различий	P<0,01

Как видно, продолжительность жизни животных при введении культурального ВБН была достоверно больше, чем в контроле. Однако такой выживаемости как при использовании эмбрионального ВБН, культивируемого предварительно с опухолевыми клетками *in vitro* (таблица 1, группа 1), т. е. при условиях, вызывающих апоптоз раковых клеток [8], получено не было. В соответствии с изложенным выше, находятся и наши данные, полученные ранее при изучении противоопухолевой активности ВБН в отношении аденокарциномы молочной железы, в зависимости от культивирования вируса в куриных эмбрионах или первично трипсинизированной культуре клеток [16, 17].

Если говорить о клинической практике, то использование ВБН при раке молочной железы проводится в основном в качестве неоадъювантной терапии, предшествующей оперативному удалению опухоли [2, 5, 18]. В англоязычной литературе имеется лишь единственное сообщение об использовании аналогичной вакцины, получаемой при культивировании ВБН с раковыми клетками *in vitro*, без последующего оперативного лечения [3]. Наблюдали отсутствие метастазирования, однако данные о сроке наблюдения свыше 5 лет, что позволяло бы судить о терапевтическом эффекте, отсутствуют.

Наиболее полная информация о неоадъювантной терапии рака молочной железы приводятся в исследованиях В.В. Кошелава и соавт., выполняемых в Российском научном центре рентгенорадиологии [2, 18].

Ниже представлены данные, полученные авторами [2] при терапии опухолей молочной железы с помощью ВБН (группа В) и аутологичной иммунотерапии клетками, модифицированными этим вирусом (группа А, таблица 3).

Таблица 3 — Результаты клинических исследований эффективности использования аутологичной вакцины (А) и ВБН (В) при раке молочной железы (цитата по [2])

Группы	К-во больных	ПО	ЧО	Ст	Пр
А	13	2	6	4	1
В	8	–	1	7	–

Примечания:
1 — ПО — полный ответ (исчезновение опухолевых узлов на срок не менее 4 недель).
2 — ЧО — частичный ответ (уменьшение измеряемых очагов на 30%).
3 — Ст — стабилизатор опухолевого процесса.
4 — Пр — прогрессирование.

Как видно, полный и частичный ответ, сопровождающийся исчезновением или уменьшением опухолевых узлов в группе А, составил около 60%. Это позволило авторам сделать заключение, что вакцины на основе опухолевых клеток, модифицированных ВБН, способны инициировать более выраженный специфический противоопухолевый ответ.

В последующем [18] были проведены исследования по изучению роли ВБН в неоадювантной терапии рака молочной железы у 84 больных, которые были распределены по трем группам: группа А — комбинированное применение ВБН и химиотерапии; группа В — монотерапия ВБН; группа С — химиотерапия по схеме, аналогичной группе А.

Таблица 4 — Уровень объективного ответа при использовании ВБН в монорежиме (группа В) и в сочетании с химиотерапией (группа А) (цитата по [18])

Объективный ответ	Группа А, % (абс.)	Группа В, % (абс.)	Группа C^x % (абс.), контроль
Полный ответ	7,2 (2)	–	–
Частичный ответ	42,9 (12)	–	35,7 (10)
Стабилизация	46,4 (13)	100 (28)	60,8 (17)
Прогрессирование	3,5 (1)	–	3,5 (1)
Всего (абс.)	28	28	28

Примечание — Х — только химиотерапия.

Как видно, полный ответ зафиксирован только в группе А (ВБН + химиотерапия). Здесь же у 25 больных отмечен частичный ответ или стабилизация процесса; 100% стабилизация отмечена только в группе В. При этом подчеркивается, что наличие признаков терапевтического патоморфоза в этой группе позволяет судить о специфической противоопухолевой активности ВБН.

Заключение. Анализ литературных и собственных данных позволяет сделать вывод о необходимости расширения исследований об онкологических свойствах ВБН при его взаимодействии с раковыми клетками. У этого вируса есть целый ряд положительных свойств по сравнению с другими, особенно ДНК-содержащими патогенами, многие из которых, например, папова-, гепадно-, адено-, герпес- и поксвирусы, сами по себе способны трансформировать клетки *in vitro* и вызывать образование злокачественных новообразований [19]. ВБН, как и вся группа парамиксовирусов, не обладает такими свойствами. Кроме того, важно, что этот вирус вызывает инфекционные заболевания только у птиц, тогда как у людей в случае инфицирования имеет место только конъюнктивит или трахеит, протекающие в легко форме и без осложнений. Проведенные серологические исследования показывают, что около 96% человеческой популяции серонегативны по отношению к ВБН, чего нельзя сказать о других вирусах, как кандидатах для использования в онколизе [20]. Кроме того, ВБН, как онколитический вирус, способен стимулировать иммунологические процессы, активируя синтез интерферона 1 типа, цитокинов, определяя при этом участие главного комплекса гистосовместимости, адгезию лимфоцитов и антиген-презентирующих клеток благодаря экспрессии вирусных гликопротеидов на поверхности малигнизированных клеток [21]. Считаем необходимым подчеркнуть способность ВБН вызывать не только цитолиз, но и апоптоз раковых клеток, что сопровождается сохранением их плазматической мембраны с фиксацией на ней вирусных белков и гликопротеидов, определяющих в конечном счете гетерогенизацию опухолевых клеток и стимуляцию специфического иммунологического ответа. В связи с этим использование ВБН для получения пула раковых клеток в состоянии апоптоза является предметом наших дальнейших исследований.

Литература

1. Donahue, J.M. Viral oncolysis / J.M. Donahue, J.T. Mullen, K.K. Tanabe // Surg. Oncol. Clin. N. Am. — 2002. — Vol. 11. — P. 661–680.

2. Неоадъювантная терапия рака молочной железы с применением онкологического вируса болезни Ньюкасла / В.В. Кошелава [и др.] // Вопр. онкологии. — 2009. — Т. 55, № 4. — С. 433–435.

3. Tumor-cell number and viability as qualiru and efficacy parameters of autologous virus- modified cancer vaccines with breast or ovarian cancer / T. Ahlert [et al.] // J. Clin. Oncol. — 1997. — Vol. 15, № 4. — P. 1354–1366.

4. Matthew, J.C. Neoadjuvant therapy for breast cancer / J.C. Matthew // ASCO Pros. — Vol. 208. — P. 55-57.

5. Pathologic features of breast cancer associated with complete response to neoadjuvant chemotherapy: importance of tumor necrosis / R.T. Pu [et al.] // Am. J. Surg. Pathol. — 2005. — Vol. 3. — P. 354–358.

6. Букринская, А.Г. Молекулярная биология парамиксовирусов / А.Г. Букринская, В.М. Зайдес. — М.: Медицина, 1978. — 184 с.
7. Вирусология / под ред. Б. Филдса, Д. Найпа. — М.: Мир, 1989. — 487 с.
8. Lam, K.M. Apoptosis as a cause of death in chicken embryos inoculated with Newcastle disease virus / K.M. Lam, A.C. Vasconcelos, A.A. Bickford // Microb. Pathog. — 1995. — Vol. 19, № 3. — P. 169–174.
9. HN protein of Newcastle disease causes apoptosis in chicken embryo fibroblast cells / P.V. Ravindra [et al.] // Arch. Virol. — 2008. — Vol. 153, № 4. — P. 749–754.
10. Elankumaran, S. Newcastle disease virus exerts onkolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death / S. Elankumaran, D. Rockemann, S.K. Samal // J. Virol. — 2006. — Vol. 80, № 15. — P. 7522–7534.
11. P53-independent endoplasmic reticulum stress-mediated cytotoxiciry of a Newcastle disease virus strain in tumor cell lines / Z. Fabian [et al.] // J. Virol. — 2007. — Vol. 81, № 6. — P. 2817–2830.
12. Newcastle disease virus activates macrophages for anti-tumor activity / V. Schirmacher [et al.] // Int. J. Oncol. — 2000. — Vol. 16. — P. 363–373.
13. Sinkovics, J.G. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains / J.G. Sinkovics // J. Clin. Virol. — 2000. — Vol. 16. — P. 1–15.
14. Induction of cytokines and cytotoxicity against tumor cells by Newcastle disease virus / U. Zorn [et al.] // Cancer Biother. — 1994. — Vol. 9. — P. 225–235.
15. Zamarin, D.P. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions / D.P. Zamarin, P. Palese // Future Microbiol. — 2012. — Vol. 7, № 3. – P. 347–367.
16. Хмара, М.Е. Роль некоторых вирусных патогенов в образовании и подавлении цитопролиферативных комплексов / М.Е. Хмара, С.А. Дракина, Н.В. Грибкова // Роль антропогенных и природных патогенов в формировании инфекционных и неинфекционных болезней человека. Медико-экологические аспекты проблемы: материалы междунар. конф. — Минск: НЕССИ, 2002. — С. 461.
17. Вируссодержащая аллантоисная жидкость как ингибитор роста асцитной карциномы Эрлиха / М.Е. Хмара [и др.] // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы междунар. науч. конф. — Минск, 2004. — С. 250.
18. Кешелава, В.В. Онколитический вирус болезни Ньюкасла и аутологичные опухолевые клетки в комплексной терапии рака / В.В. Кешелава // Вакцинопрофилактика. — 2007. — № 3. — С. 23–28.
19. Тихоненко, Т.И. ДНК-содержащие огкогенные вирусы / Т.И. Тихоненко // Журн. всесоюз. химич. об-ва им. Д.И. Менделеева. — 1986. — № 3. — С. 286–292.
20. Newcastee disease virus antibodies in human sera / S. Charan [et al.] // Indian. J. Med. Res. — 1981. — Vol. 73. — P. 303–307.
21. Introduction of adhesive and costimulatory immune functions into tumor cells by infection with Newcastle disease virus / C. Haas [et al.] // Int. J. Oncol. — 1998. — Vol. 13, № 6. — P. 1105–1115.

ONCOLYTIC NEWCASTLE DISEASE VIRUS: CHARACTERISTICS OF ANTITUMOR ACTIVITY IN ANIMALS AND CLINICAL APPLICATION PROSPECTS IN THE TREATMENT OF MALIGNANCIES

Kmara M.E., Gudkov V.G.
Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

In this paper we present our own experimental data on the antitumor activity of Newcastle disease virus (NDV) in albino mice with mammary adenocarcinoma (Ehrlich tumor) and the results of clinical practice (from the literature), obtained in the neoadjuvant therapy of breast cancer prior to surgical removal of the tumor.

Keywords: Newcastle disease virus (NDV), mammary adenocarcinoma of mice (Ehrlich tumor), neoadjuvant therapy.

Поступила 04.08.2014

МУТАЦИОННОЕ ДАВЛЕНИЕ В ОБЛАСТИ ГЕНОМА ПАРВОВИРУСА B19, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ

Хрусталев В.В.[1], Хрусталева Т.А.[2], Ермолович М.А.[3], Барковский Е.В.[1], Самойлович Е.О.[3]
[1]Белорусский государственный медицинский университет, Минск;
[2]Институт физиологии НАН Беларуси, Минск;
[3]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Частота фиксации синонимичных замен в области генома парвовируса B19, используемой для генотипирования, снижена по причине присутствия в данной области двух альтернативных рамок считывания для коротких белков, занимающих примерно 43% от всей последовательности. Наиболее частыми нуклеотидными мутациями в изученной области являются транзиции C на T и G на A, тимин является наименее мутабельным нуклеотидом.

Ключевые слова: парвовирус B19, мутационное давление, альтернативные рамки считывания.

Введение. Парововирус B19 является мелким безоболочечным вирусом и принадлежит к семейству *Parvoviridae*. Поскольку продуктивный репликативный цикл преимущественно происходит в эритроидных клетках-предшественниках, требующих стимуляции эритропоэтином [1], этот вирус был отнесен к роду *Erythrovirus* и до настоящего времени является его единственным представителем.

Геном вируса представлен однонитевой линейной ДНК длиной 5596 нуклеотидов. Кодирующая последовательность генома составляет 4830 нуклеотидов, с обеих сторон она окружена инвертированными терминальными повторяющимися последовательностями длиной 383 нуклеотидов каждая. Основными вирусными белками являются неструктурный белок NS и два структурных белка VP1 и VP2.

Протеины VP1 и VP2 идентичны по своему составу, за исключением участка VP1u длиной 227 аминокислот, который располагается в N-терминальной области VP1 белка. VP1 является минорным белком капсида, на его долю в вирионе приходится около 4% белка. Регион VP1u локализован вне вириона и содержит несколько консервативных участков, обеспечивающих внутриклеточный процесс проникновения вируса в ядро [2]. Помимо этого VP1u содержит большое количество антигенных сайтов, ответственных за выработку вируснейтрализующих антител [3].

Неструктурный белок NS является принципиально важным для репликации B19V и экспрессии вирусных генов, а также считается ответственным за торможение клеточного цикла и апоптоз инфицированных эритроидных клеток-предшественников [4].

На основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей B19V в 2002 г. Servant с соавт. предложено разделение B19 на три генотипа с использованием для генотипирования фрагмента длиной 994 нуклеотидов, расположенного в NS/VP1u области генома [5]. Рекомендованный фрагмент охватывает практически пятую часть всего генома B19 и включает генетическую информацию о четырех вирусных белках (NS, VP1u, 7,5-kDa, protein X).

В ряде работ было показано значительное преобладание в геноме парвовируса B19 синонимичных замен над несинонимичными, что отражает наличие очищающей селекции (отрицательного отбора) в процессе эволюции B19V [5, 6]. Сходный показатель соотношения синонимичных и несинонимичных замен наблюдался в области как структурных, так и неструктурных белков, что подтверждает отсутствие определяющей роли иммунного давления в изменчивости вируса [7].

В то же время при исследовании штаммов B19, изолированных в Бразилии, был установлен более высокий уровень несинонимичных замен, что связали с более активной циркуляцией вируса в этом регионе и более интенсивным иммунным давлением на него [8]. Ранее проведенные исследования штаммов B19V, циркулирующих в Беларуси, выявили высокую долю (около 65%) несинонимичных мутаций, которые практически с одинаковой частотой выявлялись как в области VP1, так NS1 белков [9].

Цель работы — установление преимущественного направления мутационного давления в области генома, используемой для генотипирования, с целью объяснения факта повышения доли несинонимичных мутаций в данном регионе.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись нуклеотидные последовательности B19V, выявленные в Республике Беларусь в 2005–2013 гг. у лиц с острой парвовирусной инфекцией.

Вирусную ДНК выделяли из сыворотки крови заболевших с использованием коммерческого набора QiaAmp DNA mini kit (Qiagen, США). Амплификацию фрагмента генома NS/VP1u длиной 994 нт, используемого для генотипирования, проводили методом гнездовой ПЦР с использованием описанных в литературе праймеров [10]. Искомый фрагмент включал 515 нуклеотидов неструктурного белка NS, 487 нт структурного белка VP1u и их перекрывающуюся область из 8 нуклеотидов. Кроме того, в данной последовательности содержится 192 из 225 нуклеотидов, кодирующих белок 7.5 KDa, и 237 из 246 нуклеотидов, кодирующих белок protein X. Амплифицированный фрагмент ДНК вырезали из геля, очищали с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия) и секвенировали в обоих направлениях с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Нидерланды) на капиллярном секвенаторе (Model 3100 Avant, Applied Biosystems, Нидерланды).

К выборке из 90 последовательностей белорусских штаммов были добавлены 9 последовательностей штаммов из других стран мира. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием алгоритма Muscle, встроенного в программу MEGA 6 (www.megasoftware.net). Нами были сформированы 4 выборки последовательностей. В первую выборку вошли фрагменты последовательностей, кодирующих NS, содержащие альтернативную рамку считывания для белка 7.5 KDa. Во второй выборке содержались фрагменты последовательностей, кодирующих NS, не содержащие перекрывающейся рамки считывания для белка 7.5 KDa. Третья выборка состояла из фрагментов участков, кодирующих белок VP1, не перекрывающихся с альтернативной рамкой считывания для белка protein X. Четвертая выборка состояла из фрагментов кодирующих участков VP1, содержащих перекрывающуюся рамку считывания для белка protein X.

С помощью программы MEGA 6 для каждой из четырех выборок был проведен Codon-based Z-test of selection, основанный на попарном сравнении несинонимичной (DN) и синонимичной (DS) эволюционной дистанции. Дистанции вычислялись по методу Кумара. Нами тестировалась гипотеза о «положительном отборе», т. е. о достоверном превышении несинонимичной дистанции синонимичной (DN>DS).

Две выборки, не содержащие перекрывающихся рамок считывания, были обработаны с помощью оригинального алгоритма VVTAK VarInvar (http://chemres.bsmu.by). Данный алгоритм работает исключительно со стабильными четырехкратно и двукратно вырожденными сайтами из третьих положений кодонов. Под стабильным четырехкратно вырожденным сайтом понимается такой сайт, который остается четырехкратно вырожденным во всех последовательностях из данной выборки. Дело в том, что в результате мутации в первом или во втором положении кодона четырехкратно вырожденный сайт в третьем его положении может стать двукратно вырожденным или наоборот. Подобные переходы снижают чистоту *in silico* расчетов. Алгоритм VVTAK VarInvar проводит сравнение между средними частотами использования нуклеотидов в стабильных четырехкратно и двукратно вырожденных сайтах и их частотами использования в соответствующих инвариантных сайтах. Под инвариантным сайтом понимается такой сайт, в котором один и тот же нуклеотид находится во всех последовательностях. Кроме этого, алгоритм рассчитывает процентное соотношение вариабельных четырехкратно вырожденных сайтов.

Для демонстрации нуклеотидных сдвигов на протяжении двух длинных рамок считывания референтного генома парвовируса B19 (NC_000883.2) был использован оригинальный алгоритм VVTAK Sliding Window (http://chemres.bsmu.by).

Результаты и их обсуждение. В выравнивании фрагментов участков, кодирующих белок NS, перекрывающихся с рамкой считывания белка 7.5 KDa, были выявлены случаи достоверного превышения синонимичной дистанции несинонимичной. Две последовательности (AB126270 — из Японии и DQ293995 — из Бельгии) при сравнении с 17 последовательностями белорусских штаммов демонстрируют достоверно большую частоту возникновения несинонимичных замен по сравнению с синономичными. Кроме того, DN достоверно превысил DS и при сравнении этих двух последовательностей между собой.

В выравнивании фрагментов участков, кодирующих исключительно белок NS (без перекрывающихся рамок считывания), случаев достоверного превышения синонимичной дистанции несинонимичной не наблюдается.

В выравнивании фрагментов участков, кодирующих белок VP1, перекрывающихся с рамкой считывания белка protein X, DN достоверно превышает DS в 40 парах последовательностей. Все эти пары включают последовательность AJ249437 — из Франции. Случаев достоверного превышения синонимичной дистанции несинонимичной в выравнивании фрагментов кодирующих участков белка VP1, не перекрывающихся с рамкой считывания белка protein X, зафиксировано не было.

Приведенные выше данные подтверждают тот факт, что в участках с перекрывающимися рамками считывания значительно снижается частота фиксации замен, синонимичных только для одной из двух рамок. Действительно, нуклеотидная замена, синонимичная для рамки считывания белка VP1, является несинонимичной для рамки считывания белка protein X. При наличии отрицательного отбора, элиминирующего несинонимичные замены как в одной, так и в другой рамке считывания, скорость фиксации синонимичных мутаций (опять же только для одной из рамок) резко снижается. В некоторых случаях возможно даже достоверное превышение синонимичной эволюционной дистанции несинонимичной, что ошибочно может быть расценено как свидетельство наличия положительного отбора, способствующего закреплению аминокислотных замен в данном участке белка.

Наличие перекрывающейся рамки считывания на некотором фрагменте кодирующего участка приводит к тому, что четырехкратно и двукратно вырожденные сайты перестают быть таковыми. По этой причине для расчета частот использования нуклеотидов в четырехкратно и двукратно вырожденных сайтах необходимо использовать только те фрагменты кодирующих участков, в которых перекрывающиеся рамки считывания отсутствуют.

На рисунке 1 представлены данные о процентном соотношении различных типов вариабельных четырехкратно вырожденных сайтов во фрагментах генов, кодирующих NS и VP1, не перекрывающихся с рамками считывания 7.5 KDa и protein X, соответственно. Наиболее часто в обоих выравниваниях встречается вариабельный сайт, содержащий тимин и цитозин. Вариабельный сайт, содержащий аденин и гуанин, встречается несколько реже. В целом сайты, в которых произошли исключительно транзиции (TC и AG), встречаются значительно чаще, чем сайты, в которых произошли исключительно трансверсии (GC, AT, AC и GT).

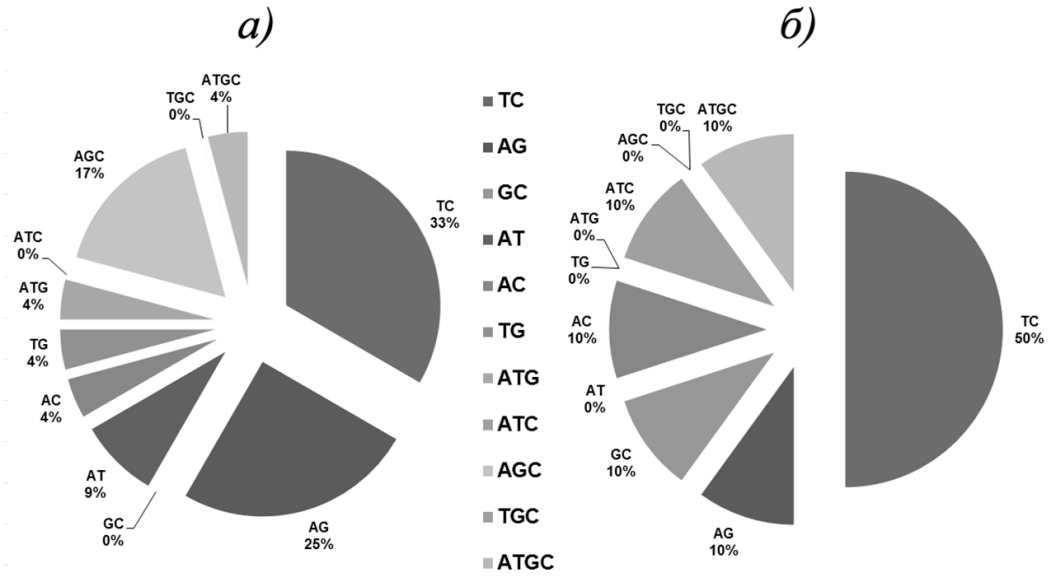


Рисунок 1 — Процентное соотношение четырехкратно вырожденных вариабельных сайтов в выборках фрагментов кодирующего участка NS (а) и VP1 (б), не перекрывающихся с рамками считывания белков 7.5 KDa и protein X

Если судить о направлении нуклеотидных замен по сдвигам в частотах использования нуклеотидов, то придется признать наличие мутационного AT-давления в геноме парвовируса B19. Действительно, на протяжении большей части гена, кодирующего белок NS (рисунок 2), частоты использования аденина и тимина (как в четырехкратно, так и в двукратно вырожденных сайтах третьих положений кодонов) превышают частоты использования гуанина и цитозина. Интересно отметить, что во фрагменте кодирующего участка NS, перекрывающегося с короткой рамкой считывания белка 7.5 KDa, расположен пик частоты использования цитозина в четырехкратно (рисунок 2A)

и двукратно вырожденных сайтах третьих положений кодонов (рисунок 2В). При условии долгого существования двойной рамки считывания действительно следует ожидать возникновения существенных отклонений в частотах использования нуклеотидов: замены в четырехкратно вырожденных сайтах одной из рамок перестают быть синонимичными, скорость снижения в них частот использования нуклеотидов, склонных к частым мутациям, замедляется.

Как видно на рисунке 3, во второй длинной рамке считывания (для минорного капсидного белка VP1) распределение нуклеотидов в четырехкратно и двукратно вырожденных сайтах демонстрирует такие же сдвиги, как и в первой: аденин и тимин накапливаются, частоты использования гуанина и цитозина снижаются.

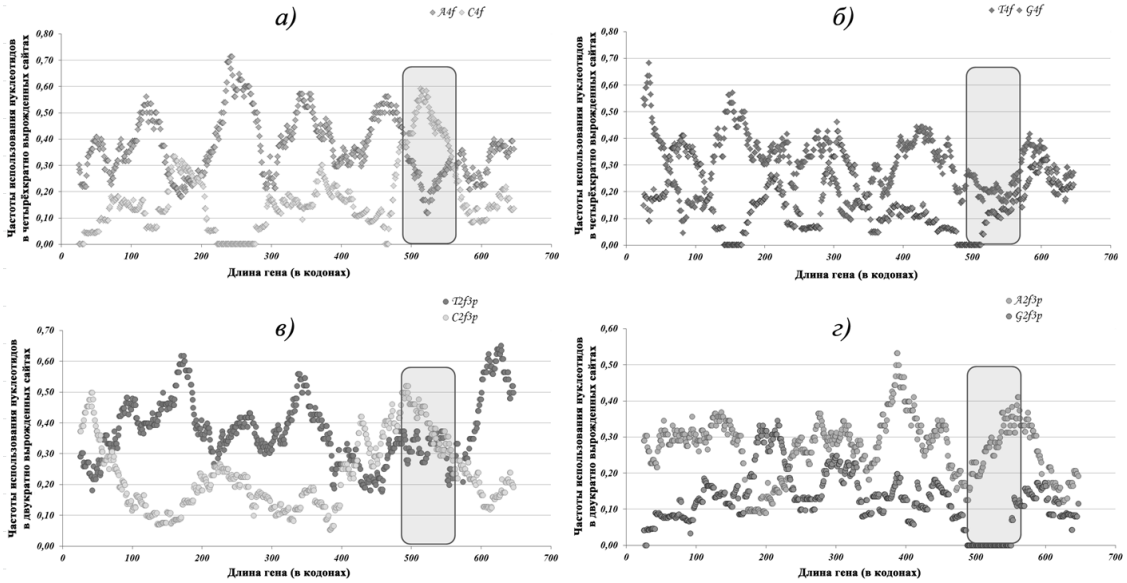


Рисунок 2 — Частота использования нуклеотидов в четырехкратно (а, б) и двукратно вырожденных сайтах третьих положений кодонов (в, г) гена, кодирующего белок NS референтного штамма парвовируса B19. Область перекрытия с альтернативной рамкой считывания белка 7.5 KDa выделена

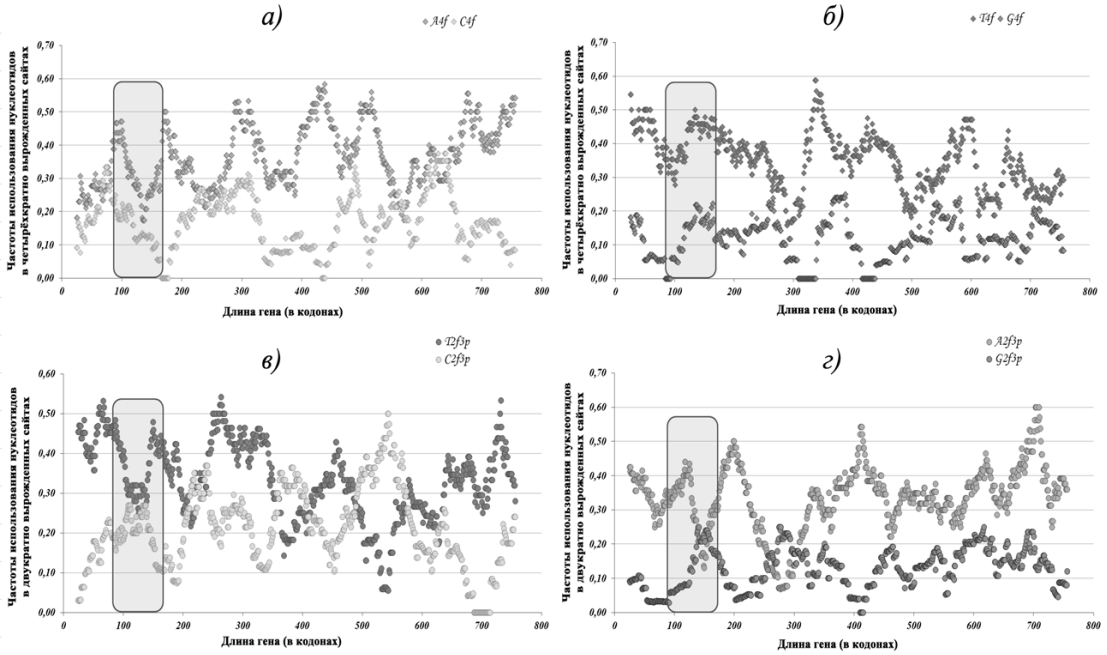


Рисунок 3 — Частота использования нуклеотидов в четырехкратно (а, б) и двукратно вырожденных сайтах третьих положений кодонов (в, г) гена, кодирующего белок VP1 референтного штамма парвовируса B19. Область перекрытия с альтернативной рамкой считывания белка protein X выделена

Создается впечатление, что в геноме парвовируса B19 нуклеотидные замены по направлению от гуанина и цитозина к аденину и тимину преобладают над нуклеотидными заменами обратного направления. Однако следует помнить о том, что направление мутационного давления в геноме вируса может смениться на противоположное. В таком случае сдвиги в частотах использования нуклеотидов сохранятся на долгое (в эволюционном масштабе) время и перестанут служить «флюгером», указывающим направление наиболее частых нуклеотидных замен (до тех пор, пока случайный генетический дрейф не приведет к формированию новых — противоположных — сдвигов). С целью исключения такого варианта развития событий нами был разработан тест, позволяющий выявить нуклеотиды, наименее склонные к мутациям.

Таблица — Частота использования нуклеотидов в инвариантных и стабильных четырехкратно и двукратно вырожденных сайтах фрагментов генов NS и VP1

Показатель	Фрагмент гена NS, не перекрывающийся с 7.5 KDa		Фрагмент гена VP1, не перекрывающийся с protein X	
	в инвариантных сайтах, %	в стабильных сайтах, %	в инвариантных сайтах, %	в стабильных сайтах, %
A4f	21,43	20,02	25,00	14,80
T4f	42,86	34,20	75,00	54,01
G4f	35,71	30,19	0,00	13,93
C4f	0,00	15,59	0,00	17,25
A2f3p	17,65	21,49	37,50	33,36
T2f3p	58,82	45,10	50,00	45,18
G2f3p	11,76	16,01	0,00	6,64
C2f3p	11,76	17,40	12,50	14,83

В таблице представлены данные сравнения средних частот использования нуклеотидов в стабильных четырехкратно и двукратно вырожденных сайтах в выравнивании фрагментов кодирующего участка NS без перекрывающейся рамки считывания и частот их использования в инвариантных сайтах. В инвариантных четырехкратно вырожденных сайтах достоверно повышены частоты использования аденина, тимина и гуанина по сравнению с таковыми во всех стабильных сайтах ($P<0,001$). В инвариантных двукратно вырожденных сайтах (относительно всех стабильных сайтов такого типа) повышена частота использования тимина.

Аналогичные данные по выравниванию фрагмента, кодирующего белок VP1, не перекрывающегося с рамкой считывания protein X, также приведены в таблице. Инвариантных четырехкратно вырожденных сайтов, содержащих гуанин или цитозин, в изученном выравнивании вообще не обнаружено. Частоты же использования тимина и аденина в инвариантных четырехкратно вырожденных сайтах достоверно выше, чем средние частоты их использования в стабильных четырехкратно вырожденных сайтах. В инвариантных двукратно вырожденных сайтах также высоки частоты использования аденина и тимина. В целом по данным из таблицы можно сделать вывод о том, что аденин и (особенно) тимин мутируют реже, чем гуанин и цитозин. Именно поэтому тимин и аденин чаще остаются инвариантными для всех последовательностей из изученных выборок.

Выявленные особенности мутагенеза парвовируса B19 говорят о том, что его ДНК подвержена частым транзициям цитозина на тимин, которые могут возникать в результате работы ферментов из семейства APOBEC3, дезаминирующих цитозин в одноцепочечной ДНК. «Отражением» замен C на T, происходящих на «минус» цепи ДНК, являются замены гуанина на аденин на «плюс» цепи. Судя по преобладанию замен C на T над заменами G на A, «плюс» цепи ДНК парвовируса B19 чаще подвергаются дезаминированию цитозина, чем «минус» цепи. С другой стороны, «плюс» цепи могут накапливать замены C на T и передавать их дочерним «минус» цепям, которые затем упаковываются в вирионы.

Снижение частоты возникновения синонимичных замен во фрагменте генома, используемом для генотипирования, можно объяснить наличием в нем двух альтернативных рамок считывания.

Наличие таких рамок считывания характерно для вирусов. Следует ожидать, что не только синонимичные, но и несинонимичные замены во фрагментах генома с двумя перекрывающимися рамками считывания, будут иметь более низкую частоту фиксации. Часть замен будут несинонимичными для обеих рамок считывания, что должно снижать вероятность того, что они окажутся нейтральными для вируса. Теоретически фрагменты белка, кодируемые одной из двух перекрывающихся рамок считывания, должны быть более консервативными, чем те фрагменты, которые кодируются только одной рамкой.

Исходя из полученных в настоящей работе данных можно проводить следующий этап исследования — поиск антигенного фрагмента поверхностного белка парвовируса B19, кодируемого нуклеотидной последовательностью, в наибольшей степени защищенной от возникновения несинонимичных нуклеотидных мутаций C на T и G на A. Такой фрагмент сможет послужить кандидатом для создания синтетической вакцины против парвовируса B19.

Заключение. Снижение частоты фиксации синонимичных мутаций (для генов, кодирующих белки NS и VP1) в области генома парвовируса B19, используемой для генотипирования, связано с наличием в ней двух альтернативных рамок считывания (для белков 7.5 KDa и protein X).

В геноме парвовируса B19 наиболее часто происходят транзиции C на T и G на A, обусловливая существование мутационного AT-давления.

Литература

1. Role of erythropoietin receptor signaling in parvovirus B19 replication in human erythroid progenitor cells / A.Y. Chen [et al.] // J. Virol. — 2011. — Vol. 84. — P. 12385-12396.
2. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity / Z. Zádori [et al.] // Dev. Cell. — 2001. — Vol. 1. — P. 291-302.
3. Identification of an immunodominant peptide in the parvovirus B19 VP1 unique region able to elicit a long-lasting immune response in humans / E. Zuffi [et al.] // Viral Immunol. — 2001. — Vol. 14. — P. 151-158.
4. Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity / N. Zhi [et al.] // J. Virol. — 2006. — Vol. 80. — P. 5941-5950.
5. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes / A. Servant [et al.] // J. Virol. — 2002. — Vol. 76. — P. 9124-9134.
6. Lukashov, V.V. Evolutionary relationships among parvoviruses: virus-host coevolution among autonomous primate parvoviruses and links between adeno-associated and avian parvoviruses / V.V. Lukashov, J. Goudsmit // J. Virol. — 2001. — Vol. 75. — P. 2729-2740.
7. Shackelton, L.A. Phylogenetic evidence for the rapid evolution of human B19 erythrovirus / L.A. Shackelton, E.C. Holmes // J. Virol. — 2006. — Vol. 80. — P. 3666–3669.
8. The "pressure pan" evolution of human erythrovirus B19 in the Amazon, Brazil / R. Barros de Freitas [et al.] // Virology. — 2007. — Vol. 20, suppl. 369. — P. 281-287.
9. Human parvovirus B19 surveilance in patients with rash and fever from Belarus / M.A. Yermalovich [et al.] // J. Med. Virol. — 2012. — Vol. 84. — P.973-978.
10. Phylogenetic analysis of human parvovirus b19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b / J.M. Hubschen [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2009. — Vol. 47. — P. 3735-3738.

MUTATIONAL PRESSURE IN THE REGION OF PARVORIS B19 GENOME USED FOR GENOTYPING

[1]Khrustalev V.V., [2]Khrustaleva T.A., [3]Yermolovich M.A., [1]Barkovsky E.V., [3]Samoilovich E.O.

[1]Belarussian State Medical University, Minsk;

[2]Institute of Physiology of NAS of Belarus, Minsk;

[3]Rebublican Research Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

The rates of synonymous mutations fixation are relatively low in the region of parvovirus B19 genome used for genotyping because of the presence of two alternative reading frames for short proteins covering about 43% of the whole sequence. Most frequent nucleotide mutations in the studied region are C to T and G to A transitions, and thymine is the least mutable nucleotide.

Keywords: Parvovirus B19, mutational pressure, alternative reading frames, nonsynonymous distance, synonymous distance.

Поступила 27.08.2014

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК МОЧЕПОЛОВЫХ ОРГАНОВ У ПАЦИЕНТОВ НА ФОНЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА

Шиманская И.Г., Костюк С.А., Бадыгина Н.А., Полуян О.С., Руденкова Т.В.
Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Реферат. Проведено изучение состояния микробиоценоза слизистых оболочек мочеполовых органов у половых партнеров (женщин и мужчин) в парах, где у женщин установлен диагноз бактериального вагиноза. С применением методов ПЦР и микроскопии установлены основные характеристики состояния слизистой урогенитального тракта. По результатам исследований и сбора данных анамнеза были выявлены четыре клинико-микробиологических варианта течения бактериального вагиноза.

Ключевые слова: бактериальный вагиноз, методы диагностики, клинико-микробиологические показатели, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*.

Введение. Инфекции, передающиеся половым путем (ИППП), являются актуальной проблемой современного здравоохранения как в плане непосредственного влияния на показатели репродуктивного здоровья населения, так и в виду существенного увеличения риска трансмиссии ВИЧ-инфекции [1]. К основным последствиям ИППП относят: нарушение репродуктивной функции, невынашивание беременности, возникновение эктопической беременности, развитие мужского и женского бесплодия, увеличение риска развития онкологических заболеваний мочеполовых органов [2, 3]. В последние 10 лет отмечается тенденция к снижению количества «классических» (сифилис, гонорея, хламидиоз, трихомониаз) инфекций и увеличению количества «новых» возбудителей ИППП (микоплазмозы, бактериальный вагиноз, генитальный герпес). Кроме того, доля бактериального вагиноза (БВ) в общей структуре заболеваемости ИППП, по данным статистической отчетности дерматовенерологических учреждений, сохраняется на уровне 19–20% (так, в 2007 г. общее количество зарегистрированных ИППП составило 149560 случаев, при этом удельный вес БВ в структуре ИППП составил 19%, а в 2001 г. общее количество случаев ИППП составляло 21656 с долей БВ — 19,8%) [4].

Цель работы — изучение состояние микробиоценоза слизистых оболочек мочеполовых органов у половых партнеров на фоне бактериального вагиноза.

Материалы и методы. Группу исследования составили женщины (n = 91), страдающие БВ, и их половые партнеры (n = 91), которые были обследованы на наличие возбудителей ИППП и БВ.

Оценка клинико-микробиологических показателей у пациентов на фоне БВ проводилась по наличию клинических проявлений, а также с применением методов микроскопии и ПЦР-анализа. При микроскопическом исследовании биологического материала оценивали следующие показатели: ключевые клетки, наличие/отсутствие лактобацилл, эпителиальный клетки более 15 в поле зрения. Методом ПЦР в режиме реального времени выявляли ДНК возбудителей бактериального вагиноза — *Gardnerella vaginalis*, (*G. vaginalis*) и *Atopobium vaginae* (*A. vaginae*), возбудителей микоплазмозов — *Ureaplasma urealiticum* (*Ur. urealiticum*) и *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*), а также ДНК других возбудителей ИППП (*Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, *Trihomonas vaginalis*).

Для статистической обработки данных использовали непараметрические методы статистического анализа (критерий Манна–Уитни), а также вычисляли среднеарифметические величины, их доверительные интервалы и проводили оценку достоверности различий числовых результатов по критерию Стьюдента. Разницу считали статистически достоверной при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования клинические проявления БВ были выявлены у 53,8% (n = 49) пациенток. По данным микроскопии наличие ключевых клеток и отсутствие лактобактерий были обнаружены у 100% пациенток (n = 91), а более 15 эпителиальных клеток в поле зрения — у 82,4% (n = 75) пациенток.

Результаты, полученные в результате ПЦР-анализа, позволили установить присутствие в биологическом материале пациенток ДНК *G. vaginalis* (как в качестве единственного инфекционного агента, так и в составе ассоциации возбудителей) в 91,2% (n = 83) случаев, присутствие ДНК *A. vaginae* (как в качестве единственного инфекционного агента, так и в составе ассоциации возбудителей) в 74,7% (n = 68) случаев. При этом совместное присутствие *G. vaginalis* и *A. vaginae* было выявлено в 65,9% (n = 60) случаев. Также в биологическом материале пациентов с применением

метода ПЦР была выявлена ДНК *Ur. urealiticum*, *M. hominis*, а также других возбудителей ИППП (*Ch. trachomatis*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*).

Сбор данных анамнеза позволил установить, что отягощенный акушерский анамнез был у 57,1% (n = 52) обследованных пациенток, а рецидивы БВ — у 11,0% (n = 10). Все полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Структура бактериального вагиноза у женщин в группе исследования

Показатели	Количество пациентов (n = 91)	
	абс.	%
Клинические проявления	49	53,8
Микроскопия		
Ключевые клетки	91	100
Отсутствие лактобатерий	91	100
Эпителиальный клетки более 15 в поле зрения	75	82,4
Результаты ПЦР-исследования		
Gardnerella vaginalis	83	91,2
Atopobium vaginae	68	74,7
G. vaginalis + A. vaginae	60	65,9
Ur. urealiticum	44	48,4
M. hominis	21	23,1
Ur. urealiticum + M. hominis	13	14,3
Другие возбудители ИППП	52	57,1
Отягощенный акушерский анамнез	49	53,8
Рецидив бактериального вагиноза	10	11,0

По результатам обследования пациенты были разделены на 4 группы в зависимости от клинико-микробиологических вариантов течения БВ (рисунок 1):

- группа 1 (n = 31) — «классическое» симптоматическое течение БВ у женщин, лабораторно подтвержденное, сопровождалось отсутствием клинических проявлений поражения МПО у мужчин и отрицательными лабораторными тестами;
- группа 2 (n = 18) — клинически и лабораторно выраженное течение БВ у женщин сопровождалось асимптомным выделением возбудителей *G. vaginalis*, *A. vaginae* и *G. vaginalis + A. vaginae* в отделяемом мочеполовых органов их половых партнеров;
- группа 3 (n = 23) — асимптомное клиническое течение БВ у женщин в сочетании с положительными результатами лабораторных тестов сопровождалось симптоматическим течением у мужчин (баланит, баланопостит, уретрит) и положительными результатами лабораторных тестов;
- группа 4 (n = 19) — асимптоматическое течение БВ у лиц обоего пола в комбинации с положительными результатами микроскопического и ПЦР-исследований.

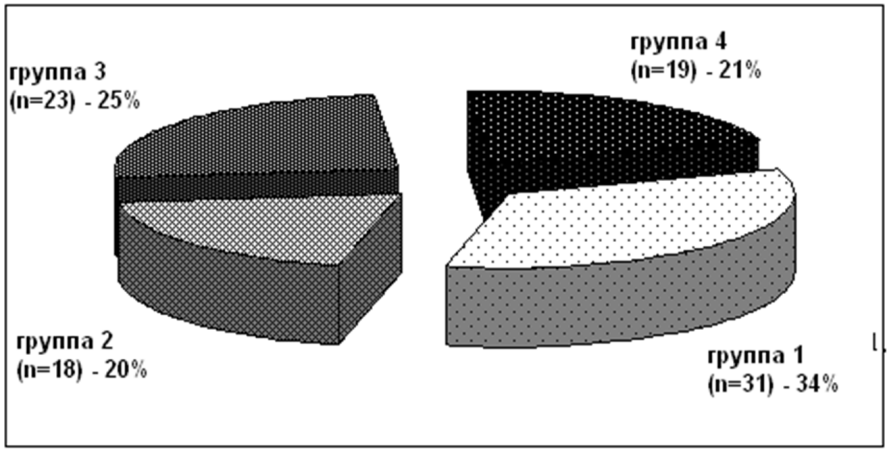


Рисунок 1 — Распределение пациентов с БВ по группам

У пациентов группы 1 – «классическое» течение (обнаружение 3 из 4 положительных критериев по Амселю), 34% (n = 31) пациентов — наличие БВ сопровождалось положительными результатами микроскопии в 100% случаев, обнаружением ДНК *G. vaginalis* у 87,1% обследуемых пациенток данной группы, *A. vaginae* — у 35,5%, одновременным выделением возбудителей *G. vaginalis + A. vaginae* — у 22,6%, ДНК возбудителей микоплазмозов (*M. hominis*, *Ur. urealiticum*) у пациентов данной группы не была выявлена, ДНК других возбудителей ИППП была выявлена у 16,1% пациенток. «Классическое течение» бактериального вагиноза у женщин не сопровождалось рецидивами заболевания (n = 0), отягощенный акушерский анамнез был отмечен лишь у 9,7% (n = 3) пациенток (таблица 2).

У половых партнеров пациенток данной группы отсутствовали клинические проявления поражения мочеполовых органов (МПО), результаты микроскопического и ПЦР-исследований на наличие в биологическом материале мужчин *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Ur. urealiticum*, *M. hominis* были отрицательными.

Таблица 2 — Характеристика клинико-микробиологических показателей у пациентов группы 1

Показатели	% женщин, (n = 31)	% мужчин, (n = 31)
Клинические проявления	100,0**	0,0
Микроскопия		
Ключевые клетки	100,0**	0,0
Отсутствие лактобатерий	100,0**	0,0
Эпителиальный клетки более 15 в поле зрения	54,8	54,8
Результаты ПЦР-исследования		
Gardnerella vaginalis	87,1**	0,0
Atopobium vaginae	35,5**	0,0
G. vaginalis + A. vaginae	22,6**	0,0
Ur. urealiticum	0,0	0,0
M. hominis	0,0	0,0
Ur. urealiticum + M. hominis	0,0	0,0
Другие возбудители ИППП	16,1	0,0
Отягощенный акушерский анамнез	9,7	0,0
Рецидив бактериального вагиноза	0,0	0,0

Примечание — **Различия достоверны между подгруппами женщин и мужчин, p<0,01.

В группу 2 было включено 18 (20%) обследованных пар. В данной группе клинически выраженное течение БВ у женщин сопровождалось асимптомным выделением следующих возбудителей в отделяемом мочеполовых органов их половых партнеров: *G. vaginalis* — у 83,3% (n = 15), *A. vaginae* — у 77,8% (n = 14), *G. vaginalis + A. vaginae* — у 61,1% (n = 11), *Ur. urealiticum* — 61,1% (n = 11), *M. hominis* — у 55,6% (n = 10), *Ur. urealiticum + M. hominis* — у 27,8% (n = 5), а также ДНК других возбудителей ИППП — в 66,7% (n = 12) случаев.

У женщин данной группы клинически выраженное течение БВ по данным микроскопического исследования сопровождалось выраженными нарушениями биоценоза слизистой урогенитального тракта (присутствие ключевых клеток и отсутствие лактобацилл в 100% случаев). При ПЦР-исследованиях ДНК *G. vaginalis* была выявлена у 94,4% (n = 17) пациенток, *A. vaginae* — у 88,9% (n = 16), *G. vaginalis + A. vaginae* — у 83,3% (n = 15), *Ur.urealiticum* — 66,7% (n = 12), *M. hominis* — у 44,4% (n = 8), *Ur. urealiticum + M. hominis* — у 33,3% (n = 6), а также ДНК других возбудителей ИППП — в 66,7% (n = 12) случаев. Среди пациенток данной группы рецидивы БВ и отягощенный акушерский анамнез были отмечены у 55,6% (n = 10) пациенток, другие возбудители ИППП были выделены у 66,7% (n = 12) пациенток (таблица 3).

Таблица 3 — Характеристика клинико-микробиологических показателей у пациентов группы 2

Показатели	% женщин, (n = 18)	% мужчин, (n = 18)
Клинические проявления	100,0**	5,6
Микроскопия		
Ключевые клетки	100,0**	0,0
Отсутствие лактобатерий	100,0**	0,0
Эпителиальные клетки более 15 в поле зрения	88,9	72,2
Результаты ПЦР-исследования		
Gardnerella vaginalis	94,4	83,3
Atopobium vaginae	88,9	77,8
G. vaginalis + A. vaginae	83,3	61,1
Ur. urealiticum	66,7	61,1
M. hominis	44,4	55,6
Ur. urealiticum + M. hominis	33,3	27,8
Другие возбудители ИППП	66,7	66,7
Отягощенный акушерский анамнез	55,6	–
Рецидив бактериального вагиноза	55,6	55,6

Примечание — **Назличия достоверны между подгруппами женщин и мужчин, p<0,01.

У пациентов группы 3, которая составила 25% (n = 23) от обследуемых пар, было установлено асимптомное течение БВ у женщин в сочетании с нарушениями биоценоза слизистой МПО, при этом в 100% случаев (n = 23) нарушения были выявлены по показателям микроскопии, а также необходимо отметить, что по результатам ПЦР-анализа ДНК *A. vaginae* и других возбудители ИППП были обнаружены у 100,0% (n = 23) пациенток данной группы. При этом у половых партнеров-мужчин течение воспалительного процесса сопровождалось симптоматическим течением заболевания (баланит, баланопостит, уретрит), сдвигами в показателях микроскопического исследования: ключевые клетки были выделены в 17,4% (n = 4) случаев; а также при проведении ПЦР-анализа: выявлением в биологическом материале ДНК *G. vaginalis* — в 87,0% (n = 20) случаев, ДНК *A. vaginae* — в 82,6% (n = 19) случаев, совместное присутствие ДНК *G. Vaginalis + A. vaginae* — в 69,6% (n = 16) случаев (таблица 4).

Таблица 4 — Характеристика клинико-микробиологических показателей у пациентов группы 3

Показатели	% женщин, (n = 23)	% мужчин, (n = 23)
Клинические проявления	0,0**	100,0
Микроскопия		
Ключевые клетки	100,0**	17,4
Отсутствие лактобатерий	100,0**	0,0
Эпителиальные клетки более 15 в поле зрения	100,0	100,0
Результаты ПЦР-исследования		
Gardnerella vaginalis	91,3	87,0
Atopobium vaginae	100,0	82,6
G. vaginalis + A. vaginae	91,3	69,6
Ur. urealiticum	78,3**	39,1
M. hominis	30,4	26,1
Ur. urealiticum + M. hominis	17,4	13,0
Другие возбудители ИППП	100,0	100,0
Отягощенный акушерский анамнез	91,3	87,0
Рецидив бактериального вагиноза	0,0	0,0

Примечание — **Различия достоверны между подгруппами женщин и мужчин, p<0,01.

В группу 4 (n = 19) были включены пациенты с асимптоматическим течением БВ у лиц обоего пола в сочетании положительными результатами микроскопического исследования. Так, у женщин в данной группе по результатам микроскопического исследования в 100% случаев были нарушения состояния слизистой МПО по всем изученным показателям, у мужчин ключевые клетки

были выявлены в 15,8% (n = 3) случаев, а более 15 эпителиальных клеток в поле зрения — в 100% (n = 19) случаев. При ПЦР-исследованиях была выявлена ДНК инфекционных агентов: *G. vaginalis* — у 94,7% (n = 18) женщин и 100% (n = 19) мужчин, *A. vaginae* — у 94,7% (n = 18) женщин и 78,9% (n = 15) мужчин, *G. Vaginalis + A. vaginae* — у 89,5% (n = 17) женщин и 78,9% (n = 15) мужчин). ДНК *Ur. urealiticum* была обнаружена у 73,7% (n = 14) женщин и у 52,6% (n = 10), *M. hominis* — у 31,6% (n = 6) женщин и 26,3% (n = 5) мужчин, *Ur. Urealiticum + M. hominis* — у 15,8% (n = 3) женщин и у 10,5% (n = 2) мужчин. ДНК других возбудителей ИППП была выявлена в 66,7% (n = 12) случаев у лиц обоего пола. Отягощенный акушерский анамнез был отмечен у 78,9% пациенток данной группы (таблица 5).

Таблица 5 — Характеристика клинико-микробиологических показателей у пациентов группы 4

Показатели	% женщин, (n = 19)	% мужчин, (n = 19)
Клинические проявления	0,0%	0,0
Микроскопия		
Ключевые клетки	100,0**	15,8
Отсутствие лактобатерий	100,0**	0,0
Эпителиальный клетки более 15 в поле зрения	100,0	100,0
Результаты ПЦР-исследования		
Gardnerella vaginalis	94,7	100,0
Atopobium vaginae	94,7	78,9
G. vaginalis + A. vaginae	89,5	78,9
Ur. urealiticum	73,7	52,6
M. hominis	31,6	26,3
Ur. urealiticum + M. hominis	15,8	10,5
Другие возбудители ИППП	63,2	63,2
Отягощенный акушерский анамнез	78,9	78,9
Рецидив бактериального вагиноза	0,0	0,0

Примечание — **Достоверное отличие между женщинами и мужчинами, p<0,01.

Наименьшая частота встречаемости отягощенного акушерского анамнеза была выявлена в группе 1 и находилась на уровне 9,7%, а наиболее часто данное осложнение встречалось в группе 3 (91,3%) (рисунок 2). Анализ полученных данных позволил установить достоверные отличия частоты встречаемости отягощенного акушерского анамнеза в группах 2, 3, 4 в сравнении с группой 1 (p<0,01), а также между группами 2 и 3 (p<0,01).

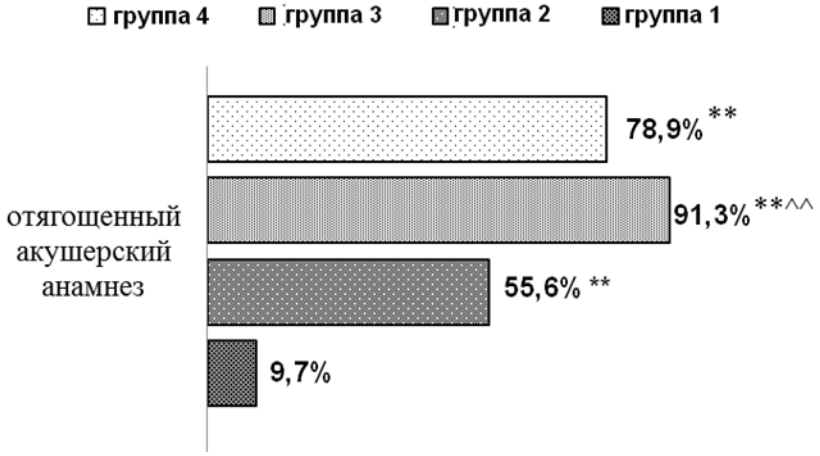


Рисунок 2 — Частота встречаемости отягощенного акушерского анамнеза в обследованных группах пациенток: ** — достоверное отличие от группы 1, p<0,01; ^^ — достоверное отличие от группы 2, p<0,01

Исследование позволило продемонстрировать высокую чувствительность полимеразной цепной реакции в качестве метода лабораторной диагностики БВ у женщин и дало возможность выявить ДНК как единичных инфекционных агентов, так и ассоциаций бактерий-возбудителей БВ в биологическом материале из МПО мужчин. С использованием метода ПЦР у пациентов-мужчин были выявлены ДНК *G. vaginalis* — у 91,2% (n = 83) обследуемых, ДНК *A. vaginae* — 74,7% (n = 68), а также ассоциация *G. vaginalis* и *A. vaginae* — в 65,9% (n = 60) случаев.

Учитывая полимикробную ассоциацию возбудителей БВ, в дальнейшем требуется внедрение и апробация методов комплексной оценки микробиоты слизистых МПО как у женщин, так и у мужчин на основе полимеразной цепной реакции с целью разработки алгоритма дифференцированного ведения пациентов.

Заключение. Исследование позволило выявить четыре наиболее характерных варианта течения БВ. Исходя из данных, полученных в ходе обследования пар половых партнеров, было установлено, что присутствие возбудителей БВ в урогенитальном тракте может протекать бессимптомно как у мужчин (группы 1, 2 и 4), так и у женщин (группы 3 и 4), а может сопровождаться клинической симптоматикой, связанной с воспалительными процессами мочеполовых органов (у женщин группы 1 и 2, у мужчин группа 3).

Литература

1. WHO. Sexually transmitted and other reproductive tract infections. A guide to essential practice. Annex 3. Laboratory tests for STI. — Geneva, 2005.

2. Современные подходы к диагностике и лечению негонококковых уретритов / В.И. Кисина [и др.] // Consilium Medicum. — 2005. — Т. 7, № 1. — С. 32–34.

3. Юцковский, А.Д. Эффективность различных методов лечения урогенитальной инфекции / А.Д. Юцковский, Я.А. Юцковская // Вестн. дерматологии и венерологии. — 2003. — № 1. — С. 61–62.

4. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections in Belarus / O. Pankratov [et al.] // Acta Derm. Venerol. — 2011. — Vol. 91, № 1. — P. 64–65.

UROGENITAL ORGANS MUCOUS MEMBRANE MICROBIOCOENOSIS CONDITIONS RESEARCH IN PATIENTS WITH BACTERIAL VAGINOSIS

Shimanskaya I.G., Kostiuk S.A., Badigina N.A., Poluyan O.S., Rudenkova T.V.
Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Belarus

Urogenital organs mucous membrane microbiocoenosis conditions research performed in sexual partners (men and women) in couples with women has been diagnosed bacterial vaginosis. Main features of urogenital tract mucous membrane has been established applying PCR and microscopic methods. There were four clinico-microbiological variants of bacterial vaginosis progress revealed according with the investigation results and anamnestic data.

Keywords: bacterial vaginosis, methods of diagnostics, clinico-microbiological markers, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*.

Поступила 10.07.2014

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ В ПЛЕВРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ПЛЕВРИТАМИ

Янович О.О.[1], Титов Л.П.[1], Дюсьмикеева М.И.[2], Паплевка Т.В.[2]
[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;
[2]РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии, Минск, Беларусь,

Реферат. Туберкулезный плеврит одна из наиболее часто встречающихся форм внелегочного туберкулеза. Диагностика случаев туберкулезного плеврита затруднена из-за небольшого числа микобактерий в плевральной жидкости.

Активность АДА определяли с помощью тест-системы «АДА-ТЕСТ» (РНПЦ ЭМ).

Установлено, что в группе пациентов с туберкулезным плевритом активность аденозиндезаминазы в плевральной жидкости достоверно выше по сравнению с группой пациентов с плевритом нетуберкулезной этиологии. При пороговом значении 53 Ед/л диагностическая чувствительность метода составила 91%, специфичность — 93% (AUC = 0,94). Данные исследования показывают, что определение АДА в плевральной жидкости является простым, дешевым и высоко специфическим и чувствительным методом при диагностике туберкулезного плеврита.

Ключевые слова: аденозиндезаминаза, плевриты.

Введение. Плеврит — это воспалительный процесс в легочной или пристеночном листках плевры. Плеврит может быть самостоятельным заболеванием (первичный), но чаще является следствием острых и хронических процессов в легких (вторичный).

Причиной развития плеврита могут быть инфекционные агенты бактериальной и вирусной природы. Кроме того, плеврит могут вызывать такие неинфекционные заболевания и патологические состояния, как злокачественные опухоли, системные болезни соединительной ткани, болезни органов желудочно-кишечного тракта, инфаркт миокарда.

В дифференциальной диагностике плевритов важную роль играет плевральная пункция с обязательным лабораторным исследованием полученной плевральной жидкости. Воспалительные поражения плевры протекают с образованием и накоплением экссудата. В лабораторной диагностике проводят морфологическое и цитологическое исследование плевральной жидкости с определением ее клеточного состава (лейкоциты). В норме в небольшом количестве плевральной жидкости, образующейся в плевральной полости, содержится 2000–5000 в мм^3 эритроцитов и 800–900 в мм^3 лейкоцитов. При патологических состояниях наблюдается изменение клеточного состава плевральной жидкости. В зависимости от содержания форменных элементов крови экссудаты делятся на серозные, геморрагические и гнойные. О геморрагическом экссудате говорят в тех случаях, когда содержание эритроцитов свыше 5000 в мм^3. Экссудат считается гнойным, если в каждом его миллилитре содержится более 10000 лейкоцитов. Когда содержание форменных элементов крови оказывается ниже указанных величин, экссудат называется серозным [1].

Одной из основных причин развития плеврита является *M. tuberculosis*. Заболевание может развиваться на фоне туберкулеза легких или протекать как самостоятельная клиническая форма.

Несмотря на внедрение новых методов выявления *M. Tuberculosis*, диагностика случаев туберкулезного плеврита затруднительна. Далеко не всегда удается обнаружить микобактерии в плевральной жидкости. Известно, что из-за небольшого количества микобактерий в плевральной жидкости чувствительность методов по идентификации *M. tuberculosis* чрезвычайна низка — 0–5% при микроскопии и 25–37% при культуральных методах [2].

В связи с этим для улучшения дифференциальной диагностики туберкулезного плеврита предлагаются различные биологические маркеры, такие как аденозиндеаминаза (АДА), интерферон-гамма и другие цитокины [3–5].

Форменные элементы крови, находящиеся в плевральной жидкости в норме и патологии, могут быть источниками фермента аденозиндезаминазы. АДА играет важную роль в метаболизме пуриновых нуклеотидов и катализирует дезаминирование аденозина и дезоксиаденозина и превращение их в инозин и дезоксиинозин. Важность АДА выражается в нарушении функции клеток иммунной системы при врожденном отсутствии фермента, что приводит к врожденному первичному иммунодефициту — тяжелый комбинированный иммунодефицит [6].

Основной формой фермента, обнаруживаемой в различных тканях человека, является АДА1. Изофермент АДА2 обнаружен только в моноцитарно-макрофагальной системе и выделяется во внеклеточную среду при внутриклеточных инфекциях [7].

Цель работы — определение активности АДА и ее изоферментов в плевральной жидкости при туберкулезном плеврите и плеврите нетуберкулезной этиологии.

Материалы и методы. Пациенты с инфильтративным туберкулезом легких и туберкулезным плевритом наблюдались в РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии. Было проведено исследование 11 образцов плевральной жидкости пациентов с туберкулезным плевритом (средний возраст — 38,9±3,2 года, 5 мужчин и 6 женщин) и 14 образцов плевральной жидкости пациентов с нетуберкулезным плевритом (средний возраст — 51,7±3,4 года, 5 мужчин, 9 женщин).

Общую активность фермента АДА определяли с помощью разработанной в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии тест-системы «АДА-ТЕСТ». Для определения дезокси**аденозиндезаминазной** активности в качестве субстрата использовали дезоксиаденозин. Активность АДА2 была подсчитана путем вычитания общей активности АДА от 2-дезоксиаденозиндезаминазной (2-дезоксиАДА) активности используя различную аффинность АДА2 к различным субстратам.

Для статистического анализа полученных результатов была использована компьютерная программа SPSS Statistics. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка. Для сравнения двух групп использовался метод Манна–Уитни. Для оценки специфичности и чувствительности были построены характеристические ROC-кривые.

Результаты и их обсуждение. Было проведено исследование 25 образцов плевральной жидкости, полученной от пациентов с плевритами различного происхождения. Результаты определения активности АДА и ее изоферментов в плевральной жидкости представлены в таблице.

Установлено, что в группе пациентов с туберкулезным плевритом активность аденозиндезаминазы в плевральной жидкости достоверно выше по сравнению с группой пациентов с плевритом нетуберкулезной этиологии (74,6±7,9 против 21,9±4,3 Ед/л).

Таблица — Активность АДА и ее изоферментов в плевральной жидкости у пациентов с плевритами

Группы пациентов	АДА, Ед/л	АДА1, Ед/л	АДА2, Ед/л
Туберкулезный плеврит (n = 11)	74,6±7,9*	23,8±2,7*	61,3±3,8*
Нетуберкулезный плеврит (n = 14)	21,9±4,3	6,4±1,4	15,1±3,3

Примечание — *Достоверно при сравнении с группой пациентов с нетуберкулезным плевритом, $p<0,05$.

Построение характеристической ROC-кривой (рисунок 1) показало, что пороговым значением активности АДА в плевральной жидкости является величина 53 Ед/л.

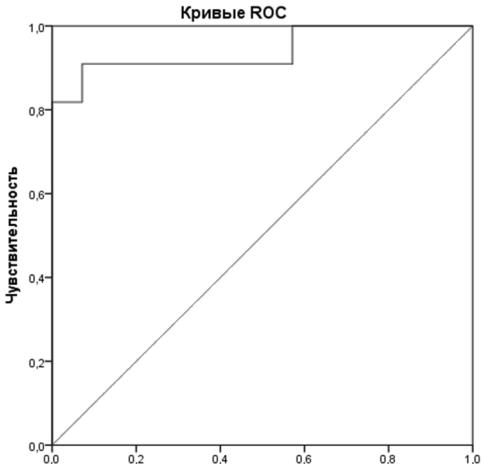


Рисунок 1 — Характеристическая ROC-кривая в диагностике туберкулезного плеврита тест-системой «АДА-тест» в плевральной жидкости

При диагностике туберкулезного плеврита по определению активности АДА в плевральной жидкости диагностическая чувствительность метода составила 91%, специфичность — 93% (AUC = 0,94). Показатель AUC свидетельствует о возможности использования данной тест-системы для диагностики туберкулезного плеврита.

Сравнение активности изоферментов в плевральной жидкости при различных формах плевритов показало достоверное повышение уровня как АДА1, так и АДА2 у пациентов с туберкулезным плевритом по сравнению с группой пациентов с нетуберкулезным плевритом. Необходимо отметить, что у всех пациентов с туберкулезным плевритом величина дезаминазного коэффициента (2-дезоксиАДА/АДА) меньше 0,45, что отражает преобладание АДА2 в общей активности АДА. У пациентов с нетуберкулезным плевритом коэффициент меньше 0,45 определялся в 75% случаев.

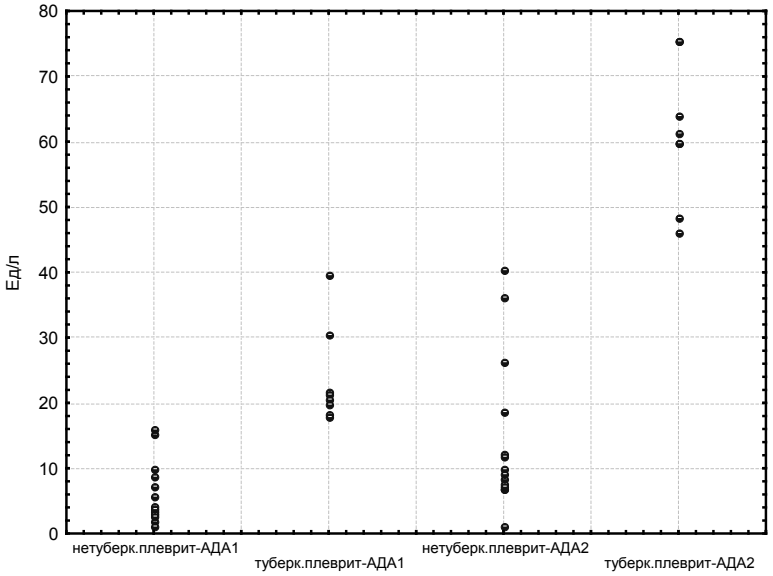


Рисунок 2 — Уровни изоферментов АДА у пациентов с плевритами различной этиологии

На рисунке 2 представлено распределение уровней изоферментов АДА в зависимости в двух изученных группах пациентов. У всех пациентов с туберкулезным плевритом уровень АДА1 был выше 17 Ед/л, а уровень АДА2 выше 43 Ед/л. Среди пациентов с нетуберкулезным плевритом активность АДА1 была ниже 17 Ед/л, а активность АДА2 ниже 43 Ед/л.

Актуальность внедрения во фтизиатрию информативных методов обусловлена трудностями диагностики при туберкулезе различной локализации. Определение уровня АДА является наиболее перспективным методом, т. к. может быть выполнено оперативно, не требует дорогостоящего оборудования и материалов [7].

Наше исследование подтверждает данные других исследователей [8, 9] о том, что у пациентов с туберкулезным плевритом в плевральной жидкости выявляется высокая активность АДА. Полученные данные позволяют считать тест положительным, если активность АДА в плевральной жидкости равна или выше 53 Ед/л. Анализ информативности показателя выявил его высокую диагностическую чувствительность (91%) и специфичность (93%) для дифференциальной диагностики туберкулезного плеврита.

В исследовании значения дезаминазного коэффициента указывают, что уровень общей активности АДА у пациентов с туберкулезным плевритом определяется в основном активностью изофермента АДА2. Такие же данные были получены и другими исследователями [8, 9], предположившими, что высокий уровень АДА в плевральной жидкости обусловлен стимуляцией моноцитарно-макрофагальной системы внутриклеточными патогенами (*M. tuberculosis*).

Наблюдаемое повышение уровня АДА1 может быть связано с костимуляторной ролью АДА1 в Т-клеточной пролиферации, не связанной с каталитической активностью фермента. В настоящее время установлено, что форма АДА1 может связываться с поверхностью лимфоцитов через дипептидил пептидазу IV/CD26, что вызывает стимуляцию пролиферации Т-лимфоцитов. Связывание АДА1 с CD26 усиливает функцию CD4+Th1, функция которых важна в противотуберкулезном иммунитете [10].

Полученные данные подтверждают высокую диагностическую значимость определения активности АДА в плевральной жидкости для дифференциальной диагностики туберкулезного плеврита.

Литература

1. Перельман, М.И. Фтизиатрия / М.И. Перельман, В.А. Корякин, И.В. Богадельникова. — 3-е изд., перераб и доп. — М.: Медицина, 2004. — 520 с.

2. Villegas, M.V. Evaluation of polymerase chain reaction, adenosine deaminase, and interferon-g in pleural fluid for the differential diagnosis of pleural tuberculosis / M.V. Villegas, L.A. Labrada, N.G. Saravia // Chest. — 2000. — Vol. 118, № 5. — P. 1355–1364.

3. Comparison of six biological markers for the diagnosis of tuberculous pleuritis / A. Hiraki [et al.] // Chest. — 2004. — Vol. 125. — P. 987–989.

4. Assay of pleural fluid interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma in the diagnosis and outcome correlation of tuberculous effusion / C.F. Wong [et al.] // Respir. Med. — 2003. — Vol. 97. — P. 1289–1295.

5. Сравнительная ценность биохимических маркеров клеточного иммунитета в диагностике туберкулезного плеврита / О.Т. Титаренко [и др.] // Клин. лаб. диагностика. — 2010. — № 1. — С. 46–49.

6. Hirschhorn, R. Plasma deoxyadenosine, adenosine and erythrocyte deoxyATP are elevated at birth in an adenosine deaminase-deficient child / R. Hirschhorn, V.R. Rubistein, P. Papageorgiou // J. Clin. Invest. — 1980. — Vol. 65. — P. 768–771.

7. Активность аденозиндезаминазы в различных биологических образцах у больных туберкулезом / О.О. Янович [и др.] // Современные проблемы диагностики и лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза: сб. науч. тр. — Минск, 2013. — С. 126–128.

8. Gakis, C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role / C. Gakis // Eur. Respir. J. — 1996. — Vol. 9. — P. 632–633.

9. Valdes, L. Adenosine deaminase (ADA) isoenzyme analysis in pleural effusions: Diagnostic role and relevance to the origin of increased ADA in tuberculous pleurisy / L. Valdes [et al.] // Eur. Respir. J. — 1996. — Vol. 9. — P. 747–751.

10. Pacheco, R. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse / R. Pacheco // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — Vol. 102. — P. 9583–9588.

EVALUATION OF ADENOSINE DEAMINASE ACTIVITY IN PLEURAL FLUIDS PATIENTS WITH TUBERCULOUS PLEURISY

O.O. Yanovich[1], *L.P. Titov*[1], *M.I.* Dyusmikeeva[2], *N.S. Shpakovskaya*[2], *T.V. Paplevka*[2]
[1]*Republican Scientific & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk;*
[2]*Republican Scientific & Practical Center for Pulmonology & Physiology, Minsk, Belarus*

Tuberculous pleurisy the most common form of extrapulmonary tuberculosis. Since tuberculous pleural effusion usually contains a low number of mycobacteria, the diagnostic sensitivity of both direct microscopy and pleural fluid cultures is relatively low.

This study aims to evaluate adenosine deaminase activity and its isoenzymes in patients with tuberculous pleurisy.

Adenosine deaminase activity level in pleural fluid was measured by «ADA-TEST» (RRPC Epidemiology & Microbiology, Minsk).

Pleural fluid ADA level was evaluated in all patients, and significant increase of pleural fluid ADA level in tuberculosis pleural effusion was observed. For a cut-off value of for diagnosis of tuberculous pleural effusion 53 U/L, sensitivity was found to be 91% and specificity 93%. The area under the ROC curve was 0.94.

We concluded that pleural fluid ADA analysis could be easy, cheap and highly sensitive and specific test for diagnosis of tuberculous pleurisy.

Keywords: adenosine deaminase, pleurisy.

Поступила 10.07.2014

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА САЛЬМОНЕЛЛЕЗА У ВЗРОСЛЫХ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ДОМИНИРУЮЩИХ СЕРОВАРОВ САЛЬМОНЕЛЛ

Богуцкий М.И.[1], Кузьмич И.А.[2], Гура Е.С.[2]
[1]Гродненский государственный медицинский университет, Гродно;
[2]Гродненская областная инфекционная клиническая больница, Гродно, Беларусь

Реферат. Изучена этиологическая структура сальмонеллезов у взрослых в г. Гродно в 2009–2013 гг. Наблюдались 752 пациента, больных сальмонеллезом, средний возраст которых составил 39,4±1,0 года.

Изучена чувствительность к антибактериальным препаратам 727 клинических изолятов (678 — *Salmonella enteritidis*, 49 — *S. typhimurium*). Показано, что основным возбудителем сальмонеллеза у взрослых является *S. enteritidis*. Серовар *S. enteritidis* и *S. typhimurium* значительно отличаются по устойчивости к ампициллину, доксициклину, цефепиму, цефтазидиму и нитрофурантоину. Для *S. typhimurium* характерна резистентность к большинству антибактериальных препаратов.

Ключевые слова: сальмонеллез, заболеваемость, серовары *Salmonella*, антибиотикорезистентность.

Введение. Сальмонеллез относится к инфекционным заболеваниям с повсеместным распространением. Несмотря на некоторую стабилизацию показателей заболеваемости ситуация по сальмонеллезу в Республике Беларусь остается достаточно сложной, составляя 4,55 на 100 тыс. населения [1, 6, 9]. В возрастной структуре заболевших преобладают дети [3, 4, 9]. Произошла смена доминирующего в прошлом серовара *S. typhimurium*, обладающего лекарственной полирезистентностью и способностью выступать в роли возбудителя внутрибольничного сальмонеллеза серовара *S. enteritidis* [2, 3, 7, 8, 9], данные о лекарственной резистентности которого не столь многочисленны, основаны на небольшом количестве наблюдений и порою противоречивы [2, 3, 7, 9]. Имеются сообщения, что для доминирующих в настоящее время сероваров сальмонелл характерна резистентность к большинству антибактериальных препаратов, в т. ч. цефалоспоринам III поколения и фторированным хинолонам [7, 9]. В связи с этим изучение этиологической структуры возбудителей сальмонеллеза и антибиотикочувствительности доминирующих сероваров, циркулирующих на определенной территории, весьма актуально для проведения эффективной этиотропной терапии.

Цель работы — изучение эпидемиологической роли различных сероваров сальмонелл в структуре заболеваемости сальмонеллезом взрослого населения в г. Гродно и определение лекарственной резистентности клинических изолятов доминирующих сальмонелл для совершенствования стартовой терапии.

Материал и методы. Под наблюдением находилось 752 больных сальмонеллезом старше 15 лет, пребывавших в стационаре «Гродненская областная инфекционная клиническая больница» в 2009–2013 гг. Этиологический диагноз устанавливался на основании клинико-эпидемиологических данных, бактериологического и серологического исследования. Определена чувствительность к антибиотикам у 727 клинических изолятов доминирующих сероваров сальмонелл (*S. enteritidis* — 678, *S. typhimurium* — 49).

Чувствительность определяли диско-диффузным методом с использованием дисков (bioMurieux, Франция).

В ходе исследования применялся сравнительно-статистический ретроспективный анализ.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования установлено, что средний возраст наблюдаемых 752 пациентов составил 39,4±1,0 год. Преобладали пациенты мужского пола (55,65%). Этиологическая структура возбудителей сальмонеллеза у взрослых в 2009–2013 гг. представлена в таблице 1.

Таблица 1 — Этиологическая структура возбудителей сальмонеллеза у взрослых пациентов в 2009–2013 гг. (абсолютное число/процент)

Серовары сальмонелл	2009 г.	2010 г.	2011 г.	2012 г.	2013 г.
S. enteritidis	161 87,5%	150 87,72%	140 93,3%	165 91,67%	62 92,54%
S. typhimurium	6 3,26%	18 10,53%	9 6,0%	11 6,11%	5 7,46%
S. infantis	1 0,54%	—	—	3 1,67	—
S. isangi	4 2,17	—	—	—	—
S. heidelberg	—	1 0,58%	—	—	—
S. arizona	—	—	1 0,67%	—	—
S. гр. 0:4 (B)	6 3,26%	—	—	—	—
S. гр. 0:7 (C)	6 3,26%	2 1,17%	—	1 0,55%	—
ИТОГО:	184	171	150	180	67

Как видно из данных таблицы 1, этиологическая структура возбудителей сальмонеллеза среди жителей г. Гродно достаточно разнообразна. Основным возбудителем сальмонеллеза является *S. enteritidis*, удельный вес которой среди других возбудителей возрос и в 2013 г. составил 92,54%, в то время как в 2008 г. сальмонеллез, вызванный *S. enteritidis*, имел место в 63,29% случаев [2]. Удельный вес *S. typhimurium* в структуре возбудителей сальмонеллеза за изучаемый период составил от 3,26% в 2009 г. до 7,6% в 2013 г. с небольшими колебаниями по годам. Всего за пятилетний период было зарегистрировано 49 случаев сальмонеллеза, вызванного сероваром *S. typhimurium*. Роль других сероваров в эпидемиологии сальмонеллеза на территории г. Гродно за изучаемый период незначительна. В целом заболеваемость находилась в пределах от 150 до 184 случаев в год с резким снижением в 2013 г. (67 случаев, $p<0,001$).

Таким образом, *S. enteritidis* в настоящее время является основным возбудителем сальмонеллеза, в то время как в конце прошлого века лидирующие позиции занимала *S. typhimurium* [1, 3, 9].

Как показал анализ чувствительности к антибиотикам клинических изолятов основных возбудителей сальмонеллеза *S. enteritidis* и *S. typhimurium* (таблица 2), данные серовары проявляли высокую чувствительность к норфлоксацину, ципрофлоксацину, цефтриаксону, цефепиму, цефтазидиму и меропенему.

Таблица 2 — Чувствительность к антибактериальным препаратам клинических изолятов сальмонелл, выделенных от взрослых пациентов, %

Антибактериальные препараты	*S. enteritidis*			*S. typhimurium*		
	Ч	П	Р	Ч	П	Р
Ампициллин	80	1,9	18,1	0	9,8	90,2
Доксициклин	57,2	7,1	35,7	7,1	7,2	85,7
Ципрофлоксацин	93,9	4,4	1,7	83,3	16,7	0
Норфлоксацин	100	0	0	100	0	0
Тобрамицин	94,2	2,9	2,9	50	0	50
Цефазолин	0	0	100	0	0	100
Цефтриаксон	100	0	0	100	0	0
Цефепим	97,7	2,3	0	66,7	0	33,3
Цефтазидим	98,4	1,6	0	75	0	25
Меропенем	100	0	0	100	0	0
Нитрофурантоин	62,1	10,3	27,6	25	0	75

Примечания:
1 — Ч — высокая чувствительность.
2 — П — промежуточная (слабая) чувствительность.
3 — Р — резистентность.

У 80% изолятов *S. enteritidis* сохранялась чувствительность к ампициллину, в то время как 90,2% изолятов *S. typhimurium* были резистентны к данному антибиотику (p<0,001). Высокая резистентность (87,5%) наблюдалась у *S. typhimurium* к доксициклину, в то время как изоляты *S. enteritidis* были резистентны лишь в 35,7% (з<0,01). Значительная резистентность (50%) наблюдается у *S. typhimurium* к тобрамицину, изоляты *S. enteritidis* проявляли к тобрамицину высокую чувствительность. К цефепиму резистентны изоляты *S. typhimurium* в 33,3% случаев, в то время как у *S. enteritidis* сохраняется высокая чувствительность к данному антибиотику. Все выделенные изоляты сальмонелл были резистентны к цефазолину. К нитрофурантоину чувствительны 62,1% *S. enteritidis* и лишь 25% *S. typhimurium*.

Таким образом, чувствительность к большинству антибактериальных препаратов *S. enteritidis* и *S. typhimurium* существенно различается. Изученные клинические изоляты *S. typhimurium* являлись полирезистентными с устойчивостью к большинству антибактериальных препаратов.

Выводы:

1. В настоящее время доминирующим возбудителем сальмонеллеза у взрослых является *S. enteritidis* , удельный вес которой в этиологической структуре заболевших в г. Гродно составляет 92,54%.

2. Сохраняет эпидемиологическую значимость в этиологии сальмонеллеза *S.typhimurium* (7,46%).

3. Серовары *S. enteritidis* и *S. typhimurium* значительно отличаются по устойчивости к ампициллину, доксициклину, цефепиму, цефтазидиму и нитрофурантоину.

4. Для серовара *S. typhimurium* характерна резистентность к большинству антибактериальных препаратов.

5. Для проведения эффективной этиотропной терапии необходимо использовать данные о чувствительности сероваров сальмонелл, циркулирующих на данной территории.

Литература

1. Богуцкий, М.И. Сальмонеллезная инфекция в современный период / М.И. Богуцкий, А.В. Васильев, В.М. Цыркунов // Мед. панорама. — 2009. — № 7. — С. 3–4.

2. Богуцкий, М.И. Этиологическая структура сальмонеллеза в условиях города / М.И. Богуцкий, И.А.Кузьмич // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; ред. кол.: Г.М. Игнатьев [и др.]. — Минск: Смэлток, 2010. — С. 145–148.

3. Богуцкий, М.И. Лекарственная резистентность *S. enteritidis*, выделенных от детей / М.И. Богуцкий, И.А.Кузьмич, Ю.В.Кравчук // Актуальные вопросы этиотропной терапии при инфекционных заболеваниях у детей: тез. Респ. науч. семин. с междунар. участием к 25-лет. юбил. каф. детск. инфекц. болезней УО БГМУ, Минск, 28 мая 2010 г. / Ред. кол.: И.Г. Германенко [и др.]. — Минск: Доктор Дизайн, 2010. — С. 19–21.

4. Галькевич, Н.В. Выбор эмпирической терапии при сальмонеллезе / Н.В. Галькевич [и др.] // Актуальные вопросы этиотропной терапии при инфекционных заболеваниях у детей: тез. Респ. науч. семин. с междунар. участием к 25-лет. юбил. каф. детск. инфекц. болезней УО БГМУ, Минск, 28 мая 2010 г. / Ред. кол.: И.Г. Германенко [и др.]. — Минск: Доктор Дизайн, 2010. — С. 28–30.

5. Дмитраченко, Т.И. Сальмонеллезы, клинико-эпидемиологические и микробиологические аспекты терапии / Т.И. Дмитраченко, В.М. Семенов. — Витебск: ВГМУ, 2001. — 148 с.

6. Этиотропная терапия острых кишечных инфекций у детей / А.А. Ключарева [и др.] // Здравоохранение. — 2004. — № 7. — С. 45–53.

7. Крылова, Е.В. Бактериальные кишечные инфекции у детей / Е.В. Крылова [и др.] // Актуальные вопросы инфекционной патологии: материалы 6–го съезда инфекционистов Республики Беларусь, Витебск, 29–30 мая 2014 г. / Ред. кол.: В.М. Семенов [и др.]. — Витебск, 2014. — С. 96–97.

8. Эпидемиологические особенности внутрибольничного сальмонеллеза, принципы профилактики / Д.Н. Лавринович [и др.] // Мед. панорама. — 2007. — № 4. — С. 18–22.

9. Тапальский, Д.В. Микробиологические, молекулярно-генетические и клинико-эпидемиологические особенности сальмонеллезов у детей раннего возраста: автореф. дис. … канд. мед. наук: 03.00.07 / Д.В. Тапальский; Бел. гос. мед. ун-т. — Минск, 2006. — 24 с.

ETIOLOGICAL STRUCTURE OF SALMONELLOSIS IN ADULTS AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF CLINICAL ISOLATES OF DOMINANT SALMONELLA SEROVARS

Bogutski M.I.[1], Kuzmich I.A[2], Gura E.S.[2]
[1]Grodno State Medical University, Grodno;
[2]Grodno Clinical Infectious Hospital, Grodno, Belarus

We assessed etiological structure of salmonellosis in adults residing in Grodno in 2009–2013 and antibiotic sensitivity of 727 clinical isolates of dominant Salmonella serovars. It was demonstrated that the most common pathogen in salmonellosis was *S. enteritidis* (92.54%). *S. enteritidis* and *S. typhimurium* were considerably differed by their resistance to ampicillin, doxycyclin, cefepime, ceftazidime and nitrofurantoin. *S. typhimurium* was resistance to most antibacterial agents.

Keywords: salmonellosis, morbidity, serovars, *Salmonell,* antibiotic resistance.

Поступила 20.06.2014

ИЗЫСКАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СВОЙСТВ СРЕДИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ПРОДУКТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В РАЗРАБОТКЕ ПОДХОДОВ К МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ ТЕРАПИИ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Бореко Е.И.
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Приведены основные результаты многолетней деятельности по изучению противовирусных свойств и эффективности при экспериментальном герпесе лабораторных животных различных веществ и субстанций, включая медикаменты различного назначения и лекарственные растения. Представлены главные количественные характеристики противовирусного действия 2’-дезокси-2’-фторгуанозина, O^2,2′-циклоцитидин-5′-монофосфата, N-3-этиладамантил-1-этилкарбамата, 3-этиладамантан-1-ола, 2-аминотиазолиновой соли 1-адамантанкарбоновой кислоты, 2-гидрокси-3,5-ди-трет-бутил-N-фениланилина, тинидазола и метронидазола, а также их комбинаций с ацикловиром. Приведена информация о лекарственных растениях, настои и отвары которых ингибируют репродукцию вируса герпеса и нейтрализуют его инфекционность. Полученные результаты реализованы в разработках новых противовирусных средств – бутаминофен, нуклеавир, актовир, фитогор, а также способа эффективной терапии хронических герпесвирусных энцефалитов.

Ключевые слова: противовирусные препараты, герпесвирусные инфекции, лечение.

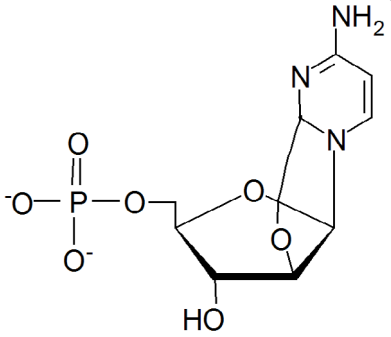
Введение. Герпесвирусные инфекции по распространенности находятся на втором месте после гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций. К настоящему времени вирусом герпеса простого инфицированы от 60 до 90% населения [1]. Генитальный герпес — один из самых распространенных видов инфекционной патологии человека со всеми признаками эпидемии [2]. Принято считать, что выделение устойчивых вариантов вируса герпеса простого, несмотря на десятилетия применения ацикловира (АЦВ) и его аналогов, составляет доли процента и несколько выше у пациентов с иммунодефицитами (4–7%) [3, 4]. По этому поводу следует заметить, что хронический рецидивирующий герпес — это наиболее частая форма эндогенной инфекции, и у таких пациентов имеют место неоднократные эпизоды применения АЦВ. Согласно нашим данным, от всех обследованных с урогенитальной патологией выделены вирусы герпеса простого, чаще 2 типа, в той или иной степени устойчивые к действию АЦВ [5].

Важность поиска и разработки новых средств эффективного ингибирования вирусов герпеса обусловлена не только случаями устойчивости возбудителя к АЦВ как наиболее широко применяемому препарату, но также существованием форм герпесвирусных инфекций, при которых АЦВ недостаточно эффективен. Использование противовирусных средств с различающимся механизмом действия в комбинации приводит к аддитивному или синергическому эффекту, и для реализации этой возможности в медицинской практике необходимо расширение спектра доступных препаратов.

Многолетнее изучение синтетических и природных веществ, включая медикаменты различного назначения и лекарственные растения, привело к получению массива данных об их противовирусных свойствах [6]. Часть этих данных, имеющая отношение к ингибированию репродукции вируса герпеса, использована в разработке новых лекарственных средств и способов терапии различных форм герпесвирусной инфекции.

Среди синтетических веществ привлекали внимание, прежде всего, нуклеозиды и нуклеотиды как источник нескольких поколений препаратов с вирусингибирующими свойствами в отношении вирусов герпеса [7]. В результате выполненных исследований установлено, что чаще всего выраженные противовирусные свойства проявляли производные гуанина, в частности, в отношении вируса герпеса. В соответствии с этой закономерностью у перспективного соединения, **2'-дезокси-2'-фторгуанозина**, и без того уже известного исключительной особенностью избирательного противовирусного действия в отношении вирусов гриппа в клетках эпителия дыхательных путей человека [8–10], нами впервые установлены еще более выраженные вирусингибирующие свойства в отношении вируса герпеса, EC_{50} = 0,03 мкг/мл [11–13].

Как и производные гуанина, производные цитозина имеют самый высокий рейтинг активности в отношении вируса герпеса. Одним из наиболее высокоэффективных соединений с противовирусными свойствами является **O^2, 2′-циклоцитидин-5′-монофосфат** (циклоцитидинфосфат, ЦМФ) [14].



O^2,2′-циклоцитидин-5′-монофосфат

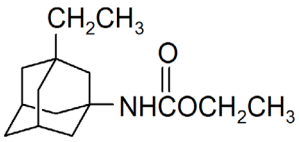
В экспериментах на культуре клеток первичных фибробластов эмбрионов кур, инфицированной вирусом герпеса простого, установлено, что ЦМФ несколько уступает в эффективности АЦВ и превышает эффективность фосфорноуксусной кислоты (ФК). ЦМФ имеет преимущество перед АЦВ и ФК в случае инфицирования культуры клеток вариантами вируса герпеса, устойчивыми к действию этих препаратов. Его эффективность в этом случае снижается незначительно, в то время как у АЦВ и ФК она падает в 20−40 раз [15].

В испытаниях при экспериментальном герпетическом менингоэнцефалите белых мышей ED_{50} ЦМФ составила 4,21 (21,8÷0,81) мг/кг при внутрибрюшинном инфицировании животных и 120,63 (549,41÷26,49) мг/кг при внутримозговом (введение препарата через зонд в желудок в обоих случаях). ED_{50} АЦВ в сравнимых экспериментальных условиях при внутрибрюшинном инфицировании животных составила 0,1 (1,41÷0,008) мг/кг, при внутримозговом — более 50 мг/кг.

Показана эффективность мазевой лекарственной формы ЦМФ при экспериментальном герпетическом кератоконъюнктивите кроликов и морских свинок, заключающаяся в редукции симптомов заболевания и снижении выделяемости возбудителя из тканей глаз, крови и мозга животных [15].

На основе ЦМФ разработаны и выпускаются РУП «Белмедпрепараты» противовирусные средства «Нуклеавир мазь 5%» и «Нуклеавир мазь глазная в тубах по 5 г, 10 г».

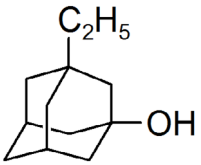
Среди новых производных адамантана обнаружено смещение спектра вирусингибирующего действия (в сравнении с известными противогриппозными препаратами амантадином и ремантадином), в т. ч. на ДНК-содержащие вирусы герпеса и оспенной вакцины. Наиболее изученными из групп соединений с такими свойствами являются адамантилкарбаматы, адамантилкарбоксилаты и адамантанолы.



N-3-этиладамантил-1-этилкарбамат

N-3-этиладамантил-1-этилкарбамат исследован в связи с разработкой нового противогерпетического препарата «Этмантин» [16–18]. В экспериментах на культуре клеток эмбрионов кур соединение обладает выраженной способностью подавлять размножение вируса герпеса и оспенной вакцины в диапазоне концентраций 50−6 мкг/мл со снижением инфекционного титра вирусов на величину не менее 1,6 lg БОЕ/мл (EC_{50} = 0,62 (0,89÷0,42) мкг/мл и 5,15 (6,63÷3,99) мкг/мл соответственно) и менее значительным ингибированием размножения аденовируса в культуре клеток почек эмбриона человека, заключающемся в подавлении цитопатического эффекта в ½ максимальной концентрации, не вызывающей заметных цитотоксических изменений неинфицированного монослоя культуры клеток (максимальная переносимая концентрация, МПК). Более наглядное представление об эффективности препарата дают результаты испытаний при экспериментальной герпетической нейроинфекции лабораторных животных. В этих условиях N-3-этиладамантил-1-этилкарбамат обладает способностью снижать летальность животных (в т. ч. при инфекции, вызванной вариантом вируса, устойчивым к действию АЦВ) на 60−75%. Более высокая эффективность выявлена при внутрибрюшинном способе инфицирования животных. Снижение летальности под влиянием N-3-этиладамантил-1-этилкарбамата в сравнении с контролем достигает от >50 до 85%. N-3-этиладамантил-1-этилкарбамат является малотоксичным соединением. Его LD_{50} при однократном введении в желудок составляет для белых мышей 1831,8 (1754,1÷1912,9) мг/кг. Соответственно этому соотношение LD_{50}/ED_{50} (k) составляет 11,0−23,0 при инфекции, вызванной интрацеребральным введением вируса герпеса и более 18000 — при инфекции, вызванной вирусом, введенным интраперитонеально [19].

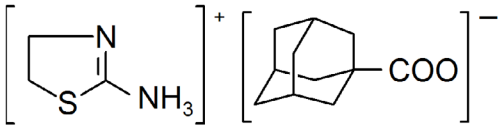
Эффективность N-3-этиладамантил-1-этилкарбамата подтверждена в экспериментах при герпетическом кератоконъюнктивите морских свинок и кроликов, установлена эффективность 1−3% глазной мази [16]. Безвредность N-3-этиладамантил-1-этилкарбамата изучалась в связи с разработкой нового противогерпетического средства наружного применения [20]. Изучена острая и хроническая токсичность, эмбриотоксическое, тератогенное, мутагенное, канцерогенное, аллергизирующее действие и др.



3-Этилада-мантан-1-ол

3-этиладамантан-1-ол в экспериментах на культуре клеток эмбрионов кур обладает способностью подавлять размножение вируса герпеса в диапазоне концентраций 200−50 мкг/мл (EC_{50} = 52,3(62,5÷43,8)). Соединение менее токсично для культуры клеток в сравнении с N-3-этиладамантил-1-этилкарбаматом, однако величина снижения титра вируса в его присутствии существенно меньше.

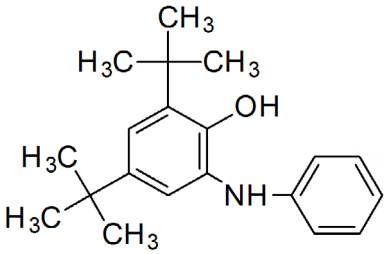
Такие же выводы о токсичности и эффективности 3-этиладамантан-1-ола в сравнении с N-3-этиладамантил-1-этилкарбаматом следуют и из результатов, полученных в экспериментах на животных. Острая LD_{50} соединения для белых мышей при внутрижелудочном введении составляет 3732,4 (2935,9÷4745,0) мг/кг. Таким образом, 3-этиладамантан-1-ол в 2 раза менее токсичен для животных, чем N-3-этиладамантил-1-этилкарбамат. Эффективность 3-этиладамантан-1-ола при экспериментальной герпетической нейроинфекции белых мышей уступает показателю N-3-этиладамантил-1-этилкарбамата. Максимальное снижение летальности животных достигает 42,8%, ED_{50} = 3,16 (13,0÷0,8) мг/кг. Широта фармакологического действия (k) 3-этиладамантан-1-ола, вычисленная как соотношение LD_{50}/ED_{50}, составляет 1181,1 [19].



2-Аминотиазолиновая соль 1-адамантан-карбоновой кислоты

2-аминотиазолиновая соль 1-адамантанкарбоновой кислоты. В экспериментах на культуре клеток установлена способность 2-аминотиазолиновой соли 1-адамантанкарбоновой кислоты подавлять размножение вирусов герпеса, гриппа, везикулярного стоматита и венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ). Наиболее высокая активность со снижением титра вируса >1,6 lg БОЕ/мл зарегистрирована в отношении вируса герпеса (концентрации 100−12 мкг/мл), несколько менее выраженная — в отношении вирусов гриппа, везикулярного стоматита (концентрации 100−25 мкг/мл) и ВЭЛ (концентрации 100−50 мкг/мл) [21].

В экспериментах на лабораторных животных 2-аминотиазолиновая соль 1-адамантанкарбоновой кислоты более токсична (LD_{50} при однократном внутрижелудочном введении белым мышам составляет 730 (634÷841) мг/кг). При экспериментальном герпетическом менингоэнцефалите белых мышей соединение снижает летальность животных на 51,5−69,7% в сравнении с контролем, имеет место линейное нарастание эффекта в диапазоне доз 0,1−200 мг/кг. Среднеэффективная доза (ED_{50}) не достигнута, но близка к 0,1 мкг/мл. Следовательно, соотношение LD_{50}/ED_{50} немногим превышает 7300.



Бутаминофен

Одной из наиболее интересных групп ароматических соединений с противовирусными свойствами являются производные **бутаминофена** (2-гидрокси-3,5-ди-трет-бутил-N-фенил-анилина) с преимущественной активностью в отношении вируса герпеса. Бутаминофен эффективен при экспериментальной герпетической нейроинфекции белых мышей и кератоконъюнктивите морских свинок и кроликов [22]. Соединение проявляет также противовирусное действие в отношении вируса герпеса и его лекарственно-устойчивых вариантов в культуре клеток (EC_{50} = 8,7 (18,4÷4,1) мкг/мл), обладает выраженной способностью к синергизму противовирусного эффекта в сочетании с АЦВ, ФК, ЦМФ. Наряду с вирусингибирующими свойствами бутаминофен обладает вирулицидной активностью. Установлено снижение проявлений экспериментального кожного герпеса под влиянием местного применения мазей бутаминофена, АЦВ и сочетания бутаминофена и АЦВ (средняя выраженность признаков на пике инфекции в группах животных 0,68; 0,57 и 0 баллов соответственно, в группе мазевой основы — 1,22 балла) [23, 24]. На основе бутаминофена разработаны новые противовирусные препараты наружного применения «Бутаминофен 2% мазь» и «Актовир» (содержит бутаминофен и АЦВ). Оба средства выпускаются РУП «Белмедпрепараты».

В итоге изучения ***медикаментов*** с различными показаниями к применению обнаружены антивирусные свойства у препаратов разных фармакологических групп. Согласно полученным данным противовирусная активность медикаментов различного назначения с установленными нами противовирусными свойствами не столь значительна, как у признанных противовирусных препаратов.

Однако когда речь идет об использовании разрешенных к применению медикаментов в качестве противовирусных средств, степень противовирусной активности, особенно в случаях инфекций, где предполагается совместное применение с уже имеющимися высокоэффективными противовирусными препаратами, не столь важна. Главное для таких лекарственных препаратов — патоге-

нетическая приемлемость при данной вирусной инфекции. Противовирусной активности может вообще не быть, сочетание препаратов все равно даст позитивный результат. Но даже исчезающе малые противовирусные свойства могут существенно усилить эффект базисного препарата или компенсировать его недостатки.

Два препарата ряда имидазола, тинидазол и метронидазол, традиционно предназначены для лечения заболеваний, вызванных бактериями и простейшими. Интерес к этим медикаментам связан с их уникальной особенностью проникновения через гематоэнцефалический барьер [25]. Эта особенность тинидазола и метронидазола привлекла внимание, прежде всего в связи с тем, что несмотря на, казалось бы, интенсивное создание новых противовирусных средств, ни одно из них в полной мере не обладает подобными свойствами и, следовательно, они малопригодны в случаях осложненного течения заболевания.

Как известно, одной из наиболее тяжелых форм течения герпетической инфекции является энцефалит. Герпетическую природу имеют около 10% всех энцефалитов, 0,6% асептических менингитов и 20% менингоэнцефалитов. В США ежегодно диагностируется около 5 000 случаев заболевания герпетическим энцефалитом. При этом у 1/3 больных заболевание заканчивается летально, еще у 1/3 имеют место нервно-психические осложнения [26–28]. Аналогичная картина имеет место в Республике Беларусь. Здесь с 1987 г. по сравнению с 1984−86 гг. отмечается практически двукратный прирост числа первичных вирусных энцефалитов у взрослых, особенно в Минске, в Гомельской и Могилевской областях.

Специфическая терапия острого герпетического энцефалита с использованием АЦВ достаточно эффективна, тогда как у больных с хроническим герпетическим энцефалитом, даже несмотря на применение препарата, заболевание в 80% случаев заканчивается летально, а выжившие остаются инвалидами [29–33].

В связи с этим нами были изучены противовирусные свойства тинидазола и метронидазола и их сочетаний с АЦВ [34]. Установлено, что оба препарата, тинидазол и метронидазол, обладают противовирусными свойствами в отношении вируса герпеса простого, значительно уступающими активности АЦВ (EC_{50} = 51,4, 13,2 и 0,11 мкг/мл соответственно), но сочетания тинидазол + АЦВ и метронидазол + АЦВ проявляют выраженный синергидный противовирусный эффект (EC_{50} в сочетаниях: тинидазола — 4,20 мкг/мл, метронидазола — 7,4 мкг/мл, АЦВ — 0,015–0,03 мкг/мл). Совместное применение сочетаний препаратов при экспериментальном герпетическом менингоэнцефалите белых мышей дает увеличение эффективности в 100 раз и более в сравнении с их раздельным использованием, в т. ч. АЦВ (определено по уменьшению минимальной дозы 100% выживаемости животных, ED_{100}) [34–36].

Учитывая, что АЦВ (синонимы: ациклогуанозин, виролекс, зовиракс) является единственным доступным лекарственным средством, которое применяется при угрожающем развитии энцефалита на фоне герпетической инфекции в основном с профилактической целью, было предложено дополнить профилактические меры одновременным применением тинидазола (метронидазола) [35]. Такое сочетание могло дать эффект и в случае уже развившегося энцефалита, когда применение одного ациклогуанозина практически безрезультатно.

Комбинированное использование противобактериальных препаратов имидазольного ряда совместно с АЦВ при герпетических энцефалитах предложено в медицинской практике [36, 37]. Использовался метронидазол, поскольку в Беларуси была доступна инъекционная лекарственная форма только этого препарата. Метронидазол и АЦВ вводили больным внутривенно капельно в стандартных, разрешенных к применению по основному назначению, дозировках. Комбинацию препаратов применяли в запущенных случаях с поздним установлением диагноза и неблагоприятным прогнозом для жизни, когда назначение одного АЦВ могло быть уже безрезультатным. Во всех случаях имело место полное восстановление функций головного мозга и трудоспособности больных. С началом использования комбинированной терапии герпетического энцефалита случаев летальности, вызванных этим заболеванием, в Беларуси практически не было.

Индивидуальное противовирусное действие, а также потенцирующий эффект при комбинированном применении с АЦВ предполагает возможность назначения предлагаемых сочетаний препаратов и при других формах герпетической инфекции.

Среди ***продуктов природного происхождения*** установлены противовирусные свойства фильтратов культуральной жидкости грибов, продуктов окисления торфа, полисахаридов из растений и

водорослей, настоев и отваров лекарственных растений и водных экстрактов морских беспозвоночных. Противовирусные свойства фильтратов культуральной жидкости грибов установлены в экспериментах с разными вирусами, в т. ч. герпеса. Более активны продукты окисления торфа [38, 39]. Особое значение имеют результаты изучения противовирусных свойств настоев и отваров ***лекарственных растений***. В связи с широким применением в медицинской практике таких традиционных лекарственных форм обнаружение их противовирусных свойств предполагает возможность расширения показаний к применению, и это является малозатратным путем реализации потенциала, заложенного в лекарственных растениях.

Изучены противовирусные свойства настоев и отваров 124 лекарственных растений, применяемых с различными показаниями, в основном в научной медицине. Лишь немногие из них (3,2% от общего количества исследованных) обладали выраженной способностью подавлять размножение тех или иных вирусов в культуре клеток. В частности, в отношении вируса герпеса установлены выраженные вирусингибирующие свойства водных извлечений можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis L.*) и подофилла щитовидного (*Podophyllum peltatum L.*). Дополнительно исследовали настойку можжевельника, приготовленную стандартным способом, а также водно-спиртовые экстракты различных частей растения с разными концентрациями этанола и экспозицией с упариванием в роторном испарителе. Наиболее активными были спиртовые вытяжки можжевельника (плоды, хвоя) [40].

Нами также установлено, что в отличие от способности подавлять размножение вирусов в культуре клеток, встречающейся у водных извлечений некоторых растений, вирулицидными (вируснейтрализующими) свойствами в отношении вируса герпеса при достаточно длительной экспозиции (24 ч) обладает подавляющее большинство из них — 81,5%. Наиболее выраженными вирулицидными свойствами обладают представители семейств брусничных, березовых, миртовых, кипарисовых, розоцветных, дербенниковых, лоховых, губоцветных. У настоев многих растений этих семейств вирулицидное действие достигалось быстро, практически сразу после объединения с суспензией вируса (почки березы, лист эвкалипта, лист земляники, плоды рябины черноплодной, ягоды облепихи, цветы и трава Иван-чая, цветы зверобоя и липы, душица обыкновенная, мята перечная, спорыш). Вирулицидные свойства настоев листа земляники, рябины обыкновенной и черноплодной (розоцветные), сушеницы топяной, череды трехраздельной (сложноцветные), спорыша (губоцветные), мха исландского (сфагновые), окопника лекарственного (бурачниковые), хмеля (коноплевые) и некоторых других растений установлены нами впервые [40].

Широкая распространенность свойства нейтрализации инфекционности вирусов обусловлена содержащимися в растениях соединениями, в основном полифенольного комплекса, преобладающей группой среди которых являются флавоноиды. Все эти вещества считаются потенциально обладающими антиоксидантными свойствами, и с этим связана их антикарциногенная, предотвращающая старение, противовоспалительная, иммуномодулирующая, противоаллергенная, противомикробная, противовирусная и другая активность [41–43]. Признается, что компоненты с противовирусными свойствами являются частью эволюционно сложившейся системы защиты растений от неблагоприятных внешних воздействий, в т. ч. инфекций [44].

Многокомпонентность химического состава является основным признаком, отличающим простейшие традиционно используемые лекарственные формы из растений от синтетических ингибиторов размножения вирусов и препаратов из природного сырья, представленных единственным действующим началом. В большей степени многокомпонентность присуща сборам, состоящим из различных растений. Благодаря этому они могут проявлять вирулицидные и вирусингибирующие свойства одновременно и обладать комплексом других позитивных свойств, включая адаптогенное и иммуномодулирующее действие, что способствует в целом более высокой эффективности на уровне организма.

В качестве примера могут быть приведены результаты выполненных нами исследований противовирусных свойств сбора трав «Фитогор» [45, 46]. Первоначально сбор был разрешен к применению в основном как общеукрепляющее и тонизирующее средство, повышающее иммунитет и сопротивляемость организма к возникновению инфекционных заболеваний, злокачественных новообразований, нормализующее кроветворную функцию во время химио- и радиотерапии онкологических пациентов, оказывающее позитивное влияние на обмен веществ, способствующее выведе-

нию тяжелых металлов и радионуклидов. Нами установлены вирусингибирующие и вирулицидные свойства настоя фитогора в отношении вирусов гриппа и герпеса простого, в т. ч. вариантов этих вирусов, устойчивых к действию ремантадина и АЦВ соответственно. Кроме того, настой сбора трав обладает вирулицидными свойствами в отношении вируса ЕСНО 6.

Общеизвестным недостатком синтетических лекарственных препаратов является наличие многих побочных эффектов, некоторые из них выявляются даже после длительного практического применения. С учетом этой особенности лекарственная терапия средствами природного происхождения, хотя и не лишенная абсолютно аналогичного недостатка, поскольку воздействие растений на организм редко бывает моновалентным, представляется более щадящей процедурой. Причина – эволюционно сложившаяся система детоксикации организмом человека и животных ксенобиотиков, встречающихся в природе. В частности, сущность метода фитотерапии заключается во введении в организм биологически активных веществ в их естественном виде и наиболее легко усвояемых формах [47]. Препараты, получаемые из растительного сырья, включая традиционно используемые настои, отвары и другие простейшие лекарственные формы, могут применяться длительно, подбираться индивидуально в соответствии с другими известными показаниями к применению, чередоваться, использоваться в виде комбинаций и сборов лекарственных растений. Они могут применяться в комплексной терапии хронической рецидивирующей инфекции, направленной на купирование проявлений герпеса в периоды активации, и профилактическое воздействие, увеличивающее интервалы между рецидивами.

Результаты выполненной разработки являются итогом многолетнего изучения противовирусных свойств и эффективности различных веществ и субстанций при экспериментальном герпесе лабораторных животных и расширяют возможности в выборе средств и подходов при лечении герпесвирусной инфекции.

Литература

1. Современная терапия герпесвирусных инфекций: руководство для врачей / В.А. Исаков [и др.]. — СПб.; М., 2004. — 168 с.

2. Галегов, Г.А. Лекарственная терапия герпес-вирусной инфекции: фундаментальные аспекты и современные клинические достижения / Г.А. Галегов // Consilium Medicum. — 2002. — Т. 4, № 5. — С. 240–243.

3. Levin, M.J. Resistance of Herpes Simplex Virus Infections to Nucleoside Analogues in HIV-Infected Patients / M.J. Levin, T.H. Bacon, J.J. Leary // Clin. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 39, suppl. 5. — P. 248–257.

4. Genotypic detection of acyclovir-resistant HSV-1: Characterization of 67 ACV-sensitive and 14 ACV-resistant viruses / E. Frobert [et al.] // Antiviral Res. — 2008. — Vol. 79. — P. 28–36.

5. Выявление лекарственно-устойчивых форм герпетических инфекций у пациентов с урогенитальной патологией / Е.И. Бореко [и др.] // Мед. панорама. — 2014. — № 1. — С. 30–34.

6. Бореко, Е.И. Основные достижения в разработке новых веществ и лекарственных средств с противовирусными свойствами / Е.И. Бореко // Роль антропоген. и природн. патогенов в формировании инфекц. и неинфекц. болезней человека. Медико-экол. аспекты: материалы Междунар. конф., Минск, 8–9 окт. 2002 г. / Гос. учрежд. НИИ эпидемиол. и микробиол.; редкол. Л.П. Титов [и др.]. — Минск: НЕССИ, 2002. — С. 292–311.

7. De Clercq, E. In search of a selective antiviral chemotherapy / E.De Clercq // Clin. Microbiol. Rev. — 1997. — Vol. 10, № 4. — P. 674–693.

8. Inhibition of influenza trascription by 2’-deoxy-2’fluoroguanosine / M. Tisdale [et al.] // Antimicrob. Ag. Chemother. — 1995. — Vol. 39. — P. 2454–2458.

9. Rollins, B.S. Comparative anti-influenza virus activity of 2’-deoxy-2’-fluororibosides in vitro / B.S. Rollins, A.H.A. Elkhatieb, F.G. Hayden // Antiviral Res. — 1993. — Vol. 21. — P. 357–368.

10. Tuttle, J.V. Inhibition of influenza A and B viruses by 2’-deoxy-2’-fluororibosides / J.V. Tuttle, M. Tisdale, T.A. Krenitsky // J. Med. Chem. — 1993. — Vol. 36. — P. 119–125.

11. Противовирусная активность 2’-дезокси-2’-фторгуанозина в отношении вирусов гриппа и герпеса простого в культурах клеток / Е.И. Бореко [и др.] // Вопр. вирусологии. — 2001. — Т. 46, № 5. — С. 40–42.

12. Chemical and enzymatic synthesis and antiviral properties of 2'-deoxy-2'-fluoroguanosine / G.V. Zaitseva [et al.] // Nucleosides, nucleotides and their biological applications: abstr. XIII Int. Round Table, Montpellier, France, Sept. 6–10, 1998. Poster 61. — P. 58.

13. Chemical and enzymatic synthesis and antiviral properties of 2’-deoxy-2’-fluoroguanosine / G.V. Zaitseva [et al.] // Nucleosides & Nucleotides. — 1999. — Vol. 18, № 4–5. — P. 687–688.

14. Синтез O^2,2′-циклоцитидина и его 5′-монофосфата / А.А. Ахрем [и др.] // Биоорг. химия. — 1977. — Т. 3, № 6. — С. 845−847.

15. Противовирусные свойства циклоцитидинмонофосфата / Е.И. Бореко [и др.] // Новые лекарств. ср-ва: синтез, технология, фармакология, клиника: материалы Междунар. научн. конф. — Минск, 2001. — С. 18–19.

16. Характеристика специфической активности нового производного адамантана с противовирусными свойствами / Е.И. Бореко [и др.] // IX Всесоюз. симп. по целенаправл. изысканию лекарственных веществ: материалы

науч. конф., Юрмала, 22–24 янв. 1991 г. / Институт органич. синтеза Латв. АН; редкол.: Г.А. Вайнберг [и др.]. — Рига, 1991. — С. 80.

17. N-(3-этиладамантил-1)- этилкарбамат, обладающий противовирусной активностью и способ его получения: а.с. 1721048 СССР, МКИ3 С 07 С 269/06, 271/24, А 61 К 31/27 / Ю.Н. Климочкин [и др.]; Самар. политех. ин-т им. В.В. Куйбышева, Белорус. НИИ эпидемиол. и микробиол.; Минск. гос. мед. институт, Институт вирусол. им. Д.И. Ивановского АМН СССР. — № 4813502/04; заявл. 26.02.90; опубл. 23.03.92 // Изобретения. — 1992. — № 11. — С. 81.

18. The new adamantane derivative inhibiting DNA viruses reproduction / E.I. Boreko [et al.] // Antiviral Res. — 1994. — Vol. 23, suppl. I. — 202. – P.142 (Abstr. 7th Int. Conf. on Antiviral Research, Charleston, SC, USA, 27.02 — 4.03.94).

19. Результаты исследования противовирусных свойств производных адамантана / Е.И. Бореко [и др.] // Панорама современ. химии России. Успехи химии адамантана: сб. обзор. ст. / Изд. «Химия» при поддержке ФФИ АН Республики Башкортостан ; редкол.: Н.С. Зефиров [и др.]. — М.: Химия, 2007. — С. 70–88.

20. Изучение возможного мутагенного, эмбриотоксического, тератогенного и иммуномодулирующего действия нового производного адамантана — этмантина / Э.А. Изергина [и др.] // Профилактика и лечение инфекц. и паразит. заболеваний: материалы юбил. конф. Белорус. НИИ эпидемиол. и микробиол. / Белорус. НИИ эпидемиол. и микробиол.; редкол. П.Г. Рытик [и др.]. — Минск: Навука і тэхніка, 1995. — С. 249−252.

21. 2-Аминотиазолиновая соль 1-адамантанкарбоновой кислоты, обладающая противовирусной активностью: а.с. 1704425 СССР, МКИ3 С 07 D 277/18, А 61 К 31/425 / М.А. Кажемекайте [и др.]; Институт биохимии АН Лит. ССР, Белорус. НИИ эпидемиол. и микробиол. — № 4825308/04; заявл. 14.05.90; опубл. 07.01.92 // Изобретения. — 1992. — № 1. — С. 223.

22. Противовирусная активность производных пространственно-экранированных фенолов / О.Т. Андреева [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: материалы I итогов. науч.-практ. конф., Минск 8–9 апр. 1998 г. / Белорус. НИИ эпидемиол. и микробиол.: редкол.: Л.П. Титов [и др.]. — Минск, 1998. — С. 540–545.

23. Бореко, Е.И. Бутаминофен: сравнительная характеристика противовирусного действия и эффективности при экспериментальном герпесе лабораторных животных / Е.И. Бореко, О.В. Савинова, Н.И. Павлова // Вирусные инфекции: эпидемиология, клиника, лабораторная диагностика и профилактика : материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 29–30 нояб. 2007 г. / Гос. учрежд. НИИ эпидемиол. и микробиол.; редкол.: Н.Н. Полещук [и др.]. — Минск, 2007. — С. 249–254.

24. Изучение противовирусной активности сочетаний ацикловира, циклоцитидинмонофосфата и бутаминофена / Т.В. Трухачева [и др.] // Вестн. фармации. — 2011. — № 3. — С. 66–72.

25. Холодов, Л.Е. Клиническая фармакокинетика / Л.Е. Холодов, В.П. Яковлев. — М.: Медицина, 1985. — 464 с.

26. Генерализованная герпетическая инфекция: Факты и концепция / А.Г. Коломиец [и др.]; под общ. ред. А.Г. Коломийца. — Минск: Наука и техника, 1992. — 351 с.

27. Герпес. Этиология, диагностика, лечение / И.Ф. Баринский [и др.]; под общ. ред. И.Ф. Баринского. — М.: Медицина, 1986. — 269 с.

28. 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.

29. Деконенко, Е.П. Герпетический энцефалит / Е.П. Деконенко // Невролог. журн. — 2005. — № 3. — С. 4–9.

30. Хмара, М.Е. Сравнительная клинико-морфологическая характеристика острого и хронического герпетических энцефалитов / М.Е. Хмара // Белорус. мед. журнал. — 2004. — № 3. — С. 86–91.

31. Хронические формы герпетических поражений центральной нервной системы у взрослых (клинико-лабораторные и морфологические исследования) / И.И. Протас [и др.] // Журн. невролог. и психиатр. — 1991. — № 2. — С. 30–33.

32. Kennet, L.T. Herpes simplex virus infections of the CNS: encephalitis and meningitis, including Mollaret's / L.T. Kennet // Herpes. — 2004. — № 11. — P. 57–64.

33. Skoldenberg, B. Herpes simplex encephalitis (review) / B. Skoldenberg // Scand. J. Infect. Dis. (suppl.). — 1996. — Vol. 100. — P. 8–13.

34. Бореко, Е.И. Противовируные свойства тинидазола и метронидазола. Эффективность при экспериментальной герпетической инфекции / Е.И. Бореко, С.Н. Николаева // Современные проблемы инфекционной патологии человека (вирусол., микробиол., иммунол., эпидемиол., клиника): материалы II научн.-практ. конф. по итогам выолнен. ГНТП «Инфекционные болезни» 1998–2000 гг., Минск, 18 янв. 2001 г. / Белорус. НИИ эпидемиол. и микробиол.; редкол.: Л.П. Титов [и др.]. — Минск: ФилСерв плюс, 2001. — С. 171–180.

35. Ингибитор вируса герпеса и способ подавления размножения вируса герпеса: пат. 2085 Респ. Беларусь, МКИ А 61 К 31/38, С 12 N 7/04 / Е.И. Бореко, С.Н. Николаева, М.Е. Хмара; заяв. Белорус. НИИ эпидемиол. и микробиол. — № 1909; заявл. 04.05.1994; опубл. 30.03.1998 // Афіц. бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. — 1998. — № 1. — С. 93.

36. Хмара, М.Е. Предпосылки сочетанного применения ацикловира и метронидазола для терапии хронического герпетического энцефалита (экспериментальные исследования и клинические наблюдения) / М.Е. Хмара, Е.И. Бореко, И.И. Протас // Мед. панорама. — 2005. — № 9. — С. 30–33.

37. Комплексная этиопатогенетическая терапия герпетического энцефалита с применением ацикловира и метронидазола / И.И. Протас [и др.] // Соврем. методы диагностики, лечения и профилактики заболеваний: сб. инструкт.-метод. д-ов / М-во здравоохр. Респ. Беларусь: редкол.: В.И. Жарко [и др.]. — Минск: РНМБ, 2008. — Т. 4, вып. 9. — С. 201–208.

38. Способ получения противовирусного средства из торфа: а.с. 1522482 СССР, МКИ3 А 61 К 35/10 / Г.В. Наумова, Л.В. Косоногова, Н.А. Жмакова, Е.И. Бореко, Г.В. Владыко, И.В. Коробко, А.Г. Коломиец, Л.В. Коробченко, И.И. Подковырина, В.И. Вотяков; Ин-т торфа АН БССР, Белорус. НИИ эпидемиологии и микробиологии. — № 4347534/28-14; заявл. 21.12.87; опубл. 15.11.89 // Открытия. Изобретения. — 1989. — № 2. — С. 287.

39. Antiviral properties of substances of natural sources / G.V. Vladyko [et al.] // Antivir. Substances: abstr. Vth Int. Symp. Soc. Countries. — Riga, 1982. — P. 114.

40. Противовирусные свойства распространенных лекарственных растений / Е.И. Бореко [и др.] // Роль антропоген. и природн. патогенов в формировании инфекц. и неинфекц. болезней человека. Медико-экол. аспекты: материалы Междунар. конф., Минск, 8–9 окт. 2002 г. / Гос. учрежд. НИИ эпидемиол. и микробиол.; редкол.: Л.П. Титов [и др.]. — Минск: НЕССИ, 2002. — С. 343–355.

41. Microcapsules with a wall of crosslinked plant polyphenols and compositions containing them: пат. 5780060 США, МКИ A61K 009/50; A61K 035/78. / M.-C. Levy, M.-C. Andry (FR); Centre National de la Recherche Scientifique. — № 525619; заявл. 27.09.1995; опубл. 14.06.1998. НКИ 424/489.

42. Craig, W.J. Health-promoting properties of common herbs / W.J. Craig // Am. J. Clin. Nutr. — 1999. — Vol. 70, № 3 (suppl.). — P. 491S–499S.

43. Middleton, E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function / E. Middleton // Adv. Exp. Med. Biol. — 1998. — Vol. 439. — P. 175–182.

44. Барабой, В.А. Биологическое действие растительных фенольных соединений / В.А. Барабой. — Киев: Навук. думка, 1976. — 260 с.

45. Противовирусные свойства сбора лекарственных трав «Фитогор» / Н.И. Павлова [и др.] // Здравоохранение. — 1999. — № 1. — С. 50–53.

46. Противовирусные свойства сбора лекарственных трав «Фитогор» / Н.И. Павлова [и др.] // Практич. фитотерапия. — 2000. — № 1. — С. 5–9.

47. Шмерко, Е.П. Практическая фитотерапия. Опыт лечения растениями / Е.П. Шмерко, И.Ф. Мазан. — Минск: Лечприрода, 1996. — 640 с.

SEARCH OF ANTIVIRAL PROPERTIES AMONG SYNTHETIC SUBSTANCES AND NATURAL PRODUCTS TO DEVELOP APPROACHES IN DRUG THERAPY OF HERPES VIRUS DISEASES

Boreko E.I.

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

The main results of many years of work on the study of antiviral properties and efficiency in experimental herpes laboratory animals of various compounds and substances, including drugs for different purposes, and medicinal plants are presented. The main quantitative characteristics of the antiviral action of 2'-deoxy-2'-fluoroguanosine, O^2,2′-cyclocytidine-5'-monophosphate, N-3-ethyladamantyl-1-ethylcarbamate, 3-ethyladamant-1-ol, 2-aminothiazoline salt of 1-adamantancarbonyl acid, 2-hydroxy-3,5-di-tertbutyl-N-phenylaniline, tinidazole and metronidazole and their combinations with acyclovir are presented. Information on medicinal plants, infusions and decoctions which inhibit of the herpes virus reproduction and neutralize its infectivity is provided. The results obtained have been implemented in the development of new antiviral agents butaminophen, nucleavir, actovir, fitogor and in the method of effective treatment of chronic herpes virus encephalitis.

Keywords: antivirals, herpes virus infection, treatment.

Поступила 20.08.2014

ЧАСТОТА ВЫДЕЛЕНИЯ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ПАТОЛОГИЕЙ ДЫХАТЕЛЬНОГО, УРОГЕНИТАЛЬНОГО И ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА В 2012–2013 ГГ.

Винничек Л.А., Ермакова Т.С., Титов Л.П., Крамаренко Л.П., Шныр И.В.

РПНЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. В статье проанализирована частота выделения и антибиотикорезистентность неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ) в 2012-2013 гг. Несмотря на повсеместную возрастающую антибиотикорезистентность неферментеров (НФ), исследованные амбулаторные штаммы сохранили чувствительность ко многим группам антимикробных препаратов. Большинство штаммов проявили высокую чувствительность к нитрофуранам, цефалоспоринам, аминогликозидам, фторхинолонам и карбапенемам.

Ключевые слова: неферментирующие грамотрицательные бактерии, антибиотикорезистентность, CLSI.

Введение. В настоящее время в микробных ассоциациях при бронхолегочных, урологических инфекциях, а также инфекциях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) приоритет приобрели неферментирующие грамотрицательные бактерии. В группе НГОБ различают роды *Pseudomonas, Alcaligenes, Moraxella, Acinetobacter, Flavobacterium, Achromobacter*.

Клинически важной особенностью НГОБ является высокая частота резистентности микроорганизмов к различным классам антимикробных препаратов. Наиболее значимым механизмом служат мембранные механизмы активного выброса (эффлюкса). Другим важным свойством является наличие у них межклеточной сигнальной системы «quorum sensing» – механизма, который следит за плотностью клеток бактериальной популяции и отвечает за контроль продукции многих внеклеточных факторов патогенности, что обеспечивает бактериям преодоление защитных сил макроорганизма при инфекции [1, 2].

В патогенезе заболеваний, вызванных НГОБ, *Ps. aeruginosa* является количественно значимым патогеном, чаще всего колонизирует дыхательные пути, вызывает хроническую инфекцию, может выделяться у пациентов из мокроты на протяжении всей жизни. Колонизация синегнойной палочки переходит в инфекцию у пациентов с иммунодефицитами, особенно у больных муковисцидозом и диабетом [3]. В условиях стационара на долю уретральных инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, приходится 12%. Нередко уретральная инфекция у ослабленных пациентов осложняется сепсисом. Около 40% всех бактериемий приходится на долю уросепсиса. Желудочно-кишечный тракт является частым источником синегнойной септицемии. После госпитализации в течение 72 ч частота носительства в ЖКТ увеличивается от 3% у здоровых людей до 20% у пациентов стационаров. Любой участок ЖКТ от глотки до прямой кишки может поражать *P. aeruginosa*, вызывая инфекции различной степени тяжести – гастроэнтерит, некротический энтероколит [3].

Важную роль в развитии инфекций играет *Acinetobacter spp.* Благодаря своим биологическим особенностям *Acinetobacter spp.* не способен вызвать инфекционный процесс у здоровых людей, но у пациентов с бронхолегочными инфекциями он является вторым представителем НГОБ по частоте встречаемости после *P.aeruginosa*.

Источником *A. baumanii* может являться сам пациент из-за носительства (до 1% обследованных) или очага слизисто-кишечного тракта (10% пациентов при поступлении и около 40% в палатах интенсивной терапии) [4]. Резистентность *Acinetobacter spp.* к β-лактамным препаратам связана с продукцией плазмидных и хромосомных β-лактамаз, снижением проницаемости структур клетки и изменением структуры пенициллинсвязывающих белков. Устойчивость изолятов *Acinetobacter* к аминогликозидам обусловлена тремя известными группами аминогликозидиофицирующих ферментов: аминоацети-л-трансферазами, аденилтрансферазами и фосфорилазами, которые контролируются генами, локализованными на плазмидах и транспозонах. Резистентность ко фторхинолонам возникает вследствие модификации ДНК-гиразы бактерий, а также изменений структуры белка наружной мембраны и снижения проникновения препарата внутрь клетки [5].

Moraxella catarrhalis паразитирует на слизистых оболочках дыхательных путей, слизистой оболочке шейки матки и уретры. Инфекционный агент эндокардита, конъюнктивита, менингита, уретрита, респираторных инфекций (бронхит, пневмония, фарингит, отит, синусит). У 54,6% пациентов с инфекцией, обусловленной *M. catarrhalis*, развивается хроническая обструктивная болезнь легких [6]. Часто *M. catarrhalis* обнаруживается в ассоциациях с другими бактериями. Уретрит и гнойный конъюнктивит, вызванные *Moraxella catarrhalis*, по клинической картине могут напоминать гонококковую инфекцию [7–9].

Инфекции дыхательных путей также вызывают и другие представители НГОБ: *Stenotrophomonas maltophilia* и *Burkholderia cepacia*. Особую проблему составляет терапия инфекции, ассоциированной со *Stenotrophomonas maltophilia*. Микроорганизм обладает выраженной природной резистентностью ко многим классам антимикробных препаратов за счет продукции β-лактамаз L-1 и L-2 [10]. *Burkholderia pseudomalei* — возбудитель конкретной нозологической формы — мелиодоза, другие НГОБ вызывают оппортунистические инфекции без определенной локализации [7].

У стационарных больных урологических отделений велика этиологическая значимость НГОБ. По удельному весу *Pseudomonas aeruginosa* составляет 29%, *Acinetobacter spp*. — 1,6%, *Stenotrophomonas maltophilia* — 1,2% [2].

Таким образом, группа НГОБ представляет серьезную проблему практического здравоохранения. Эффективное этиотропное лечение инфекций, обусловленных НГОБ, невозможно без учета данных об их чувствительности к антибактериальным препаратам.

Цель работы — выявление частоты выделения НГОБ при инфекциях верхних и нижних дыхательных путей, урогенитального и желудочно-кишечного тракта, исследование резистентности к антибактериальным препаратам.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили культуры НГОБ, выделенные у пациентов, направленных врачами лечебных учреждений г. Минска и областей РБ в центр платных медицинских услуг РНПЦ ЭМ за период 2012–2013 гг.

Забор биологического материала и микробиологические исследования проводили в соответствии с инструкцией по применению «Микробиологические методы исследования биологического материала», утв. 19.03.2010, рег. № 075-0210, Минск, 2010 [5].

В период 2012–2013 гг. было проведено 3352 бактериологических исследования отделяемого дыхательных путей, 820 — отделяемого урогенитального тракта, 187 — микробиоценоза кишечника на дисбактериоз. Выделено 174 штамма НФБ из ДП, 101 — из УГТ, 34 — из ЖКТ.

Фенотипирование выделенных этиологических возбудителей проводили с применением тест-систем отечественного производства, а также с помощью автоматизированного микробиологического анализатора Vitek 2 Compact.

Оценку антибиотикорезистентности идентифицированных микроорганизмов следует проводить диско-диффузионным методом на среде Мюллер-Хинтон агар в соответствии с инструкцией по применению «Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», утв. 15.12.2008, рег. № 226-1200, Минск, 2008 [10]. Учет и интерпретацию результатов проводили в соответствии с Performance Standards for Susceptibility Test, CLSI (прежнее название NCCLS).

Результаты обрабатывали статистически с помощью пакета прикладных программ «Статистика 6.0». В качестве уровня статистической значимости принято значение $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. В результате бактериологического исследования биологического материала, взятого от пациентов, было выделено НГОБ: 174 штамма из дыхательных путей, 101 — из мочеполовой системы, 34 — из желудочно-кишечного тракта.

Этиологическая структура и удельный вес неферментирующих бактерий, выделенных от пациентов, представлены в таблице 1.

Как и следовало ожидать, в исследованном клиническом материале псевдомонады в количественном отношении превалировали над остальными НФ. Штаммы *Pseudomonas aeruginosa* выделялись примерно с одинаковой частотой как из дыхательных путей (29,3%), так и в отделяемом мочеполовой системы (34,6%) и желудочно-кишечного тракта (35,3%) от общего количества НГОБ ($p>0,05$).

Удельный вес штаммов *Sphingomonas paucimobilis* при исследовании ИУГТ составил 27,7%, ИЖКТ — 14,7% и ИДП —1,15%.

Moraxella catarrhalis (чаще выделялась в осенне-зимний период) заняла лидирующие позиции при обследовании пациентов на инфекции дыхательных путей — 37,9% от общего количества НГОБ. В количестве 10^5 и 10^6 КОЕ/мл она колонизировала носоглотку и уши обследованных, высевалась после перенесенного гриппа и ОРВИ. Кроме того, *Moraxella spp*. была обнаружена в отделяемом урогенитального тракта пациентов (4%). В ЖКТ этот возбудитель выявлен в 5,9% случаев.

Acinetobacter spp. чаще всего высевался при инфекциях дыхательных путей (21,2%), также при обследовании кала на дисбактериоз (20,6%). Наименьший удельный вес *Acinetobacter spp.* составил у пациентов с инфекциями мочеполовой системы (17,0%).

Таблица 1 — Структура и удельный вес основных видов НГОБ при обследовании на микрофлору у пациентов

Микроорганизмы	ИДП		ИУГТ		ИЖКТ	
	n	удельный вес, %	n	удельный вес, %	n	удельный вес, %
Семейство *Pseudomonadaceae:*						
Pseudomonas aeruginosa	51	29,4	35	34,6	12	35,3
Pseudomonas luteola	12	6,9	15	14,8	2	5,9
Семейство *Sphinomonganaceae:*						
Sphingomonas paucimobilis	8	4,6	16	15,8	11	32,3
Семейство *Moraxellaceae:*						
Acinetobacter lwoffii	22	12,6	11	11,0	7	20,6
Acinetobacter baumanii	15	8,6	6	6,0	-	-
Moraxella catarrhalis	66	37,9	4	4,0	2	5,9
Moraxella uretralis	-	-	14	13,8	-	-
Всего:	174	100	101	100	34	100

Примечание — ИДП — инфекции дыхательных путей; ИУГТ — инфекции урогенитального тракта; ИЖКТ — инфекции желудочно-кишечного тракта; n — общее количество штаммов НГОБ.

Определение чувствительности микроорганизмов — возбудителей инфекционных заболеваний человека к антибактериальным препаратам приобретает все более важное значение в связи с появлением и широким распространением резистентности у бактерий. Общеизвестна природная устойчивость неферментеров ко многим группам антибиотиков. Все это диктует необходимость проведения мониторинга за циркуляцией резистентных НГОБ.

В таблицах 2, 3, 4 приведены данные о резистентности к антибактериальным препаратам НГОБ, выделенных у пациентов с инфекциями дыхательных путей (таблица 2), мочеполовой системы (таблица 3) и желудочно-кишечного тракта (таблица 4).

В таблице 2 показана резистентность к антибиотикам штаммов *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp. и Moraxella catarrhalis;* в таблице 3 — *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp. и Moraxella spp;* в таблице 4 — *Pseudomonas aeruginosa, Sphingomonas paucimobilis.*

В ходе исследования установлено, что штаммы НГОБ, выделенные от амбулаторных больных, проявили хорошую чувствительность к некоторым препаратам пенициллинового ряда, в частности, пиперациллин, а также к ингибиторзащищенным пенициллинам –пиперациллин/тазобактам, ампициллин/сульбактам; из аминогликозидов — амикацин. Исходя из данных таблиц 2, 3, 4 видно, что высока доля штаммов, чувствительных ко фторхинолонам и карбапенемам.

Как следует из полученных нами данных, представленных в таблице 2, 47,7% штаммов псевдомонад устойчивы к ампициллин/сульбактаму, тогда как к пиперациллину и пиперациллин/тазобактаму они проявили высокую чувствительность. Штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные из дыхательных путей, наибольшую резистентность проявили ко фторхинолонам (к ципрофлоксацину — 20,8%, офлоксацину — 15,3%), и карбапенемам (к меропенему — 4,76%, имипенему — 4,3%). У штаммов *Pseudomonas aeruginosa* иной локализации отсутствовала резистентность к карбапенемам, небольшую долю составили резистентные к фторхинолонам штаммы (к ципрофлоксацину — 3,57%, офлоксацину — 2,85%), к моксифлоксацину резистентности не установлено.

Таблица 2 — Резистентность к антибиотикам НГОБ у пациентов с ИДП

Антибиотики	*P. aeruginosa* n = 51		*Acinetobacter* spp. n = 37		*M. catarrhalis* n = 66	
	N	R, %	N	R, %	N	R, %
Пиперациллин	12	0	37	57,1	–	–
Пиперациллин/тазо-бактам	6	0	22	0	5	0
Ампициллин/суль-бактам	44	47,7	28	3,57	46	0
Нитрофурантоин	48	16,6	37	4,8	23	30,4
Амикацин	45	0	18	5,5	66	4,5
Цефуроксим	39	15,5	35	2,8	61	0
Цефтриаксон	41	9,75	37	0	66	0
Цефтазидим	46	41,3	37	60,9	66	45,4
Ципрофлоксацин	24	20,8	37	2,7	60	1,6
Офлоксацин	26	15,3	37	2,4	63	0
Моксифлоксацин	20	0	32	0	45	0
Имипенем	21	4,3	33	0	66	0
Меропенем	23	4,76	37	0	66	0

Примечание — ИДП — инфекции дыхательных путей; R — % резистентных штаммов НФ; n — общее количество штаммов НГОБ; N — количество штаммов НГОБ, взятых для постановки антибиотикочувствительности.

Как следует из приведенных данных, у изученных штаммов ацинетобактера отмечалась высокая резистентность к большинству β-лактамных антибиотиков. Так, к пиперациллину резистентными оказались 57,1% штаммов ИДП и 33,3% штаммов ИМПТ. Однако пиперациллин/тазобактам проявил высокую активность, к нему нет резистентных штаммов *Acinetobacter spp.* К цефалоспоринам, карбапенемам и фторхинолонам выделенные штаммы проявили высокую чувствительность (таблицы 2, 3).

Таблица 3 — Резистентность к антибактериальным препаратам НГОБ из УГТ

Антибиотики	*P. aeruginosa* n = 35		*Acinetobacter spp.* n = 17		*Moraxella spp.* n = 18	
	N	R, %	N	R, %	N	R, %
Пиперациллин	21	0	6	33,3	8	12,5
Пиперациллин/тазо-бактам	5	0	5	0	10	0
Ампициллин/сульбактам	35	2,85	13	0	15	0
Амикацин	35	0	13	0	16	6,25
Цефуроксим	31	6,45	11	0	16	0
Цефтриаксон	33	0	13	0	16	0
Цефтазидим	35	8,57	11	27,3	11	36,3
Ципрофлоксацин	28	3,57	13	0	10	0
Офлоксацин	35	2,85	9	0	16	0
Моксифлоксацин	35	0	7	0	11	0
Имипенем	30	0	2	0	4	0
Меропенем	29	0	4	0	3	0
Нитрофурантоин	35	11,42	13	30,7	7	14,28

Наиболее значимыми препаратами выбора штаммов *Moraxella spp*. являются ампициллин/сульбактам, пиперациллин/тазобактам, фторхинолоны, а также цефалоспорины. Эти препараты полностью подавляли рост и размножение исследованных микроорганизмов (таблицы 2, 3). Полученные данные могут быть использованы при эмпирической терапии, однако проверка на микрофлору и чувствительность к антибактериальным препаратам должна быть неотъемлемой частью подбора лекарственных средств для пациентов.

Таблица 4 — Резистентность к антибактериальным препаратам НГОБ из ЖКТ

Антибиотики	*P. aeruginosa* n = 12		*Sphingomonas paucimobilis* n = 11	
	N	R, %	N	R, %
Пиперациллин	5	0	–	–
Пиперациллин/тазобактам	2	0	11	0
Ампициллин/сульбактам	12	41,6	11	0
Амикацин	12	0	11	0
Цефуроксим	12	25,0	11	0
Цефтриаксон	12	16,6	11	0
Цефтазидим	12	41,6	11	20,0
Ципрофлоксацин	12	8,3	11	0
Офлоксацин	12	0	11	0
Моксифлоксацин	12	0	11	0
Имипенем	10	0	11	0
Меропенем	12	0	11	0
Нитрофурантоин	12	8,3	11	0

Sphingomonas paucimobilis относится к условно-патогенным микроорганизмам. Однако в последнее время в литературе представлено много случаев, где эти микроорганизмы являлись этиологическими агентами (сепсис, вызванный загрязненными лекарственными растворами, жидкость для гемодиализа и стерильные растворы наркотиков). При обследовании клинического материала ЖКТ штаммы *Sphingomonas paucimobilis* присутствовали в этиологически значимых количествах, или превышали предельно-допустимое количество возбудителей на 1 г кала. Анализ антибиотикочувствительности показал восприимчивость исследованных штаммов к амикацину, пиперациллин/тазобактаму, имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, моксифлоксацину и левофлоксацину.

Заключение. Анализ биологических свойств неферментирующих бактерий, выделенных от амбулаторных пациентов за период 2012–2013 гг., показал, что в структуре возбудителей, вызывающих бронхолегочные, урологические, а также ЖКТ-инфекции значительная роль принадлежит неферментирующим грамотрицательным бактериям. Было установлено, что доминирующими возбудителями были псевдомонады, которые обнаруживались в 35,3–5,9% случаев от общего количества выделенных нами НГОБ. Устойчивость *P. aeruginosa* во внешней среде, непритязательность к условиям питания, наличие мощных факторов вирулентности, природная резистентность к соединениям с антибиотической активностью определяют широту ее распространения.

Значительный удельный вес неферментирующих бактерий приходится на семейство *Moraxellaceae: Moraxella catarrhalis* и *Acinetobacter lwoffii* (до 37,9 и 20,6% соответственно в зависимости от нозологии).

Несмотря на повсеместную возрастающую антибиотикорезистентность неферментеров исследованные нами амбулаторные штаммы сохранили чувствительность ко многим группам антимикробных препаратов. Большинство штаммов проявило высокую чувствительность к нитрофуранам, цефалоспоринам, аминогликозидам, фторхинолонам и, конечно, карбапенемам.

Полученные данные важны для понимания эпидемиологии заболеваний, вызываемых НГОБ, и разработки мер по их предупреждению.

Литература

1. Шагинян, И.А. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности / И.А. Шагинян, М.Ю. Чернуха // Клинич. микробиол. антимикроб. химиотер. — 2005. — Т. 3, № 7. — С. 271–285.

2. Страчунский, Л.С. Клиническая фармакология антибиотиков / Л.С. Страчунский, С.Н. Козлов, А.В. Дехнич. — Смоленск: СГМА, 2004. — 128 с.

3. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. — М.: МАКМАХ, 2002. — 382 с.

4. The ecology, biology and pathogenesis of Acinetobacter spp. : an overview / H.J. Doughari [et al.] // Microbes Environ. — 2011. — Vol. 26, № 2. — P. 101–112.

5. Микробиологические методы исследования биологического материала : инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 19.03.2010, рег. № 075-0210. — Минск, 2010. — 123 с.

6. Prevalence of Moraxella catarrhalis infections of the lower respiratory tract in elderly patients / M.D. Tamang [et al.] // Kathmandu Univer. Med. J. — 2005. — Vol. 3, № 1, Issue 9. — P. 39–44.

7. Ермакова, Т.С. Видовая структура и антибиотикорезистентность возбудителей гнойно-септических инфекций / Т.С. Ермакова, В.А. Горбунов, Л.П. Титов // Здравоохранение. — 2011. — № 10. — С. 16–25.

8. Мониторинг резистентности микроорганизмов к антибактериальным средствам как элемент системы эпидемиологического надзора и ключевое направление Европейского стратегического плана действий по проблеме / Л.П. Титов [и др.].

9. Clinical and microbiological characteristics of Rhizobium radiobacter infections / C.-C. Lai [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 38, № 1. — P. 149–153.

10. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам : инструкция по применению: утв. 15.12.2008 М-вом здравоохр. Респ. Беларусь, рег. № 226-1200. — Минск, 2008.

FREQUENCY OF ISOLATION AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF NON-FERMENTING GRAM-NEGATIVE BACTERIA FROM PATIENTS WITH THE PATHOLOGY OF RESPIRATORY, UROGENITAL ,AND GASTROINTESTINAL TRACT

Vinnichak L.A., Yermakova T.S., Titov L.P., Kramarenko L.P., Shnyp I.V.

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

In the paper the frequency of isolation and antibiotic resistance of non-fermenting Gram-negative bacteria in human pathology in 2012-2013 were analyzed. It was shown that despite of widespread increasing of non-fermenters antibiotic resistance the strains obtained from outpatients remain sensitive to many groups of antimicrobials. Most strains showed high sensitivity to nitrofurans, cephalosporins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and carbapenems.

Keywords: non-fermentative Gram-negative bacteria, antibiotic resistance.

Поступила 15.07.2014

СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ОТНОШЕНИИ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA,* ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ТЯЖЕЛЫХ ПНЕВМОНИЯХ В СТАЦИОНАРАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Ермакова Т.С., Горбунов В.А., Титов Л.П.

РПНЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Проведено исследование штаммов *Pseudomonas aeruginosa,* выделенных при тяжелых пневмониях в стационарах Республики Беларусь. Структура и удельный вес этиологически значимых видов бактерий рода *Pseudomonas* — возбудителей тяжелых пневмоний показал что, в видовой структуре псевдомонад преобладала синегнойная палочка — *P. aeruginosa* (96,5%). Другие виды выделялись значительно реже. Резистентность штаммов *P. aeruginosa* выделенных при тяжелых пневмониях в настоящее время является серьезной терапевтической проблемой. Антибактериальные препараты, активные в отношении синегнойной палочки, в порядке убывания активности (от самого активного к наименее активному) распределяются следующим образом: имипенем > меропенем > амикацин > цефепим> пиперациллин/тазобактам > цефтазидим > ципрофлоксацин > аз-

треонам > гентамицин > пиперациллин. Сложившаяся ситуация обуславливает необходимость во всех стационарах усиления мероприятий по инфекционному контролю и ведения формулярной системы с перечнем ведущих этиологических агентов и их чувствительности к антимикробным препаратам во избежание нерационального назначения противомикробных препаратов.

Ключевые слова: антимикробные препараты, резистентность, *Pseudomonas aeruginosa,* тяжелые пневмонии.

Введение. Терапия тяжелых пневмоний является актуальной проблемой для практического здравоохранения. Частота выделения неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ) из клинического материала достигает 15% от всех аэробных и факультативно-анаэробных грамотрицательных бактерий, из них около 70 % приходится на долю *P. aeruginosa*. По данным Национальной системы контроля за нозокомиальными инфекциями США (NNIS) *P. aeruginosa* — самый частый возбудитель нозокомиальной пневмонии [1–3]

Вероятность развития инфекции значительно повышается в случае иммунодепрессии или иммунодефицита у ослабленных, истощенных людей, на фоне влияния стрессовых факторов и тяжелую соматическую патологию.

Устойчивость во внешней среде, непритязательность к условиям питания, наличие мощных факторов вирулентности, природная резистентность к соединениям с антибиотической активностью определяют широту распространения и формирования полирезистентных штаммов *P. aeruginosa* [3–6]. Инфекции, вызванные *P. aeruginosa*, остаются одной из наиболее сложных проблем практического здравоохранения во всех странах мира, несмотря на проведение санитарно-эпидемиологических мероприятий и успехи в антимикробной терапии.

Развитие резистентности микроорганизмов играет ключевую роль в определении подходов к терапии пациентов. Из всего разнообразия факторов резистентности наибольшую угрозу представляют бета-лактамазы расширенного спектра — БЛРС (Extended spectrum beta-lactamases — ESBL) и метало-бета-лактамазы. Благодаря плазмидной локализации генов распространение этих ферментов приняло угрожающий характер. В Восточной Европе в популяционной структуре бета-лактамаз расширенного спектра действия превалируют гены STX-M (>92%), и SHV (>20%). Английскими учеными установлена корреляция между необоснованным потреблением антибиотиков в клиниках, особенно цефалоспоринов третьего поколения, фторхинолонов, карбапенемов, и ростом частоты обнаружения НГОБ [4, 7, 8]. Штаммы *P. aeruginosa*, вызывающие заболевания с летальным исходом, характеризуются множественной резистентностью к лекарственным средствам [9, 10].

Учитывая тяжесть состояния, быстрое прогрессирование патологического процесса и невозможность одномоментного получения результата бактериологического исследования, выбор антибиотиков для терапии в основном проводится эмпирически с учетом локальных данных о структуре возбудителей и их антибиотикорезистентности. Для прогнозирования стратегии антибактериальной терапии при тяжелых пневмониях, важную роль приобретает мониторинг их антибиотикочувствительность.

Цель работы — изучение активности современных антимикробных препаратов в отношении штаммов *P. aeruginosa*, выделенных при культуральных исследованиях у пациентов с тяжелыми пневмониями в учреждениях здравоохранения Республики Беларусь.

Материалы и методы. Создание коллекции штаммов *P. aeruginosa* проводились в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии в период с ноября 2009 г по апрель 2014 г. В исследовании участвовали лечебные учреждения и центры гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья г. Минска, Минской, Гомельской, Брестской, Вимебской, Могилевской, и Гродненской областей.

В исследование включены 197 штаммов *P. aeruginosa,* выделенных из клинического материала (мокрота, кровь, трахеобронхиальный аспират, ликвор, ткань легких, трахеи). Все штаммы доставлялись в Референс-центр мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов, где проводилась их 100% реидентификация. Фенотипирование выделенных возбудителей проводили с помощью морфологического, культурального и биохимического методов. Реидентифицированные штаммы хранили в низкотемпературном морозильнике при –70°С.

В работе использовались среды и реактивы российского производства, тест-системы для биохимической идентификации производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Верификацию видовой принадлежности выделенных микроорганизмов и подтверждение антибиотикочувствительности проводили на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact (Biomerieux).

Оценку антибиотикорезистентности микроорганизмов проводили диско-диффузионным методом на среде Мюллер-Хинтон агар в соответствии с инструкцией по применению [11]. Учет и интерпретацию результатов проводили в соответствии с Performance Standards for Susceptibility Test, CLSI (прежнее название NCCLS). Внутренний контроль качества проводили параллельным тестированием контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 (таблица 1).

Таблица 1 — Диаметры зон подавления роста и диапазоны значений МПК для оценки чувствительности/резистентности *P. aeruginosa.* Контрольный штамм *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Антибиотик	Концентрация в диске	Диапазоны диаметров зон подавления роста (мм)		МПК (мг/л)	
	мкг	S≥	R<	S≤	R>
Пиперациллин	30	19	19	16	16
Пиперациллин/тазобактам	30/6	19	19	16	16
Тикарциллин	75	17	17	16	16
Тикарциллин/клавуланат	75/10	17	17	16	16
Цефепим	30	18	18	8	8
Цефтазидим	10	16	16	8	8
Дорипенем	10	25	19	1	4
Имипенем	10	20	17	4	8
Меропенем	10	24	18	2	8
Азтреонам	30	50	16	1	16
Ципрофлоксацин	5	25	22	0,5	1
Левофлоксацин	5	20	17	1	2
Амикацин	30	18	15	8	16
Гентамицин	10	15	15	4	4
Нетилмицин	10	12	12	4	4
Тобрамицин	10	16	16	4	4

Количество исследованных штаммов и критерии интерпретации результатов определения антибиотикочувствительности штаммов микроорганизмов возбудителей постгриппозных пневмоний с учетом рекомендаций EUCAST версии 2 от 01.01.2012 представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Количество исследованных штаммов *P. aeruginosa* и критерии интерпретации результатов

АМП	Количество штаммов	Breakpoints, S / (I+R)
Пиперациллин	197	≤64 / ≥128
Пиперациллин/тазобактам	197	≤64/4 / ≥128/4
Цефтазидим	197	≤8 / ≥16
Цефепим	197	≤8 / ≥16
Имипенем	197	≤4 / ≥8
Меропенем	197	≤4 / ≥8
Азтреонам	197	≤8 / ≥16
Гентамицин	197	≤4 / ≥8
Амикацин	197	≤16 / ≥32
Ципрофлоксацин	197	≤1 / ≥2

Результаты обрабатывали статистически с помощью пакета прикладных программ «Статистика 6.0». В качестве уровня статистической значимости принято значение $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Структура и удельный вес этиологически значимых видов бактерий рода *Pseudomonas* — возбудителей тяжелых пневмоний представлены на рисунке.

Как следует из рисунка, в видовой структуре псевдомонад преобладала синегнойная палочка *P. aeruginosa* (96,5%). Другие виды выделялись значительно реже.

Рисунок — Видовая структура представителей рода псевдомонад, являющихся этиологическим фактором развития тяжелых пневмоний

Как показали исследования, синегнойная палочка выделялась в 80% бронхиального аспирата, в 67% образцов мокроты и в 17,5% из образцов аутопсийного материала.

P. aeruginosa по сравнению с другими исследованными видами бактерий характеризуется самыми высокими уровнями и частотой резистентности к большинству антимикробных препаратов. Инфекции, вызываемые этим возбудителем, характеризуются высоким уровнем летальности. Например, по данным ряда зарубежных авторов, при синегнойной пневмонии летальность достигает 40–50% [4, 5]. Одним из типичных факторов риска летального исхода является позднее обращение за медицинской помощью [5]. Стратегия выбора антибактериальной терапии осложняется множественной резистентность *P. aeruginosa.*

Был проведен анализ эффективности часто применяемых на практике антибактериальных препаратов. Результаты определения активности антисинегнойных антибиотиков к исследованным изолятам представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Активность антибиотиков в отношении штаммов *P. aeruginosa,* выделенных при тяжелых пневмониях

АМП	Чувствительные, %	Умеренно-устойчивые, %	Устойчивые, %
Пиперациллин	8,9	10,2	80,9
Пиперациллин/ тазобактам	36,8	5,0	58,2
Цефтазидим	25,1	16,6	58,3
Цефепим	40,6	13,3	46,1
Имипенем	60,2	2.8	37.0
Меропенем	47,5	11.5	41.0
Азтреонам	21,1	15,7	63,2
Гентамицин	16,7	9,0	74,3
Амикацин	43,6	12,2	44,2
Ципрофлоксацин	22,4	18,3	59,3

Как следует из представленных в таблице 3 данных, наивысшую антисинегнойную активность проявили карбопенемы. Имипенем был эффективен к 119 штаммам (60,2%) из 197 исследованных. Вторым по активности из карбопенемных антибиотиков в отношении штаммов *P. aeruginosa* был меропенем. К этому антимикробному препарату проявили чувствительность 47,5% исследованных штаммов. Однако больше половины из них (52,5%) демонстрировали резистентность (41,0%) и умеренную устойчивость (11,5%).

Длительное время в терапии синегнойной инфекции использовали антисинегнойные пенициллины и аминогликозиды второго и третьего поколений (гентамицин, тобрамицин, амикацин). Как следует из данных таблицы 3 активность пиперациллина была самой низкой из всех исследованных антибиотиков (8,9%), Резистентные к пиперациллину были 80,9%, а пиперациллину/тазобактаму 58,2% всех исследованных изолятов. Штаммы с промежуточным уровнем устойчивости составили 10,2 и 15,0% соответственно. Устойчивость к амикацину проявили 111 (56,4%) штаммов *P. aeruginosa.* Из них 24 (12,2%) обладали промежуточным уровнем резистентности, а 87 (44,2%) были резистентными. Активность гентамицина в отношении исследованных штаммов характеризовалась низким уровнем. Только 32 (16,7%) штамма проявили чувствительность, тогда как резистентными были 74,3%, умеренно устойчивыми — 9%. Не выявлено штаммов *P. aeruginosa,* устойчивых к амикацину и чувствительных к гентамицину.

Из исследованных цефалоспоринов наиболее активным был цефепим — 80 чувствительных штамма (40,6%), нечувствительными к нему оказались 117 (59,4%) штаммов, из которых резистентными были 91 (46,1%) штамм, и 26 (13,3%) штаммов являлись умеренно резистентными. Антисинегнойная активность цефтазидима была сравнительно низкой и составила 25,1%. от всех исследованных штаммов. 148 (74,9%) штаммов были нечувствительными к данному препарату, в том числе резистентными были 115 (58,3%) штаммов, а 33 (16,6%) — с промежуточным уровнем резистентности. Резистентность к цефтазидиму наиболее часто связана с гиперпродукцией бета-лактамаз расширенного спектра [4].

Стабильно высокая резистентность синегнойной инфекции отмечена к азтреонаму (таблица 3). Только 42 (21,1%) штамма проявили чувствительность к этому препарату, а устойчивыми были 155 (78,9%) изолятов (резистентными — 63,2%, умеренно устойчивыми 15,7%)

К ципрофлоксацину были чувствительны только 44 (22,4%) штамма *P. aeruginosa.* то есть количество резистентных изолятов было значительно больше, чем к пиперациллину/тазобактаму, цефепиму, цефтазидиму, имипенему, меропенему, и амикацину. Из нечувствительных к ципрофлоксацину штаммов *P. aeruginosa* основную часть составили резистентные — 117 (59,3%) и 36 (18,3%) были умеренно резистентными.

Заключение. Таким образом, обобщая результаты исследований можно сделать вывод о том, что из представителей группы неферментирующих грамотрицательных бактерий – возбудителей тяжелых пневмоний высокую актуальность имеют бактерии рода Pseudomonas. В видовой структуре псевдомонад преобладает синегнойная палочка — *P. aeruginosa* (96,5%). Другие виды псевдомонад выделяются значительно реже.

Резистентность выделенных при тяжелых пневмониях штаммов *P. aeruginosa* в настоящее время является серьезной терапевтической проблемой. Антибактериальные препараты, активные в отношении синегнойной палочки, в порядке убывания активности (от самого активного к наименее активному) распределяются следующим образом: имипенем > меропенем > амикацин > цефепим> пиперациллин/тазобактам > цефтазидим > ципрофлоксацин > азтреонам > гентамицин > пиперациллин.

Сложившаяся ситуация обуславливает необходимость во всех стационарах усиления мероприятий инфекционного контроля и ведения формулярной системы с перечнем ведущих этиологических агентов и их чувствительности к антимикробным препаратам во избежание нерационального назначения противомикробных препаратов.

Литература

1. Мониторинг резистентности микроорганизмов к антибактериальным средствам как элемент системы эпидемиологического надзора и ключевое направление Европейского стратегического плана действий по проблеме / Л.П. Титов [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2013. — Вып. 6. — С. 152–161.

2. Rossolini, G.M. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant Pseudomonas aeruginosa / G.M. Rossolini, E. Mantengoli // Clin. Microbiol. Infect. — 2005. — Vol. 11, suppl. 4. — P. 17–31.

3. Ермакова, Т.С. Видовая структура и антибиотикорезистентность возбудителей гнойно-септических инфекций / Т.С. Ермакова, В.А. Горбунов, Л.П. Титов // Здравоохранение. — 2011. — № 10. — С. 16–25.

4. Проблема мультирезистентности синегнойной палочки в многопрофильных стационарах г. Минска / Н.В. Соловей [и др.] // Клинич. инфектол. паразитол. — 2012. — Т. 1, № 3–4. — С. 43–55.

5. Система мониторинга резистентности к антибиотикам клинически значимых микроорганизмов / В.А. Горбунов [и др.] // 75 лет санитарно-эпидемиологической службы: история, актуальные проблемы на современном этапе, перспективы развития: материалы науч.-практ. конф. — Минск, 2001. — С. 372–377.

6. Суборова Т.Н. Карбапенем-резистентные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* в специализированном хирургическом стационаре по лечению тяжелых ранений и травм / Т.Н. Суборова, А.Е. Гончарова, А.А. Кузин // КМАХ. — 2012. — Т. 14, № 2. — С. 50.

7. Фторхинолоны в клинической практике / под ред. В.И. Соколовой, В.А. Орлова. — М., 2010. — С. 10–11.

8. The effects of group 1 versus group 2 carbapenems on imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an ecological study / Y. Carmeli [et al.] // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 70, № 3. — P. 367–372.

9. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium / N. Mesaros [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. — 2007. — Vol. 13. — P. 560–578.

10. Mugabe, C. Liposome-mediated gentamicin delivery: development and activity against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients / C. Mugabe, A.O. Azghani, A. Omri // J. Antimicrob. Chemother. — 2005. — Vol. 55, № 2. — P. 269–271.

11. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам : инструкция по применению: утв. 15.12.2008 М-вом здравоохр. Респ. Беларусь, рег. № 226-1200. — Минск, 2008.

COMPARATIVE ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL AGENTS USED AGAINST STRAINS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ISOLATED FROM PATIENTS WITH SEVERE PNEUMONIA IN HOSPITALS OF THE REPUBLIC OF BELARUS

Ermakova T.S., Gorbunov V.A., Titov L.P.
Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

Study of strains *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from patients with severe pneumonia in hospitals Republic of Belarus has been conducted. Structure and etiologically significant proportion of bacteria species of genus *Pseudomonas,* agents of severe pneumonia showed that *Pseudomonas aeruginosa* prevailed and was 96.5%. Other species were isolated much less frequently.

This situation makes it necessary for all hospitals to strengthen infection control measures and maintaining the formulary system with a list of the leading etiologic agents and their antimicrobial susceptibility in order to avoid waste of antimicrobial prescribing.

Keywords: antimicrobial agents, resistance, *Pseudomonas aeruginosa,* severe pneumonia.

Поступила 12.09.2014

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ ИЗОЛЯТОВ *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ТИПА *B* И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К В-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ

Носова Е.С.[1], Титов Л.П.[1], Клюйко Н.Л.[2], Левшина Н.Н.[3], Савельева А.К.[4]
[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;
[2]Городская детская инфекционная клиническая больница, Минск;
[3]Минский городской центр гигиены и эпидемиологии, Минск;
[4]Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь

Реферат. Проведено молекулярно-генетическое исследование изолятов *H. influenzae* в ПЦР с праймерами на родо- и видоспецифические дифференцирующие мишени генов. Определены генетические детерминанты резистентности *H. influenzae* к *β*-лактамным антибиотикам, проведен молекулярный анализ генов *β*-лактамаз *TEM* типа с использованием комбинации методов ПЦР, ПЦР-ПДРФ и секвенирования.

Ключевые слова: *H. influenzae* типа *b*, *β*-лактамазы, ген *TEM*.

Введение. Инфекции, вызываемые *H. influenzae* серологического типа *b* (ХИБ, *Hib*), характеризуются разнообразными клиническими проявлениями и включают инвазивные и неинвазивные формы [1]. В этиологической структуре инвазивных бактериальных менингитов у детей до 5 лет в г. Минске доля *H.influenzae type b* составила 11%, *Str.pneumoniae* — 11%, а *N.meningitidis* — 60%. *H.influenzae type b* преимущественно выделялась из спинномозговой жидкости (56,25%). Из крови возбудитель выделен у одного пациента, а одновременно из крови и спинномозговой жидкости — у 6 (37,54%) [2].

Haemophilus influenza — неподвижная, грамотрицательная коккобацилла, впервые описана R.Pfeifer в 1892 г. Геном данного микроба был секвенирован впервые в 1995 г. (Fleischmann et al.). Хромосома бактерии состоит из 1830138 пар оснований и включает примерно 1740 генов. Для микроба характерно приобретение фрагментов генома других видов микроорганизмов посредством горизонтального переноса, который обусловлен наличием сиквенса распознавания, состоящего из 9 пар оснований (5'-AAGTGCGGT-3') [3].

Значимой с клинической точки зрения является проблема резистентности изолятов *H. influenzae* к *β*-лактамным антибиотикам, которые служат препаратами выбора при менингите и остром эпиглоттите. Основным механизмом резистентности к пенициллинам и цефалоспоринам у изолятов ХИБ является выработка ферментов *β*-лактамаз *TEM*-1 или *ROB*-1 [4, 5]. Устойчивость *H. influenzae* к *β*-лактамным антибиотикам может определяться появлением пенициллин-связывающих белков со сниженной аффинностью к *β*-лактамам в результате мутаций в кодирующем гене *ftsI* [4, 6]. По данным европейских исследований, 15% (0–30%) клинических изолятов *H. influenzae* содержат *β*-лактамазу *TEM*-1 [6–8]. Гены *β*-лактамаз *TEM*-1 и *ROB*-1 имеют плазмидную локализацию. Изоляты с продукцией *β*-лактамаз проявляют резистентность к ампициллину, выявляются фенотипическими методами и постановкой пробы с нитроцефином. Распространенность фермента *ROB*-1 среди изолятов варьируется в широких пределах в зависимости от географического района [4, 7, 9–10]. Существует проблема резистентности ХИБ к препаратам других классов – макролидам и триметоприму/сульфаметоксазолу.

Цель работы — характеристика молекулярно-генетических маркеров резистентности к β-лактамным антибиотикам у изолятов H. influenzae, выявление частоты распространения генов β-лактамаз.

Материалы и методы. В работе использованы культуры клинических и референтных штаммов *H. influenzae* типа *b*, образцы ДНК (n = 16). Клинические изоляты *H. influenzae* типа *b* выделены из материала (мазки из зева, со слизистой оболочки носа и уха, гной из верхнечелюстной пазухи, кровь и ликвор) пациентов от 2 до 7 лет с локализованными и инвазивными формами инфекций.

Бактериологическое исследование. Первичный посев материала проводили на шоколадный агар для труднокультивируемых бактерий. Шоколадный агар готовили с добавлением 2% раствора гемоглобина (BBL), в качестве основы использовали колумбийский агар (BBL). Для улучшения ростовых свойств среды в охлажденный до температуры 45–50°С агар добавляли НАД (V фактор) до конечной концентрации 15 мкг/мл. Культивировали при 35–37°С в условиях CO_2-термостата, содержание CO_2 — 5%. Гемофильные палочки росли в виде слизистых, круглых, точечных серовато-го цвета колоний.

Молекулярно-генетическое исследование. Для выделения ДНК использовали 12- часовые культуры, предварительно стандартизированные согласно стандарту мутности, равному 4 единицам МакФарланда, что соответствует $12{,}6\times10^8$ КОЕ/мл.

Для идентификации и определения принадлежности выделенной культуры к виду *H. influenzae* образцы тестировали на наличие видоспецифического гена наружной мембраны *P*2 (*ompP2*). Для амплификации последовательности *ompP2* гена использовали режим 95°С — 5 мин (95°С — 40 с, 57°С — 40 с), 40 циклов.

Выявление ДНК *H. influenzae* серологического типа *b* по наличию гена *bcsB* центрального региона II локуса *cap*, отвечающего за синтез капсулы, проводили с использованием метода ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Для анализа генетических детерминант устойчивости к *β*-лактамным препаратам был выбран клинически значимый ген *TEM β*-лактамаз молекулярного класса А. Проводили ПЦР-ПДРФ анализ гена *TEM*. Фрагменты гена *TEM* амплифицировали в ПЦР и подвергали обработке эндонуклеазой

рестрикции *MboI* (сайт рестрикции GATC). Метод ПЦР-ПДРФ применяли для выявления нуклеотидной замены в позиции 39 в гене *TEM*.

Результаты и их обсуждение. Для идентификации и определения принадлежности выделенной культуры к виду *H. influenzae* образцы тестировали на наличие гена наружной мембраны *P*2 (*ompP2*) и гена *bcsB*, центрального региона II локуса *cap*, отвечающего за синтез капсулы. Специфичные фрагменты генов были выявлены у всех исследуемых штаммов.

ПЦР-ПДРФ анализ гена *TEM* клинических изолятов *H. influenzae* типа *b*. Повышение уровня МИК ампициллина является маркером продукции *β*-лактамаз молекулярного класса А *TEM* типа. При ПЦР- скрининге специфичный фрагмент гена *TEM* размером 500 п.о. гена *β*-лактамаз был выявлен у 2 изолятов. Изоляты были выделены из ликвора больных с инвазивной формой ХИБ инфекции (острый гнойный менингит). Изоляты с продукцией фермента *ROB*-1 выявлены не были.

Определение замен в гене *TEM* методом ПЦР-ПДРФ. Наиболее распространенные клинически значимые замены аминокислот, приводящие к резистентности к *β*-лактамным препаратам, у производных *TEM*-1 встречаются в позициях 21, 39, 164, 265 [4–6]. Фермент *TEM*-1 в позиции 39 мутации не имеет, сайтов рестрикции для рестриктазы *MboI*–три. Фермент *TEM*-2 по нуклеотидному составу отличается от своего предшественника *TEM*-1 заменой нуклеотидов С→А в одной позиции 4046, приводящей к появлению дополнительного сайта рестрикции. Для молекулярной характеристики гена *β*-лактамаз *TEM* типа были отобраны две культуры ХИБ, у которых был выявлен ген *TEM*. Для обнаружения точечной мутации в положении 39 ампликоны размером 500 п.о. *TEM* генов подвергали действию эндонуклеазы рестрикции *MboI*. Для рестрикционного фермента *MboI* в последовательности исследуемого гена *TEM* имелось 3 сайта узнавания. При постановке ПЦР/*MboI* теста в двух пробах в фрагменте гена *TEM* наблюдалось образование специфичных продуктов (рисунок).

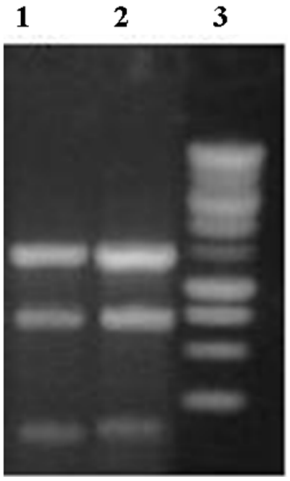


Рисунок — Результаты ПЦР-ПДРФ анализа *TEM* гена эндонуклеазой рестрикции *MboI*: линии 1, 2 — *H. influenzae* (*TEM*-1); линия 3 — маркер молекулярных масс

Отсутствие замены и появление трех сайтов рестрикции свидетельствует о наличии фермента *TEM*-1 у данных культур. На рисунке представлены сформированные продукты (300, 230, 40, 20 п.о.) при обработке эндонуклеазой рестрикции *MboI*. С помощью *MboI* фермента у проб не было обнаружено замены в позиции 39. Отсутствие замены нуклеотидов С → А, которая приводит к замене аминокислоты глутамин на лизин в позиции 39, было подтверждено секвенированием данных фрагментов.

На следующем этапе исследования при определении последовательности нуклеотидов нами установлены типы производных *TEM β*-лактамаз. Амплифицированные в реакции ПЦР специфические фрагменты *TEM* гена (500 п.о.), кодирующего фермент лекарственной устойчивости, были секвенированы. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности *TEM* генов у 2 исследуемых культур сравнивали между собой и с последовательностью гена *TEM*-1 (GenBank, Acc. Number **1446016**). Присутствие в позиции 39 аминокислоты глутамина свидетельствовало о наличии фермента *TEM*-1. Сравнительный компьютерный биоинформационный анализ позволил выявить у культур ХИБ ферменты *TEM*-1.

Выявление и типирование *H. influenzae* тип *b* с помощью метода ПЦР позволяет обнаруживать некультивируемые и труднокультивируемые формы патогена, проводить детекцию непосредственно в клиническом материале без предварительного культивирования. Главными преимуществами метода ПЦР в сравнении с бактериологическим являются высокая чувствительность и быстрота.

Резистентные изоляты *H. influenzae* часто вызывают внебольничные инфекции [8, 9]. Эти штаммы представляют клинические проблемы у детей и пациентов пожилого возраста. Определение резистентности изолятов ХИБ позволяет подобрать эффективное антибактериальное средство для терапии, является одним из основных способов мониторинга за распространением фенотипа и генов резистентности. Молекулярный анализ генов *β*-лактамаз *TEM* типа был проведен с использованием комбинации методов ПЦР, ПЦР-ПДРФ и секвенирования. ПЦР метод указал на наличие генов *TEM* в исследуемых штаммах *H. influenzae*. С помощью метода секвенирования был установлен тип фермента *TEM*, присутствующий в штаммах *H. influenzae*.

Заключение. Результаты молекулярно-генетического метода могут быть применимы для эпидемиологических исследований, когда терапия β-лактамными антибиотиками неэффективна, а рутинные фенотипические методы имеют ограниченные возможности. Распространенность резистентных изолятов *Hib* недооценивается из-за целого ряда методологических проблем, в т. ч. отсутствия консенсуса определяющих критериев резистентности.

Данные об антибиотикорезистентности позволяют получить представление об эффективности проводимой антибиотикотерапии, определить возможность коррекции лечения инфекций, учитывая механизм формирования устойчивости к антибактериальным средствам.

Литература

1. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries / I. Rudan [et al.] // J. Global Health. — 2013. — Vol. 3. — P. 1–14.
2. Etiology of bacterial meningitis in children during 5 years in Minsk / O.M. Morozova [et al.] // Fems Congr. of Eur. Microbiol. Abstr. Book. — 2003. — Vol. 1. — P. 251–252.
3. Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophillus influenzae Rd / R.D. Fleischmann [et al.] // Sci. — 1995. — Vol. 269. — P.496–512.
4. Felmingham, D. The Alexander Project 1996–1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections / D. Felmingham, R.N. Gruneberg // J. Antimicrob. Chemother. — 2000. — Vol. 45. — P. 191–203.
5. Molecular organization of small plasmids bearing bla TEM-1 and conferring resistance to beta-lactams in *Haemophilus influenzae* / A. Sondergaard [et al.] // Antimicrob. Agents Chemoth. — 2012. — Vol. 56. — P. 4958–4960.
6. Natural evolution of TEM-1 β-lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance / L.M. Salverda [et al.] // FEMS Microbiol. Rev. — 2010. — Vol. 34. — P. 1015–1036.
7. Global distribution of TEM-1 and ROB-1 β-lactamases in *Haemophilus influenza* / D.J. Farrell [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. — 2005. — Vol. 56. — P. 773–776.
8. Sequences of small bla TEM-encoding plasmids in *Haemophilus influenza* and description of variants falsely negative for bla TEM by PCR Stephen G. / J. Tristram [et al.] // Antimicrob. Chemother. — 2012. — Vol. 67. — P. 2621–2625.
9. Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae* decreased, except for β-lactamase-negative amoxicillin-resistant isolates, in parallel with community antibiotic consumption in Spain from 1997 to 2007 / S. Garcia-Cobos [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. — 2008. — Vol. 52. — P. 2760–2766.
10. Characterization of extended-spectrum β-lactamase-producing isolates of *Haemophilus parainfluenzae* / S. Tristram [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. — 2008. — Vol. 61. — P. 509–514.
11. Jacups, S.P. The continuing role of *Haemophilus influenzae* type *b* carriage surveillance as a mechanism for early detection of invasive disease activity. / S.P. Jacups // Hum. Vaccin. — 2011. — Vol.7. — P. 1254–1260.

MOLECULAR GENETIC INDICATION OF ISOLATES *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* TYPE B, AND DETERMINATION OF THEIR SENSITIVITY TO BETA-LACTAM ANTIBIOTICS

Nosova E.S.[1], Titov L.P.[1], Kluiko N.L.[2], Levshina N.N.[3], Savelieva A.K.[4]

[1]Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk;

[2]Municipal Children Infectious Clinic Hospital, Minsk;

[3]Minsk Municipal Center for Hygiene & Epidemiology, Minsk;

[4]Minsk Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus

A molecular genetic study of *H. influenzae* isolates from nasopharyngeal swabs, blood and CSF specimens have been done. A DNA fragment of ompP2 gene and bcsB locus involved in capsule expression

was used as a probe for specific detection of *H. influenzae* strains. *H. influenzae* resistance determinants to β-lactam antibiotics gene *TEM* was characterized by a combination of PCR techniques, PCR-RFLP and sequencing.

Keywords: *H. influenzae* type *b*, *β*-lactamases, gene *TEM.*

Поступила 21.08.2014

ТЕСТИРОВАНИЕ КОМБИНАЦИЙ АНТИБИОТИКОВ В ОТНОШЕНИИ СУПЕРРЕЗИСТЕНТНЫХ ИЗОЛЯТОВ *ACINETOBACTER BAUMANII* С ЦЕЛЬЮ УСТАНОВЛЕНИЯ ИХ АНТИМИКРОБНОЙ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙЭФФЕКТИВНОСТИ

Тапальский Д.В.[1], Мозгова А.В.[2], Козлова А.И.[2], Склеенова Е.Ю.[3]
[1]Гомельский государственный медицинский университет, Гомель;
[2]Гомельская областная клиническая больница, Гомель, Беларусь;
[3]НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия

Реферат. Проанализированы уровни и профили антибиотикорезистентности для 296 клинических изолятов *Acinetobacter baumannii*, показано широкое распространение устойчивости к карбапенемам, аминогликозидам и фторхинолонам. У карбапенеморезистентных изолятов *A.baumannii* обнаружено присутствие генов сериновых β-лактамаз OXA-40. С использованием метода «шахматной доски» определена микробиологическая эффективность комбинаций антибиотиков. Комбинации полимиксин+рифампицин и полимиксин+сульбактам обладали синергическим антибактериальным действием в отношении карбапенемрезистентных изолятов.

Ключевые слова: ацинетобактеры, карбапенемазы, полимиксин, рифампицин, сульбактам, комбинации антибиотиков, госпитальные инфекции.

Введение. До настоящего времени в качестве одних из наиболее эффективных препаратов в лечении тяжелых нозокомиальных инфекций, вызванных *Acinetobacter baumannii*, рассматривались карбапенемы. Однако стремительное распространение разнообразных механизмов устойчивости к препаратам этой группы среди грамотрицательных неферментирующих бактерий требует пересмотра подходов к назначению стартовой антибактериальной терапии. Устойчивость ацинетобактеров к карбапенемам может быть связана с различными ферментативными (продукция карбапенемаз) и неферментативными (изменение проницаемости наружной клеточной мембраны и эффлюкс) механизмами. Однако в последнее время наиболее частым механизмом является продукция приобретенных карбапенемаз — сериновых β-лактамаз класса D, относящихся к генетическим группам OXA-23, OXA-40 и OXA-58 [1]. Приемлемую микробиологическую активность в отношении многих карбапенемрезистентных госпитальных изолятов *A.baumannii* сохраняют только полимиксины. Несмотря на высокую микробиологическую эффективность in vitro применение полимиксинов для терапии госпитальных инфекций, вызванных суперрезистентными грамотрицательными неферментирующими бактериями, сопряжено с рядом проблем. Среди них недостаточное поступление антибиотика в легочную ткань при парентеральном введении и отсутствие эффективных бактерицидных концентраций в очаге инфекции [2].

Перспективным направлением антибактериальной терапии бактериальных инфекций, вызванных суперрезистентными *A.baumannii*, является использование комбинаций антибиотиков, обладающих синергическим действием. Микробиологическая эффективность комбинаций антибиотиков трудно прогнозируема в связи с возможным присутствием у ацинетобактеров разнообразных механизмов резистентности даже к препаратам из одной группы. Поэтому для подбора эффективных комбинаций антибиотиков требуется микробиологическое тестирование множественно-устойчивых изолятов, выделенных от конкретного больного [3, 4].

Цель работы — определение уровней антибиотикорезистентности госпитальных изолятов *A.baumannii* и комбинации антибиотиков с синергической активностью в отношении карбапенемрезистентных изолятов.

Материалы и методы. В исследование включены 296 клинических изолятов *A.baumannii*, выделенных в 2013 г. от пациентов отделения интенсивной терапии и реанимации Гомельской областной клинической больницы.

Видовая идентификация проведена с использованием тест-систем для грамотрицательных неферментирующих бактерий API 20NE (Biomerieux, Франция). Рутинное определение чувствительности к антибактериальным препаратам (амикацин 30 мкг, ампициллин/сульбактам 10/10 мкг, цефтазидим 30 мкг, цефепим 30 мкг, меропенем 10 мкг, ципрофлоксацин 30 мкг) выполнено дискодиффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтон (диски с антибиотиками и питательная среда производства **HiMedia Laboratories**, Индия). При выполнении исследования, учете и интерпретации результатов руководствовались стандартами CLSI [5].

Для хранения и анализа микробиологической информации использовали программное обеспечение микробиологической лаборатории WHONET 5.6 (ВОЗ, Женева). Профили антибиотикорезистентности изолятов формировались автоматически по результатам интерпретации диаметров зон подавления роста. При попадании значения в категорию «устойчивый» (R) или «умеренно устойчивый» (I) в профиле антибиотикорезистентности указывалось кодовое обозначение антибактериального препарата (Am=амикацин, As=ампициллин/сульбактам, Cz=цефтазидим, Cm=цефепим, Me=меропенем, Cp=ципрофлоксацин), при попадании в категорию «чувствительный» (S) обозначение препарата в профиле не приводилось.

Для 8 изолятов *A.baumannii* с множественной лекарственной устойчивостью дополнительно определены минимальные подавляющие концентрации (МПК) амикацина, цефтазидима, имипенема, меропенема, левофлоксацина, полимиксина и рифампицина методом градиентной диффузии с использованием Е-тестов (Biomerieux, Франция). МПК нетилмицина и сульбактама определены методом микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон (BD, США).

Контроль качества определения чувствительности производили с использованием референтных штаммов Американской коллекции типовых культур *P.aeruginosa* ATCC 27853 и *E.coli* ATCC 25922.

Для идентификации генов приобретенных OXA-карбапенемаз трех основных генетических групп: OXA-23, OXA-40 и OXA-58, а также для выявления видоспецифических OXA-51-подобных β-лактамаз *A. baumannii* использовали метод мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с коммерческими наборами АмплиСенс® MDR Ab-OXA-FL (Интерлабсервис, Россия). Выделение бактериальной ДНК осуществляли с помощью наборов InstaGene Matrix (Bio-Rad, США). Амплификацию проводили с помощью системы Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Наличие генов-мишеней определяли по нарастанию уровня флуоресценции в результате гибридизации и расщепления олигонуклеотидных зондов, меченных различными флуорофорами: FAM (зеленый) для bla_{OXA-51}, JOE (желтый) для bla_{OXA-23}, ROX (оранжевый) для bla_{OXA-58} и Cy5 (красный) для bla_{OXA-40}.

Определение микробиологической эффективности комбинаций антибиотиков выполнено методом «шахматной доски» [6] в диапазоне концентраций каждого из двух препаратов от 1/16*МПК до 4*МПК. Заданные концентрации антибиотиков готовились в бульоне Мюллера-Хинтон и в объеме 100 мкл вносились в 64 ячейки (8x8) стерильного полистиролового 96-луночного планшета (общий объем среды в каждой ячейке — 200 мкл), после чего планшет инокулировали суспензией исследуемой культуры (конечная концентрация микробных клеток ≈ $5*10^5$ клеток/мл) и инкубировали в течение 18 ч при 35ºС в шейкере-инкубаторе с непрерывным низкоамплитудным встряхиванием. Учет результатов проводили по сравнению с контролем (рост в ячейке со средой, не содержащей антибиотиков). Рассчитывали фракционные подавляющие концентрации (ФПК) для каждого из препаратов в комбинации:

$$ФПК_A = МПК_{AB} / МПК_A,$$
$$ФПК_B = МПК_{BA} / МПК_{B,}$$

где $МПК_{AB}$ — минимальная подавляющая концентрация препарата А в присутствии препарата В;

$МПК_A$ — минимальная подавляющая концентрация препарата А без добавления второго препарата.

Индекс ФПК рассчитывался как сумма ФПК каждого из препаратов в комбинации:

$$ΣФПК = ФПК_A + ФПК_{B.}$$

При ΣФПК ≤0,5 эффект комбинации антибиотиков оценивался как синергический, при 0,5 < ΣФПК ≤ 1 — как аддитивный, при 1 < ΣФПК ≤ 4 — как нейтральный.

Результаты и их обсуждение. Результаты определения антибиотикорезистентности клинических изолятов *A.baumannii* представлены на рисунке.

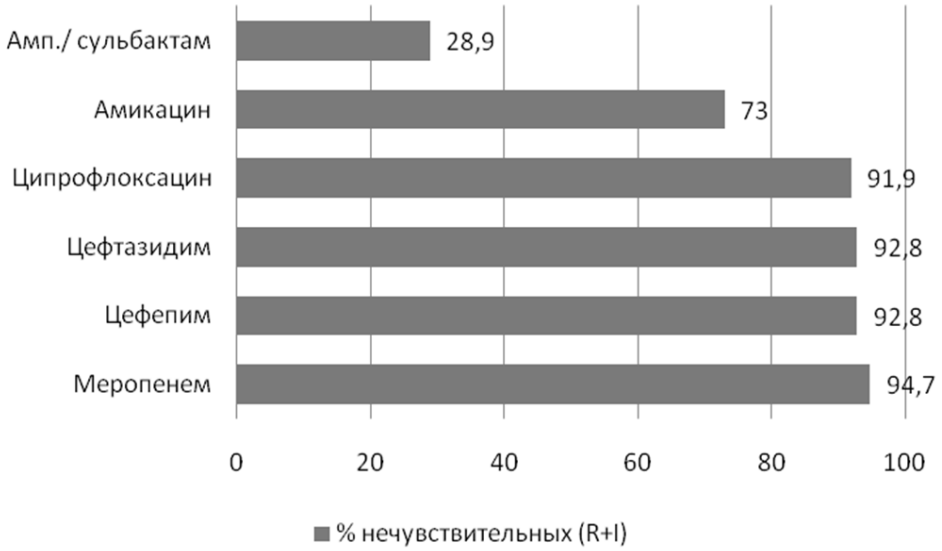


Рисунок — Антибиотикорезистентность клинических изолятов *A.baumannii*

Наибольшей активностью обладал ампициллин/сульбактам, нечувствительными (устойчивыми или умеренно устойчивыми) к которому были 28,9% изолятов. В отношении других β-лактамных антибиотиков и ципрофлоксацина для большинства изолятов (92–95%) выявлена устойчивость, 73% изолятов *A.baumannii* были нечувствительны к амикацину.

Профиль антибиотикорезистентности AmCzCmMeCp (нечувствительность ко всем тестируемым антибиотикам, за исключением ампициллина/сульбактама) обнаружен у 41,9% изолятов. Каждый четвертый изолят *A.baumannii* (25,3%) был нечувствительным ко всем тестируемым препаратам — профиль антибиотикорезистентности AmAsCzCmMeCp. Третий по частоте распространенности профиль резистентности CzCmMeCp выявлен у 14,5% изолятов.

У 6 карбапенемрезистентных изолятов *A.baumannii* с профилем антибиотикорезистентности AmAsCzCmMeCp выявлена продукция OXA-40-подобных карбапенемаз.

Для проведения дальнейших исследований и подбора синергических комбинаций антибиотиков для 8 множественно-лекарственно-устойчивых изолятов *A.baumannii* с профилем антибиотикорезистентности AmAsCzCmMeCp определены минимальные подавляющие концентрации антибиотиков методом градиентной диффузии (Е-тест) или методом микроразведений в бульоне. Все изоляты были чувствительны к полимиксину (МПК 0,19–0,5 мкг/мл) и резистентны к карбапенемам (МПК имипенема >32 мкг/мл, МПК меропенема >32 мкг/мл для всех изолятов). Отмечены высокие уровни устойчивости к аминогликозидам и фторхинолонам (для всех изолятов МПК амикацина >256 мкг/мл, МПК нетилмицина >256 мкг/мл, МПК левофлоксацина >32 мкг/мл). Значения МПК цефтазидима от 96 до 256 мкг/мл для различных изолятов.

МПК сульбактама 16 мкг/мл (у одного изолята), 32 мкг/мл (у 5), 64 мкг/мл (у 2). Таким образом, 7 из 8 изолятов в соответствии с критериями CLSI (резистентность при МПК ≥32 мкг/мл) [5] относились к категории «устойчивые», однако уровни МПК сульбактама превышали пограничные значения «чувствительность-устойчивость» не более чем в 2 раза в отличие от МПК карбапенемов, цефалоспоринов, аминогликозидов и фторхинолонов, для которых пограничные значения «чувствительность-устойчивость» были превышены в 4–8 раз и более.

МПК рифампицина составили 4 мкг/мл (у 3 изолятов), 8 мкг/мл (у 4 изолятов), 16 мкг/мл (у одного). Критерии интерпретации значений МПК рифампицина для грамотрицательных неферментирующих бактерий отсутствуют и в стандартах CLSI, и в стандартах EUCAST [7]. В стандарте Французского микробиологического общества (CA-SFM) пороговыми значениями чувствительности/устойчивости *A.baumannii* к рифампицину являются ≤4 мкг/мл (чувствительность), 8–16 мкг/мл (умеренная устойчивость), >16 мкг/мл (устойчивость) [8]. Таким образом, в соответствии с критериями CA-SFM устойчивостью к рифампицину обладал только один из 8 изолятов *A.baumannii*, при

этом для устойчивого изолята отсутствовало многократное превышение порогового значения МПК «чувствительность-устойчивость».

Полученные в ходе исследования МПК карбапенемов, цефалоспоринов, аминогликозидов и фторхинолонов для всех множественно-лекарственно-устойчивых изолятов *A.baumannii* многократно превысили пограничные концентрации, основанные на фармакокинетических/фармакодинамических данных (имипенем ≤2 мкг/мл, меропенем ≤2 мкг/мл, цефтазидим ≤4 мкг/мл, амикацин ≤8 мкг/мл, нетилмицин ≤2 мкг/мл, левофлоксацин ≤1 мкг/мл [7]), в этой связи возможные комбинации с включением указанных препаратов рассматривались нами как не имеющие перспектив для клинического использования и в дальнейшем не тестировались.

В соответствии с полученными значениями МПК для тестирования в виде комбинаций отобраны только полимиксин, рифампицин и сульбактам (комбинации полимиксин+рифампицин, полимиксин+сульбактам, рифампицин+сульбактам). Результаты определения микробиологической эффективности указанных комбинаций в отношении 4 множественно-лекарственно-устойчивых изолятов *A.baumanni* — продуцентов OXA-40-подобных карбапенемаз представлены в таблице. Наибольшая микробиологическая эффективность отмечена для комбинации полимиксин+рифампицин (ΣФПК ≤0,5 для всех изолятов, синергизм). Комбинация полимиксин+сульбактам была синергичной для 3 изолятов из 4 включенных в исследование, комбинация рифампицин+сульбактам только для 2 из 4, в остальных случаях был отмечен аддитивный эффект (ΣФПК = 1).

Таблица — Эффективность комбинаций антибиотиков в отношении множественно-лекарственно-устойчивых изолятов *A.baumannii* — продуцентов OXA-40 карбапенемаз

Комбинация	S			
	Изолят 1	Изолят 2	Изолят 3	Изолят 4
Полимиксин + рифампицин	0,18	0,18	0,5	0,38
Полимиксин + сульбактам	0,5	1	0,5	0,5
Рифампицин + сульбактам	0,5	0,5	1	1

Сульбактам — ингибитор β-лактамаз, который используется в виде комбинированных препаратов с ампициллином или цефоперазоном. OXA-карбапенемазы грамотрицательных неферментирующих бактерий устойчивы к действию ингибиторов (клавулановая кислота, тазобактам, сульбактам), однако в отношении ацинетобактеров сульбактам обладает самостоятельным антимикробным эффектом, заключающимся в блокировании синтеза пептидогликана клеточной стенки. Имеются указания на синергичность комбинаций сульбактама с фосфомицином или карбапенемами в отношении отдельных карбапенемрезистентных изолятов *A.baumannii*. Комбинация сульбактама с колистином *in vitro* проявляла синергическую активность в отношении колистинрезистентных изолятов *A.baumannii* [9]. В нашем исследовании синергическая активность комбинации сульбактама с полимиксином выявлена для 3 из 4 карбапенемрезистентных изолятов *A.baumannii*, каждый из которых сохранял чувствительность к полимиксину.

Заключение. Выявлено широкое распространение устойчивости к карбапенемам среди госпитальных изолятов *A.baumannii*, в отношении 25,4% изолятов только полимиксины сохраняли свою микробиологическую эффективность. Для карбапенемрезистентных множественно-лекарственно-устойчивых изолятов *A.baumannii,* продуцирующих карбапенемазы группы OXA-40*,* исследование позволило выявить эффективные комбинации на основе полимиксина, сульбактама и рифампицина, *in vitro* обладающие синергической активностью.

Высокие значения МПК карбапенемов, цефалоспоринов, аминогликозидов и фторхинолонов, многократно превышающие их пороговые ФК/ФД концентрации, не позволяют рекомендовать эти препараты для включения в схемы комбинированной антибактериальной терапии инфекций, вызванных устойчивыми к ним штаммами.

Литература

1. Мартинович, А.А. Динамика антибиотикорезистентности и эпидемиология инфекций, вызванных *Acinetobacter spp.* в России / А.А. Мартинович // Клинич. микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2010. — Т. 12, № 2 — С. 96–104.

2. «Old» antibiotics for emerging multidrug-resistant bacteria / P.J. Bergen [et.al.] // Curr. Opin. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 25. — P. 626–633.
3. Petrosillo, N. Colistin monotherapy vs. combination therapy: evidence from microbiological, animal and clinical studies / N. Petrosillo, E. Ioannidou, M.E. Falagas // Clin. Microbiol. Infect. — 2008. — Vol. 14. — P. 816–827.
4. Colistin and rifampicin in the treatment of nosocomial infections from multiresistant Acinetobacter baumannii / S. Motaouakkil [et. al.] // J. Infect. — 2006. — Vol. 53. — P. 274–278.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement M100-S23. — CLSI, Wayne, PA.
6. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and Etest / R.L. White [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. — 1996. — Vol. 40. — P. 1914–1918.
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.0, 2013. — Mode of access: http://www.eucast.org.
8. Comité de l' Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: Recommandations 2010 (Edition de Janvier 2010) / R. Bonnet [et al.]. — Mode of access: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm_2010.pdf.
9. Synergistic activity of sulbactam combined with colistin against colistin-resistant Acinetobacter baumannii / M. Kempf [et. al.] // Internat. J. Antimicrob.l Agents. — 2012. — Vol. 39. — P. 180–181.

EFFICIENCY OF ANTIBIOTICS COMBINATIONS AGAINST SUPERRESISTANT ISOLATES OF ACINETOBACTER BAUMANNII – PRODUCERS OF CARBAPENEMASES

Tapalski D.V.[1], Mozgova A.V.[2], Kozlova A.I.[2], Skleenova E.Yu.[3]
[1]Gomel State Medical University, Gomel;
[2]Gomel Regional Clinical Hospital, Gomel, Belarus;
[3]Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolemsk, Russia

We studied antibacterial resistance profiles of 296 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and found wide spread of carbamenem, aminoglycosides and fluoroquinolones resistance. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumanii* was found to have serine β-lactamase OXA-40 gene. Antimicrobial activity of drug combinations was studied in vitro using checkerboard method. Combinations of polymyxin with rifampicin and polymyxin with sulbactam shoved synergistic activity against carbapenem resistant isolates.

Keywords: Acinetobacter, carbapenemases, polymyxin, rifampicin, sulbactam, drug combinations, nosocomial infections.

Поступила 20.08.2014

ПРОГРАММА WHONET И МОНИТОРИНГ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *P. AERUGINOSA*

Цыркунов В.М.[1], Кроткова Е.Н.[2], Волосач О.С.[1], Гура Е.С.[2], Лазаревич С.Н.[3]
[1]Гродненский государственный медицинский университет, Гродно;
[2]Гродненская областная инфекционная клиническая больница, Гродно;
[3]Больница скорой медицинской помощи г. Гродно, Гродно, Беларусь

Реферат. Изучена резистентность к антибиотикам клинических изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов отделения реанимации больницы скорой медицинской помощи г. Гродно в 2013 г. Оценка данных антибиотикограмм микроорганизмов проводилась с помощью аналитической компьютерной программы WHONET (США).

Установлено, что наибольшую активность в отношении *P. aeruginosa* показал полимиксин. В отношении других антимикробных препаратов выявлена высокая резистентность штаммов *P. aeruginosa*, что диктует необходимость микробиологического мониторинга в учреждениях здравоохранения за развитием устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам.

Ключевые слова: *P. aeruginosa*, антибиотикорезистентность, мониторинг, программа WHONET.

Введение. Актуальной проблемой современной медицины является нарастание резистентности микроорганизмов к противомикробным препаратам [1–3]. Все это диктует необходимость проведения микробиологического мониторинга за циркуляцией возбудителей в учреждениях здравоохранения, изменением в их структуре и тенденциями развития устойчивости к противомикробным препаратам для проведения рациональной этиотропной терапии [4–6]. Таким критериям отве-

чает, рекомендованная ВОЗ компьютерная программа WHONET (США), разработанная для анализа и надзора за антибиотикорезистентностью бактерий [7]. Программа WHONET внедрена на базе бактериологической лаборатории учреждения здравоохранения «Гродненская областная инфекционная больница» (УЗ «ГОИКБ») с 2013 г. с целью оценки данных антибиотикограмм клинических изолятов бактерий, выделенных от пациентов, проходивших лечение как в данном стационаре, так и в других стационарах г. Гродно (центр коллективного пользования).

Цель работы — выявление антибиотикорезистентности клинических изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов отделения реанимации учреждения здравоохранения «Больница скорой медицинской помощи» (УЗ «БСМП») в 2013 г.

Материал и методы. Объектом исследования явились пациенты, проходившие стационарное лечение в отделении реанимации УЗ «БСМП» в 2013 г. Материал для микробиологического исследования был взят в зависимости от локализации патологического процесса (отделяемое из ран, мокрота, кровь, моча и др.), однако для более высокой достоверности результатов с учетом небольшого количества выделенных видов возбудителей анализ антибиотикорезистентности проводился в группах микроорганизмов без учета локализации патологического процесса, возраста и пола пациентов.

Забор биологического материала проводился по микробиологическим методикам в соответствии с инструкцией по применению МЗ РБ «Микробиологические методы исследования биологического материала» [8]. Культивация микроорганизмов проводилась на питательных средах российского производства. Верификацию видовой принадлежности выделенных микроорганизмов и определение антибиотикочувствительности проводили на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact (Biomerieux). Чувствительность к антибиотикам части исследуемых культур проводили диско-диффузионным методом с использованием дисков фирмы «Himedia» (Индия). Учет результатов производили, измеряя диаметр (с учетом диаметра диска) задержки роста. Для интерпретации полученных результатов использовали таблицы путем сопоставления диаметра зон задержки роста исследуемой культуры с пограничными значениями диаметра зоны в таблице.

Оценка данных антибиотикограмм микроорганизмов проводилась с помощью аналитической компьютерной программы WHONET (США).

Результаты обрабатывали статистически с помощью пакета прикладных программ «Статистика 6.0». В качестве уровня статистической значимости принято значение $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. В результате бактериологического исследования биологического материала, взятого от пациентов, проходивших лечение в отделении реанимации УЗ «БСМП» в 2013 г., были идентифицированы 6 видов грамотрицательных микроорганизмов. Видовой спектр выделенных возбудителей представлен в таблице 1.

Таблица 1 — Видовой спектр грамотрицательных микроорганизмов, выделенных от пациентов отделения реанимации УЗ «БСМП» в 2013 г.

Вид микроорганизма	Количество	Удельный вес, %±m
P. aeruginosa	39	60,9±6,1
A. baumannii	11	17,2±4,72
K. pneumonia	10	15,6 ±4,54
E. coli	2	3,1±2,17
P. mirabilis	1	1,6±1,55
E. cloacae	1	1,6±1,55
Всего грамотрицательных микроорганизмов	64	100

Как следует из представленной таблицы, основными возбудителями, выделенными от пациентов отделения реанимации УЗ «БСМП» в 2013 г. среди грамотрицательных бактерий, явились неферментирующие бактерии. Так, среди всех выделенных грамотрицательных микроорганизмов несомненным «лидером» была *P. aeruginosa*, обнаруженная в 60,9% случаев от общего количества выделенных грамотрицательных бактерий. Достаточно часто у пациентов обнаруживался **A**. *baumannii* (17,2%). Среди представителей семейства энтеробактерий чаще всего в биологическом материале присутствовала *K. pneumonia* (15,6% случаев). Удельный вес других представителей семейства эн-

теробактерий, выделенных от пациентов отделения реанимации УЗ «БСМП», был невелик и составил от 1,6 до 3,1% от всех грамотрицательных микроорганизмов.

Был проведен подробный анализ антибиотикорезистентности *P. aeruginosa*, которые являются не только частым возбудителем внутрибольничных инфекций, но и одними из наиболее «проблемных» агентов в отношении рационального подбора этиотропной терапии из-за множественной антибиотикорезистентности, а также продуцентами металло-β-лактамаз [9]. Подробный анализ антибиотикорезистентности остальных выделенных грамотрицательных микроорганизмов не проводился, так как малое количество выделенных штаммов не позволяет сделать исчерпывающие выводы.

На микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact была определена антибиотикорезистентность 16 культур *P. aeruginosa* к следующим антимикробным препаратам (АМП): ампициллин, пиперациллин, цефалотин, цефазолин, цефуроксим, цефтазидим, цефтриаксон, цефотаксим, цефепим, цефокситин, цефподоксим, цефуроксим аксетил, имипенем, меропенем, амикацин, гентамицин, тобрамицин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин, триметоприм, нитрофурантоин, тетрациклин. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Резистентность *P. aeruginosa* (n = 16), определенная на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact

Антимикробный препарат	Breakpoints	Чувстви-тельные, %	Умеренно устойчивые,%	Устойчивые, %
Ампициллин	S<=8 R>=32	6,2	0	93,8
Пиперациллин	S<=16R>=128	0	0	100,0
Цефалотин	S<=8 R>=32	0	0	100,0
Цефазолин	S<=1 R>=4	0	0	100,0
Цефуроксим	S<=8 R>=32	0	50,0	50,0
Цефтазидим	S<=4 R>=16	7,1	0	92,9
Цефтриаксон	S<=1 R>=4	8,3	0	91,7
Цефотаксим	S<=1 R>=4	0	0	100,0
Цефепим	S<=8 R>=32	20,0	6,7	73,3
Цефокситин	S<=8 R>=32	6,2	0	93,8
Цефподоксим	S<=2 R>=8	0	0	100.0
Цефуроксим аксетил	S<=4 R>=32	0	0	100,0
Имипенем	S<=4 R>=16	25,0	25,0	50,0
Меропенем	S<=4 R>=16	9,1	9,1	81,8
Амикацин	S<=16 R>=64	7,7	0	92,3
Гентамицин	S<=4 R>=16	6,2	12,5	81,2
Тобрамицин	S<=4 R>=16	40,0	0	60,0
Ципрофлоксацин	S<=1 R>=4	6,2	0	93,8
Левофлоксацин	S<=2 R>=8	7,1	7,1	85,7
Норфлоксацин	S<=4 R>=16	0	0	100,0
Триметоприм	S<=8 R>=16	0	0	100,0
Нитрофурантоин	S<=32 R>=128	0	0	100,0
Тетрациклин	S<=4 R>=16	0	0	100,0

Как следует из таблицы 2, отмечалась высокая резистентность *P. aeruginosa* к большинству β-лактамных антибиотиков. Так, к ампициллину резистентными оказались 93,8%, а к цефалоспоринам — от 50,0 до 100% выделенных штаммов. К цефалоспорину IV поколения — цефепиму чувствительными были только 20% исследуемых штаммов, умеренно устойчивыми были 6,7% и чувствительными — 20%. Высокая резистентность выделенных штаммов *P. aeruginosa* отмечена и к карбапенемам — к имипенему резистентными были 50% штаммов, умеренно устойчивыми и чувствительными – по 25%; к меропенему — резистентными — 81,8% и лишь по 9,1% — чувствительными и умеренно чувствительными.

Из группы аминогликозидов к амикацину были резистентны 92,3%, чувствительны — 7,7% выделенных штаммов *P. aeruginosa*; к гентамицину и тобрамицину резистентны — 81,2 и 60%, чувствительны — 6,2 и 40% соответственно.

Из фторхинолоновых антибиотиков к ципрофлоксацину резистентными оказались 93,8%, чувствительными лишь 6,2% штаммов *P. aeruginosa*, к левофлоксацину —резистентными — 85,7%, умеренно устойчивыми и чувствительными — по 7,1%. К норфлоксацину и остальным тестируемым АМП отмечалась 100%-я резистентность исследуемых штаммов *P. aeruginosa*.

Резистентность 23 культур *P. aeruginosa* диско-диффузионным методом была установлена к следующим антибиотикам: ампициллин, карбенициллин, цефтазидим, цефепим, амикацин, гентамицин, тобрамицин, полимиксин (таблица 3).

Таблица 3 — Резистентность *P. aeruginosa* (n = 23), определенная диско-диффузионным методом

Антимикробный препарат	Breakpoints	Чувствительные, %	Умеренно устойчивые,%	Устойчивые, %
Ампициллин	14–16	0	0	100,0
Карбенициллин	14–16	8,7	13,0	78,3
Цефтазидим	18–20	0	0	100,0
Цефепим	15–17	4,5*	6,7	95,5
Амикацин	15–16	4,3	4,3	91,3
Гентамицин	13–14	4,3	4,3	91,3
Тобрамицин	13–14	13*	4,3	82,6
Полимиксин	S >= 12	95,2	0	4,8

Примечание — *p<0,05.

Полученные результаты были сопоставимы с данными антибиотикограмм, полученных на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact, однако, к сожалению, спектр тестируемых антибиотиков диско-диффузионным методом был значительно уже. При исследовании антибиотикочувствительности клинических изолятов P. aeruginosa этим методом установлено, что устойчивыми к большинству исследуемых антибиотиков были от 78,3 до 100% штаммов, причем достоверно меньше было чувствительных штаммов P. aeruginosa к цефепиму (4,5%) и тобрамицину (13%). Наибольшая активность в отношении P. aeruginosa отмечена у полимиксина, к которому чувствительными оказались 95,2% выделенных штаммов.

Анализируя полученные данные, следует отметить, что выделенные штаммы P. aeruginosa оказались высокорезистентными к абсолютному большинству исследуемых препаратов.

Заключение. В результате микробиологического мониторинга спектра грамотрицательных микроорганизмов и их чувствительности/устойчивости к антимикробным препаратам в отделении реанимации УЗ «БСМП» в 2013 г. установлено, что лидирующим возбудителем являлась P. aeruginosa, удельный вес которой от всех выделенных микроорганизмов составил 60,9%. Несколько реже от пациентов отделения реанимации высевались A. baumannii и K. pneumonia, удельный вес которых от всех выделенных грамотрицательных микроорганизмов составил 17,2 и 15,6% соответственно. Другие представители семейства энтеробактерий (E. coli, P. mirabilis, E. cloacae) высевались из биологического материала пациентов отделения реанимации в единичных случаях.

Анализ чувствительности клинических изолятов P. aeruginosa к АМП, выделенных от пациентов отделения реанимации УЗ «БСМП», показал, что наибольшей эффективностью в отношении P. aeruginosa обладает полимиксин (95,2% чувствительных штаммов). Отмечен значительный рост резистентности P. aeruginosa в отношении группы карбопенемов: имипенема и меропенема, к которым чувствительными оказались лишь по 25,0 и 9,1% штаммов соответственно. К абсолютному большинству других тестируемых препаратов данные микроорганизмы демонстрировали высокую резистентность, что нередко требует использования комбинаций противомикробных препаратов для преодоления их устойчивости.

Таким образом, нарастание резистентности к антимикробным препаратам и селекция наиболее устойчивых штаммов диктуют необходимость постоянного мониторинга за спектром возбудителей, циркулирующих в стационарах, регулярного обновления базы данных по их чувствительности/

резистентности для оптимизации противомикробной терапии. Для этого целесообразно в каждом стационаре разработать формуляр с перечнем ведущих этиологических агентов и их чувствительности к антимикробным препаратам во избежание нерационального назначения противомикробных препаратов и неэкономного расходования бюджетных средств.

Литература

1. Козлова, Н.С. Антибиотикорезистентность стафилококков, выделенных из крови / Н.С. Козлова, Е.П. Баранцевич, Н.Е. Баранцевич // Научное обозрение. — 2014. — № 3. — С. 184–189.
2. Кубраков, К.М. Грамположительные микроорганизмы и их антибиотикорезистентность при инфекциях нижних дыхательных путей у нейрохирургических пациентов / К.М. Кубраков, А.Ю. Федукович // Неврология и нейрохирургия. Восточная Европа. — 2012. — № 2. — С. 130–132.
3. Ягодина, А.Ю. Антибиотикорезистентность изолятов, выделенных в кардиохирургическом стационаре от пациентов с сахарным диабетом и ВИЧ-инфекцией / А.Ю. Ягодина [и др.] // Инфекция и иммунитет. — 2013. — Т. 3, № 1. — С. 37–43.
4. Ермакова, Т.С. Видовая структура и антибиотикорезистентность возбудителей гнойно-септических инфекций / Т.С. Ермакова, В.А. Горбунов, Л.П. Титов // Здравоохранение. — 2011. — № 10. — С. 16–25.
5. Илюкевич, Г.В. Антибиотикорезистентность грамотрицательных возбудителей госпитальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров г. Минска / Г.В. Илюкевич, В.М. Смирнов, Н.Н. Левшина // Антибиотики и химиотерапия. — 2009. — Т. 54, № 11–12. — С. 25–31.
6. Яковлев, С.В. Антибиотикорезистентность в стационаре: контролируем ли мы ситуацию? / С.В. Яковлев [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. — 2010. — Т. 55, № 1–2. — С. 50–58.
7. Титов, Л.П. Мониторинг резистентности микроорганизмов к антибактериальным средствам как элемент системы эпидемиологического надзора и ключевое направление Европейского стратегического плана действий по проблеме / Л.П. Титов [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2013. — Вып. 6. — С. 152–161.
8. Микробиологические методы исследования биологического материала: инструкция по применению МЗ РБ № 075-0210: утв. 19.03.2010. — Минск, 2010. — 123 с.
9. Осипова, В.А. Мониторинг резистентности микроорганизмов к антибактериальным средствам как элемент системы эпидемиологического надзора и ключевое направление Европейского стратегического плана действий по проблеме / В.А. Осипова [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2012. — № 4. — С. 92–97.

WHONET PROGRAM AND MONITORING OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF CLINICAL ISOLATES P. AERUGINOSA

Tsyrkunov V.M.[1], Krotkova E.N.[2], Volosach O.S.[1], Gura E.N.[2], Lazarevich S.N.[3]
[1]Grodno State Medical University, Grodno;
[2]Grodno Regional Clinical Hospital of Infectious Diseases, Grodno;
[3]Grodno Clinical Emergency Hospital, Grodno, Belarus

The antibiotic resistance of the clinical isolates *P. aeruginosa* in patients of Grodno Clinical Emergency Hospital in 2013 has been studied. The assessment of antibiogram was carried out using the analytical computer program WHONET (USA).

It has been detected that polymyxinum showed the highest activity towards *P. aeruginosa*. What concerns other antimicrobial preparations high resistance of *P. aeruginosa* strains has been revealed, which shows the necessity of microbiological monitoring of microorganisms resistance to antimicrobial preparations in healthcare institutions.

Keywords: *P. aeruginosa*, antibiotic resistance, monitoring, WHONET program.

Поступила 22.08.2014

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ОЗЕЛТАМИВИРУ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ В ТЕЧЕНИЕ 2012–2014 гг.

Чешенок Е.В., Грибкова Н.В., Сивец Н.В., Шмелева Н.П.
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. В данной статье представлены результаты исследования чувствительности к ингибиторам нейраминидазы эпидемических вирусов гриппа, циркулировавших на территории Республики Беларусь, в течение 2012–2014 гг.

Ключевые слова: вирусы гриппа, озелтамивир, чувствительность к препаратам, единичный нуклеотидный полиморфизм.

Введение. Грипп в течение долгих лет продолжает оставаться одной из наиболее актуальных медицинских и социальных проблем вследствие способности глобально распространяться по всему миру. По статистическим данным в Республике Беларусь в периоды ежегодных эпидемий вирусы гриппа поражают от 5 до 10% совокупного населения контрольных городов [1]. Однако среди детской популяции уровень заболеваемости выше и достигает 20–30% [1].

Ведущую роль в ежегодном эпидемическом процессе играет постоянная изменчивость вирусной антигенной структуры, поскольку вирусы гриппа А и В находятся в состоянии генетического дрейфа [2, 3]. Антигенный дрейф происходит в результате точечных мутаций в геноме вируса, что в свою очередь приводит к изменению антигенных детерминант поверхностных белков до такой степени, что они перестают распознаваться иммунной системой хозяина. Эти мутации возникают чаще спонтанно и вызывают появление новых штаммов вируса, которые быстро распространяются среди людей [4].

В качестве основного метода борьбы с гриппом Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) рекомендована вакцинопрофилактика, однако эффективность ее во многом зависит от корреляции вакцинных и эпидемических штаммов вирусов гриппа. В случае их несовпадения или отсутствия вакцинации у пациента на первый план выступают специфические противогриппозные препараты. В настоящее время для лечения гриппа лицензированы и широко используются две группы противогриппозных препаратов: производные адамантанов (амантадин и ремантадин) и ингибиторы нейраминидазы (озелтамивир и занамивир) [5]. Так как циркулирующие в настоящее время вирусы гриппа устойчивы к адамантанам, в качестве основных лечебных препаратов ВОЗ рекомендует использовать ингибиторы нейраминидазы [6].

Цель работы — оценка молекулярно-генетическим методом чувствительности к озелтамивиру эпидемических вирусов гриппа, циркулировавших на территории Республики Беларусь в течение 2012–2014 гг.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования использовали клинические образцы от пациентов с респираторной симптоматикой, у которых методом обратной транскрипции полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) была выявлена РНК вирусов гриппа. Было исследовано 85 образцов, содержащих генетический материал вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и 59 гриппа A(H3N2).

Выделение вирусной РНК и реакцию ОТ проводили с использованием наборов реагентов «Рибо-сорб» и «Реверта-L» (ФГУН ЦНИИЭ, РФ) в соответствии с инструкцией производителя. Для выявления генетического материала вирусов гриппа А образцы исследовали методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени. В работе использовали диагностические наборы АмплиСенс (ФГУН ЦНИИЭ, РФ).

Определение чувствительности эпидемических штаммов к озелтамивиру проводили по методике, описанной E. van der Vries et al. [7]. Исследование материала проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием специфических праймеров и реагентов производства ОДО «Праймтех»; выполнено на приборе RotorGene6000 (Corbett Research, Австралия).

В качестве положительного контроля чувствительности к ингибиторам нейраминидазы при постановке ОТ-ПЦР в реальном времени использовали РНК вируса гриппа А/Минск/42/2009 (H1N1)pdm09 и А/Гомель/1613/2012(H3N2). Данные о чувствительности к озелтамивиру вирусов А/Минск/42/2009 (H1N1)pdm09 и А/Гомель/1613/2012(H3N2) были подтверждены ранее методом секвенирования в диагностическом центре ВОЗ (Лондон) и любезно предоставлены в виде годового отчета.

Результаты и их обсуждение. Согласно данным литературы, самыми распространенными мутациями, отвечающими за формирование резистентности к озелтамивиру, является замена аргинина на лизин в положении 292 (Arg292Lys) белка нейраминидазы вирусов гриппа A(H3N2) и гистидина на тирозин в положении 274 (His274Tyr) белка нейраминидазы вируса гриппа A(H1N1) pdm09 [7–10]. Для выявления данного единичного нуклеотидного полиморфизма (single nucleotide polymorphism, SNP) был использован метод полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. Ключевым элементом диагностики SNP является присутствие в реакционной

смеси пары аллель-специфичных зондов, позволяющих раздельно выявлять продукты на двух каналах флуоресценции, что позволяет определить присутствие каждого из аллелей исследуемого полиморфизма [7].

С целью выявления мутаций, обусловливающих развитие резистентности к озелтамивиру, по базе данных Genbank (www.ncbi.nlm.nik.gov) проведен анализ участков генома вирусов гриппа, кодирующих ген нейраминидазы вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и A(H3N2). Подбор олигонуклеотидов (праймеров) проводили с помощью программы BioEdit 7.7.0. Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресцентно-меченных зондов представлены в таблице.

Таблица — Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченные зонды, использованные в ходе исследования

Название праймера (зонда)	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Длина п.н.
A(H1N1)pdm09		
F H274Y NA1	AAGGGAAAGATAGTCAAATCAGT	23
R H274Y NA1	ACACACATGTGATTTCACTAGAAT	24
AS H274Y NA1	ROX-CCTAATTAT**C**ACTATGAGGAATG- (BHQ2)	23
AR H274Y NA1	HEX-CCTAATTAT**T**ACTATGAGGAATG- (BHQ2)	23
A(H3N2)		
F R292K NA2	GAGTGCTCCTGTTATCCTC	19
R R292K NA2	ACATAACTGGAAACAATGCTATAAT	25
AS R292K NA2	ROX-TGCA**G**AGACAACTGGAAAGGCT-(BHQ2)	22
AR R292K NA2	HEX-TGCA**A**AGACAACTGGAAAGGCT-(BHQ2)	22

Исследования проводили методом ОТ-ПЦР, в результате которой на матрице РНК была синтезирована кДНК. Амплификацию проводили в конечном объеме 25 мкл реакционной смеси, содержащей следующие компоненты: 600 нМ прямого и обратного праймеров, по 200 нМ одного из зондов, 650 мМ Трис-HCl, 166 мМ $(NH_4)2SO_4$, 0,2% Твин 20, 2 мМ каждого dNTP, 2,5 мМ $MgCl_2$, 2,5 единицы Taq-полимеразы, а также 10 мкл кДНК исследуемого материала.

Температурные условия реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени были следующими: 1 этап: обратная транскрипция — 37°C — 30 мин; 2 этап: амплификация — 95°C — 5 мин — 1 цикл — денатурация молекул ДНК; 1 блок циклирования включает10 циклов без детекции сигнала: 95°C — 10 с, 58°C — 20 с, 72°C — 20 с; 2 блок циклирования по температурным параметрам аналогичен первому и включает 35 циклов с детекцией флуоресцентного сигнала по двум каналам (Orange и Yellow).

Полученные результаты интерпретировали на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб кДНК, выделенных из исследуемых образцов. Интерпретация производилась автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Среди исследуемых 85 образцов, ассоциированных с вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 сезона 2012–2013 гг., лишь в одном образце была выявлена замена His274Tyr. Среди вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 сезона 2013–2014 гг. подобных замен не выявлено. В то же время все эпидемические вирусы гриппа A(H3N2), циркулировавшие в сезоны 2012–2013 гг. и 2013–2014 гг., сохранили чувствительность к озельтамивиру.

Полученные результаты указывают на то, что в редких случаях могут возникать мутации в 274 (His274Tyr) положении белка NA1, сопряженные с чувствительностью к озелтамивиру. Однако в целом популяция вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и A(H3N2) на протяжении двух эпидемических сезонов сохраняла чувствительность к ингибиторам нейраминидазы.

Заключение. Все вирусы гриппа A(H3N2), выявленные на территории Республики Беларусь в анализируемые сезоны, сохранили чувствительность к озелтамивиру.

Среди исследованных 85 клинических образцов, ассоциированных с вирусом гриппа A(H1N1) pdm09, лишь в одном случае была выявлена точечная мутация в положении 274 (His274Tyr) белка

NA1, отвечающая за формирование резистентности к озелтамивиру. Однако несмотря на такие низкие показатели следует учитывать, что широкое и неоправданное применение озелтамивира теоретически может привести к увеличению процента резистентных штаммов. Появление резистентных мутантов к озелтамивиру в популяции вирусов гриппа определяется не только бесконтрольным использованием препарата для профилактики и лечения гриппа, но и иммунным статусом пациента. Кроме того, имеющиеся к настоящему моменту данные литературы в отношении таких мутантов свидетельствуют о низкой их вирулентности и неспособности к активной передаче от человека к человеку [11].

Полученные данные еще раз подчеркивают необходимость постоянного контроля циркулирующих вирусов гриппа и изучения их чувствительности к применяемым противогриппозным препаратам для обеспечения эффективной химиотерапии гриппа.

Литература

1. Особенности эпидемического сезона по гриппу 2011–2012 гг. в Беларуси / Н.В. Грибкова [и др.] // Здравоохранение. — 2012. — № 11. — С. 28–32.

2. Львов, Д.К. Особенности эпидемии гриппа на отдельных территориях России в эпидемическом сезоне 2012-2013 гг. Доминирование штаммов вируса гриппа A(HlNl)pdm09 в странах Европы / Д.К. Львов, Е.И. Бурцева, Э.В. Силуянова // Вопр. вирусологии. — 2014. — № 2. — С. 5–10.

3. Шевченко, Е.С. Эффективность изоляции вирусов гриппа А и В из носоглоточных смывов, взятых в пробирки Σ-Virocult® (M40 Compliant, SigmaVirocult) и Virocult® (M40 Compliant, Virocult), в эпидемическом сезоне 2010–2011 гг. / Е.С. Шевченко, Н.В. Бреслав, Э.В. Силуянова // Вопр. вирусологии. — 2013. — № 3. — С. 42–45.

4. Чернова, Т.М. Противовирусные препараты в лечении гриппа / Т.М. Чернова, В.Н. Тимченко // Терра медика. — 2011. — № 1 (64). — С. 10–14.

5. Определение генетических маркеров резистентности к противогриппозным препаратам эпидемических штаммов вируса гриппа А (H1N1) / Н.П. Шмелева [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / Гос. учрежд. НИИ эпидемиол. и микробиол.; редкол.: Л.П. Титов [и др.]. — Минск, 2008. — Вып. 1. — С. 58–60.

6. WHO guidelines for pharmacological management of pandemic (H1N1) 2009 influenza and other influenza viruses. Geneva, World Health Organization / [Electronic resource]. — 2009. — Mode of access: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_use_antivirals_20090820/en/index.html. — Date of access: 11.2012.

7. Evaluation of a rapid molecular algorithm for detection of pandemic influenza A (H1N1 2009 virus and screening for a key oseltamivir resistance (H275Y) substitution in neuraminidase / E. van der Vries [et. al.] / J. Clin. Virol. — 2010. — Vol. 47. — P. 34–37.

8. Чувствительность к ремантадину и озелтамивиру вирусов гриппа А, изолированных на территории Республики Беларусь / Н.П. Шмелева [и др.] // Воен. медицина. — 2008. — № 4. — С. 95–98.

9. 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.

10. Detection of influenza A H1N1 and H3N2 mutations conferring resistance to oseltamivir using rolling circle amplification / M.C. Steain [et al.] // Antiviral Res. — 2009. — Vol. 84, № 3. — P. 242–248.

11. Изучение чувствительности эпидемических штаммов вируса гриппа А(H1N1), изолированных в России в сезоны 2006–2009 гг., к озельтамивиру (TamifluTM) с помощью молекулярно-генетических методов / Н.В. Белякова [и др.] // Вопр. вирусологии. — 2010. — № 5. — С. 10–13.

THE SENSITIVITY TO OSELTAMIVIR OF EPIDEMIC INFLUENZA VIRUSES, CIRCULATING IN REPUBLIC OF BELARUS DURING 2012-2014 YEARS

Chashanok A.V., Gribkova N.V., Sivets N.V, Shmialiova N.P.

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

The sensitivity to oseltamivir of epidemic flu viruses 2012–2014 is presented. Virtually all of the analyses clinical specimens associated with influenza viruses A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) remained sensitive to oseltamivir.

Keywords: influenza viruses, oseltamivir, sensitivity to drag, single nucleotide polymorphism.

Поступила 22.08.2014

Именной указатель

А

Азарова И.А. 95
Амвросьева Т.В. 16, 20, 48, 123, 157, 171
Андреев В.П. 176
Анищенко Е.В..... 128
Аношко О.Н..... 51
Антоневич Н.Г..... 132

Б

Бадыгина Н.А..... 268
Барановская Е.И..... 162
Барановская Н.Н. 16, 123
Барковский Е.В. 262
Бискина Н.М. 41
Боган И.Н..... 41
Богуцкий М.И..... 278
Богуш З.Ф..... 20, 48, 123, 171
Бореко Е.И. 281

В

Вальчук И.Н. 137
Веденьков А.Л. 92, 95
Вершинин П.Ю. 166
Винничек Л.А. 289
Виноград Н.А. 30, 34, 114
Винокурова Н.В. 247
Виринская А.С..... 41
Владыко А.С..... 239, 244, 247
Волосач О.С. 308

Г

Гасретова Т.Д..... 253
Герасимов В.Н. 253
Гиндюк Н.Т..... 38
Глебко Л.В..... 38
Глинская И.Н..... 101
Гончаров А.Е..... 132, 142, 224
Горбич О.А. 151
Горбунов В.А..... 3, 295
Грибкова Н.В..... 51, 312
Губерская М.П. 166
Гудков В.Г..... 41, 257
Гура Е.С..... 278, 308

Д

Давидович Г.М. 142
Дашкевич Э.В..... 206
Дедюля К.Л..... 48, 123, 157
Дейкун Д.А..... 227
Докукина Т.В. 211
Долина И.В..... 154
Дронина А.М. 137
Дубина Д.А. 114
Дубков Н.А. 239, 247
Дуж Е.В..... 142
Думова С.А..... 66
Дыбас И.В. 192
Дюсьмикеева М.И..... 273

Е

Ермакова Т.С..... 289, 295
Ермолович М.А..... 107, 262

Ж

Жаворонок С.В. 162

З

Зайцева Л.В..... 41
Земко В.Ю..... 197
Землянский В.А. 48, 123, 157
Зновец Т.В..... 162
Зуева В.Л. 20

К

Казинец О.Н..... 16
Калачик О.В..... 166, 171
Каленчиц И.А..... 206
Канашкова Т.А. 66
Карабан И.А..... 3
Квачева З.Б. 132, 211
Кирилюк О.Д..... 197
Климович О.В..... 92, 95
Клюйко Н.Л..... 41, 66, 300
Козлова А.И..... 304
Козлова М.В. 166, 171
Колодкина В.Л. 59
Комаренко Н.С..... 34
Конюк Л.А. 71
Коржель Т.С..... 206
Костюк С.А..... 232, 268
Кравчук Р.И..... 176
Крамаренко Л.П. 289
Красавцев Е.Л..... 128, 188
Кроткова Е.Н. 308
Кузьмич И.А. 278

Кулага О.К. *232*

Л

Лазаревич С.Н *308*
Лапо Т.П. *51*
Лапушкина Т.Н *3*
Левшина Н.Н. *101, 300*
Лосева Е.М. *66*

М

Макович В.Н. *171*
Малиновская Ю.В. *227*
Мамчиц Л.П. *55*
Манак Т.Н. *182*
Мартынов В.С. *59*
Матиевская Н.В. *176*
Медведева К.В. *182*
Мельникова Е.И. *3*
Миронов А.Ю. *62*
Михед Т.М. *188*
Мозгова А.В. *304*

Н

Надрага А.Б. *192*
Нарбин А.В. *166*
Наройчик Л.К. *41*
Никандров В.Н. *216*
Новацкая Ю.В. *41*
Носова Е.С. *300*

О

Окулич В.К. *197*
Орлова С.В. *154*

П

Павлов К.И. *200*
Паплевка Т.В. *273*
Пашкович В.В. *41*
Петкевич А.С. *3*
Петрова Л.Г. *132*
Пешняк Ж.В. *206*
Поклонская Н.В. *16, 20, 48, 123, 171*
Полещук Н.Н. *211, 227*
Поликарпов А.П. *16*
Полуян О.С. *268*
Полякова Н.В. *66*
Пронько Н.В. *71*
Пыжова Н.С. *216*

Р

Романова И.В. *142, 224*
Рубаник Л.В. *211, 227*
Рудакова С.А. *76*
Рудаков Н.В. *76*
Рудая Л.Н. *38*
Руденкова Т.В. *232, 268*
Руденко Д.Н. *232*
Рыбак Н.А. *236*
Рыбак Р.Ф. *236*
Рытик П.Г. *81*

С

Савельева А.К. *300*
Садовникова Г.В. *38*
Садовский Д.Н. *166, 171*
Самойлова Т.И. *8, 92, 95*
Самойлович Е.О. *66, 107, 262*
Свирновская Э.Л. *206*
Свирчевская Е.Ю. *107*
Северинчик И.В. *101*
Семейко Г.В. *66, 107*
Семижон П.А. *239, 244*
Сивец Н.В. *51, 312*
Сидоренко И.В. *132*
Скальская Н.И. *30*
Склеенова Е.Ю. *304*
Смолякова М.В. *166*
Соглаева А.А. *92, 95*
Сошко С.В. *206*
Спиридонов В.Е. *98*
Счесленок Е.П. *239, 244*
Счеслёнок Е.П. *247*

Т

Тапальский Д.В. *304*
Титов Л.П. *200, 273, 289, 295, 300*

У

Устинович Е.В. *244*

Ф

Феби Д. *122*
Федорова И.В. *101*
Филонюк В.А. *3*
Фисенко Е.Г. *101*
Фомина Е.Г. *239, 244, 247*
Фролова Я.Н. *253*

Х

Харсеева Г.Г. *253*
Хмара М.Е...... *257*
Хрусталева Т.А...... *262*
Хрусталев В.В. *262*
Хулуп Г.Я. *206*

Ц

Цыркунов В.М...... *176, 236, 308*

Ч

Чекан В.Л. *132*
Чернякова Н.И...... *98*
Чешенок Е.В. *312*
Чистенко Г.Н...... *101, 137, 151*

Ш

Шиманович В.П...... *3, 107*
Шиманская И.Г...... *232, 268*
Школина Т.В...... *239*
Шмелева Н.П...... *51, 312*
Шныр И.В. *289*

Ю

Юрченко О.А...... *114*

Я

Якубович А.Е...... *41*
Янович О.О...... *273*
Ястребов В.К...... *76*
Яшкова С.Е. *92, 95*

Р

Pheby D. *118*

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

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ОБЕСПЕЧЕНИЯ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
Горбунов В.А., Филонюк В.А., Карабан И.А., Мельникова Е.И., Петкевич А.С., Шиманович В.П., Лапушкина Т.Н. 3

НАУЧНЫЙ ВКЛАД АКАДЕМИКА В.И. ВОТЯКОВА В СТАНОВЛЕНИЕ И РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ АРБОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
Самойлова Т.И. 8

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ 16

АЛГОРИТМ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСОГО КОНТРОЛЯ ОБЪЕКТОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ ЧЕЛОВЕКА
Амвросьева Т.В., Казинец О.Н., Поклонская Н.В., Барановская Н.Н.1, Поликарпов А.П. 16

ЭНТЕРОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: СТУКТУРА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ И ЕЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Богуш З.Ф., Зуева В.Л. 20

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ НАСЕЛЕНИЯ К COXIELLA BURNETI В КАРПАТСКОМ РЕГИОНЕ УКРАИНЫ
Виноград Н.А., Скальская Н.И. 30

СЕРОЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК В КИЕВСКОЙ ОБЛАСТИ
Виноград Н.А., Комаренко Н.С. 34

О ПРОВОДИМОМ МОНИТОРИНГЕ И ЭПИДСКРИНИНГЕ ЗА РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ НА ТЕРРИТОРИИ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ
Гиндюк Н.Т., Садовникова Г.В., Глебко Л.В., Рудая Л.Н. 38

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИ, ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ РОТАВИРУСОВ И ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К ВОЗБУДИТЕЛЮ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
Гудков В.Г., Виринская А.С., Бискина Н.М., Новацкая Ю.В., Наройчик Л.К., Пашкович В.В., Якубович А.Е., Боган И.Н., Клюйко Н.Л., Зайцева Л.В. 41

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ ВК-ВИРУСОВ
Дедюля К.Л., Землянский В.А., Поклонская Н.В., Богуш З. Ф., Амвросьева Т.В. 48

АНАЛИЗ СЛУЧАЕВ ЗАБОЛЕВАНИЯ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ СРЕДИ ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ ЗА ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ СЕЗОНЫ 2012–2013 и 2013–2014 гг.
Лапо Т.П., Сивец Н.В., Грибкова Н.В., Шмелева Н.П., Аношко О.Н. 51

ОБРАЗ И КАЧЕСТВО ЖИЗНИ ЛИЦ ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА И ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ
Мамчиц Л.П. 55

СИКВЕНС-ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ВИРУЛЕНТНЫХ ГЕНОВ ШТАММОВ BORDETELLA PERTUSSIS, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В БЕЛАРУСИ
Мартынов В.С., Колодкина В.Л. 59

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ В ПРОФИЛАКТИКЕ ИНФЕКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ
Миронов А.Ю. 62

ГЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПЕЙЗАЖ РОТАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2014 Г. В Г. МИНСКЕ, ГОМЕЛЬСКОЙ И МОГИЛЕВСКОЙ ОБЛАСТЯХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
Полякова Н.В., Семейко Г.В., Самойлович Е.О., Клюйко Н.Л., Думова С.А., Лосева Е.М., Канашкова Т.А. 66

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТРОБАКТЕРНОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ
Пронько Н.В., Конюк Л.А. 71

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА И ПРОФИЛАКТИКА ТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА, ПЕРЕДАВАЕМЫХ КЛЕЩАМИ, В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Рудаков Н.В., Ястребов В.К., Рудакова С.А. 76

ИЗ ИСТОРИИ ИЗУЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В БЕЛОРУССИИ
Рытик П.Г. 81

ДИНАМИКА ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В БЕЛАРУСИ ЗА ПОСЛЕДНИЕ 10 ЛЕТ
Самойлова Т.И., Климович О.В., Соглаева А.А., Яшкова С.Е., Веденьков А.Л. 92

ИНФИЦИРОВАННОСТЬ КРОВОСОСУЩИХ КОМАРОВ И МОШЕК ВИРУСОМ ЗАПАДНОГО НИЛА НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ В 2011–2013 гг.
Соглаева А.А., Самойлова Т.И., Климович О.В., Азарова И.А., Яшкова С.Е., Веденьков А.Л. 95

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ
Спиридонов В.Е., Чернякова Н.И. 98

РОЛЬ СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ Г. МИНСКА К ВИРУСУ ГЕПАТИТА *А*
Федорова И.В., Чистенко Г.Н., Северинчик И.В., Глинская И.Н., Фисенко Е.Г., Левшина Н.Н. 101

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
Шиманович В.П., Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А. 107

ЛИХОРАДКА ЗАПАДНОГО НИЛА НА ЮГЕ УКРАИНЫ
Юрченко О.А., Дубина Д.А., Виноград Н.А. 114

RECENT DEVELOPMENTS IN ME/CFS RESEARCH IN THE UK
Pheby D. 118

РАЗВИТИЕ ИЗУЧЕНИЯ МИАЛГИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛИТА/СИНДРОМА ХРОНИЧЕСКОЙ УСТАЛОСТИ В ВЕЛИКОБРИТАНИИ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ
Феби Д. 122

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА 123

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОТРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ПОЛИОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
Амвросьева Т.В., Богуш З.Ф., Поклонская Н.В., Дедюля К.Л., Барановская Н.Н., Землянский В.А. 123

ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ НЕКОТОРЫХ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ В ГРУППАХ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ И ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ
Анищенко Е.В., Красавцев Е.Л. 128

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭКТОМЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
Антоневич Н.Г., Гончаров А.Е., Квачева З.Б., Чекан В.Л., Сидоренко И.В., Петрова Л.Г. 132

ОСТРЫЕ РЕСПИРАТОРНЫЕ ИНФЕКЦИИ, ПЕРИНАТАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ И ДРУГИЕ ФАКТОРЫ РИСКА В ГЕНЕЗЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ
Вальчук И.Н., Чистенко Г.Н., Дронина А.М. 137

СУБПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ, ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ
Гончаров А.Е., Давидович Г.М., Романова И.В., Дуж. Е.В. 142

ТЯЖЕЛАЯ ВНЕБОЛЬНИЧНАЯ ПНЕВМОНИЯ: ПРИЧИНЫ, ФАКТОРЫ РИСКА, ПРОФИЛАКТИКА
Горбич О.А., Чистенко Г.Н. 151

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНОГО СИНУСИТА, АССОЦИИРОВАННОГО С АДЕНОВИРУСОМ
Долина И.В., Орлова С.В. 154

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АРМИРОВАННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КАЧЕСТВЕ КОНТРОЛЕЙ ДЛЯ ПЦР-ДЕТЕКЦИИ РНК-ВИРУСОВ
Землянский В.А., Дедюля К.Л., Амвросьева Т.В. 157

ТЕЧЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ И РОДОВ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С
Зновец Т.В., Барановская Е.И., Жаворонок С.В. 162

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ФАКТОРЫ РИСКА ИНФЕКЦИИ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА
Калачик О.В., Нарбин А.В., Вершинин П.Ю., Губерская М.П., Козлова М.В., Смолякова М.В., Садовский Д.Н. 166

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗНЫХ ВАРИАНТОВ ПРОФИЛАКТИКИ ЦМВ-ИНФЕКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ
Калачик О.В., Садовский Д.Н., Амвросьева Т.В., Козлова М.В., Макович В.Н., Поклонская Н.В., Богуш З.Ф. 171

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ СИНУСОИДАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ У ПАЦИЕНТОВ С КОИНФЕКЦИЕЙ ВИЧ /ВГС
Матиевская Н.В., Цыркунов В.М., Кравчук Р.И., Андреев В.П. 176

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНТАМИНАЦИИ КОРНЕВЫХ КАНАЛОВ ЗУБОВ
Медведева К.В., Манак Т.Н. 182

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И ДИАГНОСТИКИ ПНЕВМОЦИСТНОЙ ПНЕВМОНИИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ
Михед Т.М., Красавцев Е.Л. 188

ОСОБЕННОСТИ ОСЛОЖНЕННОГО ТЕЧЕНИЯ КОКЛЮША У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА
Надрага А.Б., Дыбас И.В. 192

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПЕПТИДОГЛИКАН-РАЗРУШАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ У ЛИЦ С ВНЕГОСПИТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ
Окулич В.К., Земко В.Ю., Кирилюк О.Д. 197

ИММУНОФЕРМЕНТЫ ЦИТИДИНДЕЗАМИНАЗА И АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗА: СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В НОРМЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ
Павлов К.И., Титов Л.П. 200

ВЫЯВЛЕНИЕ ПРОТИВОГЕРПЕСНЫХ АНТИТЕЛ У ДОНОРОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГИПЕРИММУННОЙ ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ПЛАЗМЫ
Пешняк Ж.В., Коржель Т.С., Каленчиц И.А., Сошко С.В., Дашкевич Э.В., Свирновская Э.Л., Хулуп Г.Я. 206

АСТРОЦИТАРНАЯ ГЛИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ И ПРИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ, ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
Полещук Н.Н., Квачева З.Б., Рубаник Л.В., Докукина Т.В. 211

ОСОБЕННОСТИ НАБОРА «НЕЙТРАЛЬНЫХ» ПРОТЕИНАЗ ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
Пыжова Н.С., Никандров В.Н. 216

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА С ПОМОЩЬЮ ТЕСТА АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ (КЛИНИЧЕСКИЙ ПРИМЕР)
Романова И.В., Гончаров А.Е. 224

ВИРУСЫ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА И ДРУГИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ И ВИРУСНЫЕ ПАТОГЕНЫ ПРИ ФОНОВЫХ И ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА
Рубаник Л.В., Полещук Н.Н., Дейкун Д.А., Малиновская Ю.В. 227

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЫЯВЛЕНИЯ *MYCOPLASMA GENITALIUM* В РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА
Руденкова Т.В., Костюк С.А., Шиманская И.Г., Кулага О.К., Руденко Д.Н. 232

ИНФЕКЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ МЕТАТОНЗИЛЛЯРНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ
Рыбак Н.А., Рыбак Р.Ф., Цыркунов В.М. 236

ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА ВИРУСА ПУУМАЛА, ЭКСПРЕССИРОВАННОГО В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ *E.COLI,* РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
Счесленок Е.П., Дубков Н.А., Школина Т.В., Фомина Е.Г., Семижон П.А., Владыко А.С. 239

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АМПЛИКОНОВ, КОДИРУЮЩИХ CH_2 ДОМЕН ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА КЛАССА G И CH_3 ДОМЕН ИММУНОГЛОБУЛИНА КЛАССА M
Устинович Е.В., Фомина Е.Г., Счесленок Е.П., Семижон П.А., Владыко А.С. 244

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК-ГЕНОМА ВИРУСА ЛИМФОЦИТАРНОГО ХОРИОМЕНИНГИТА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
Фомина Е.Г., Винокурова Н.В., Счеслёнок Е.П., Дубков Н.А., Владыко А.С. 247

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА БИОПЛЕНОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО В ПОСТЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПЕРИОД
Харсеева Г.Г., Фролова Я.Н., Герасимов В.Н., Гасретова Т.Д. 253

ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ВИРУС БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА: ОСОБЕННОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ У ЖИВОТНЫХ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ
Хмара М.Е., Гудков В.Г. 257

МУТАЦИОННОЕ ДАВЛЕНИЕ В ОБЛАСТИ ГЕНОМА ПАРВОВИРУСА B19, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ
Хрусталев В.В., Хрусталева Т.А., Ермолович М.А., Барковский Е.В., Самойлович Е.О. 262

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК МОЧЕПОЛОВЫХ ОРГАНОВ У ПАЦИЕНТОВ НА ФОНЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА
Шиманская И.Г., Костюк С.А., Бадыгина Н.А., Полуян О.С., Руденкова Т.В. 268

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ В ПЛЕВРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ПЛЕВРИТАМИ
Янович О.О., Титов Л.П., Дюсьмикеева М.И., Паплевка Т.В. 273

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПАТОГЕНОВ К СРЕДОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ И ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ 278

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА САЛЬМОНЕЛЛЕЗА У ВЗРОСЛЫХ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ДОМИНИРУЮЩИХ СЕРОВАРОВ САЛЬМОНЕЛЛ
Богуцкий М.И., Кузьмич И.А., Гура Е.С. 278

ИЗЫСКАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СВОЙСТВ СРЕДИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ПРОДУКТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В РАЗРАБОТКЕ ПОДХОДОВ К МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ ТЕРАПИИ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
Бореко Е.И. 281

ЧАСТОТА ВЫДЕЛЕНИЯ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ПАТОЛОГИЕЙ ДЫХАТЕЛЬНОГО, УРОГЕНИТАЛЬНОГО И ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА В 2012–2013 гг.
Винничек Л.А., Ермакова Т.С., Титов Л.П., Крамаренко Л.П., Шныр И.В. 289

СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ОТНОШЕНИИ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ТЯЖЕЛЫХ ПНЕВМОНИЯХ В СТАЦИОНАРАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
Ермакова Т.С., Горбунов В.А., Титов Л.П. 295

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ ИЗОЛЯТОВ *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ТИПА *B* И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К В-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ
Носова Е.С., Титов Л.П., Клюйко Н.Л., Левшина Н.Н., Савельева А.К. 300

ТЕСТИРОВАНИЕ КОМБИНАЦИЙ АНТИБИОТИКОВ В ОТНОШЕНИИ СУПЕРРЕЗИСТЕНТНЫХ ИЗОЛЯТОВ ACINETOBACTER BAUMANII С ЦЕЛЬЮ УСТАНОВЛЕНИЯ ИХ АНТИМИКРОБНОЙ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙЭФФЕКТИВНОСТИ
Тапальский Д.В., Мозгова А.В., Козлова А.И., Склеенова Е.Ю. 304

ПРОГРАММА WHONET И МОНИТОРИНГ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *P. AERUGINOSA*
Цыркунов В.М., Кроткова Е.Н., Волосач О.С., Гура Е.С., Лазаревич С.Н. 308

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ОЗЕЛТАМИВИРУ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ В ТЕЧЕНИЕ 2012–2014 гг.
Чешенок Е.В., Грибкова Н.В., Сивец Н.В., Шмелева Н.П. 312

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ 316

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ 319

Подготовлено по заказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь

Научное издание

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Сборник научных трудов

Выпуск 7

Главный редактор: чл.-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. Л.П. Титов
Ответственный редактор: д-р мед. наук, проф. А.С. Владыко
Редакторы: Е.И. Мельникова, Т.А. Аблова

Ответственный за выпуск: О.С. Капранова
Редакторы: Т.Н. Беленова, О.С. Капранова
Корректор: А.В. Алиновская
Компьютерная верстка: С.Л. Абрамович, С.А. Ильин, О.С. Капранова
Обработка иллюстраций: Д.В. Сивуров

Подписано в печать 20.10.2014.
Уч.-изд. л. 39,12
Тираж 105 экз.

Государственное учреждение «Республиканская научная медицинская библиотека»
Зарегистрировано в Государственном реестре издателей, изготовителей
и распространителей печатных изданий Республики Беларусь
в качестве издателя печатных изданий 02.06.2014 за №1/340
ул. Фабрициуса, 28, 220007, г. Минск
Тел./факс +375 (17) 216-23-33
E-mail: med@med.by
http://www.med.by