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

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

# СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

**Сборник научных трудов**

**выпуск 8**

Минск
2015

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

ISSN 2310-0982

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

Редакционная коллегия:

*Т.В. Амвросьева*, д-р мед. наук, проф. (зам. гл. редактора),
*Е.И. Бореко*, д-р мед. наук, доц. (зам. гл. редактора),
*В.А. Горбунов*, канд. мед. наук, доц.,
*В.Ф. Ерёмин*, д-р мед. наук, 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** [Электронный ресурс]: сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2015. — Вып. 8. — 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, 2015.
© Оформление. ГУ «Республиканская научная медицинская библиотека», 2015.

# НАУЧНОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

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

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

Инфекционные заболевания, несмотря на снижение уровня заболеваемости и смертности населения в результате применения средств массовой специфической профилактики, химиотерапии и химопрофилактики, остаются весьма значимой социально-экономической и научной проблемой.

Существующее множество возбудителей инфекционных заболеваний, варьирование их по устойчивости во внешней среде и вирулентности, путям распространения, отличия по спектру хозяев и переносчиков обусловливают богатую мозаику и высокий уровень инфекционной заболеваемости человека в мире, на определенном континенте, в отдельной стране.

С инфекционными и паразитарными болезнями связано 25% всей смертности в мире, а с учетом роли инфекции в патогенезе «неинфекционных» заболеваний — почти 35%. Каждый третий случай и каждый пятый день временной нетрудоспособности по болезни связаны с инфекционной патологией.

Микроорганизмы характеризуются необычайным разнообразием. По мнению международных экспертов, в настоящее время известно не более 5–7% существующих микроорганизмов. С учетом продолжающегося процесса видообразования границы еще непознанного микромира существенно расширяются, меняются представления о его происхождении и эволюции. Очевидно, что по количеству, общей массе, скорости размножения и длительности существования на Земле, бактерии и вирусы абсолютно превосходят человека. Именно поэтому по мере возникновения общества и развития социального образа жизни человека многие инфекции получают широкое распространение [1].

Инфекционные заболевания в настоящее время характеризуются следующими особенностями: наряду с резким снижением или ликвидацией детских инфекций, контролируемых средствами иммунопрофилактики (корь, дифтерия, коклюш, эпидемический паротит, полиомиелит, натуральная оспа), появляются  инфекции, приобретающие черты глобального распространения в виде эпидемий и пандемий (вирусные гепатиты В и С, ВИЧ); возникают новые возбудители (новые варианты вируса гриппа, новые коронавирусы, вирусы геморрагических лихорадок — Ласса, Эбола, Марбург и др.); наблюдается возврат к эпидемическому распространению и более тяжелому течению известных ранее инфекций (туберкулез, дифтерия, грипп и др.). Установлена роль инфекционных агентов в патогенезе заболеваний, которые ранее не считались инфекционными — онкологические, аутоиммунные, аллергические, неврологические, психические и ряд других. Все это существенно расширяет представление об их значимости в формировании патологии человека. Анализ эпидемиологической ситуации свидетельствует, что значение инфекционных агентов в формировании разнообразной патологии человека и летальности, начиная с момента инфицирования в раннем детском возрасте и завершая в старческом периоде онтогенеза, существенно возросла [2].

В 2014 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) две эпидемические ситуации в мире объявлены как чрезвычайные в области общественного здравоохранения, имеющие международное значение — вспышка полиомиелита в 10 странах Азии, Африки и ближнего Востока и эпидемия лихорадки Эбола в странах Западной Африки с впервые зарегистрированными в ее истории выносами в другие страны и континенты. Сохраняется эпидемиологическая напряженность в мире, связанная со вспышками новых инфекционных болезней, вызванных MERS-коронавирусом и второй волной гриппа A(H7N9). Эпидемиологический прогноз ВОЗ первой половины XXI в. неутешителен. В любое время в любом месте планеты могут начаться эпидемия или вспышка, возбудителями которых являются инфекционные патогены: новые, возвратившиеся, переместившиеся на новые территории. Спектр возможных возбудителей болезней у человека постоянно расширяется.

Для современного периода наиболее актуальными проблемами эпидемиологии являются:

- природно-очаговые инфекции — как модель для изучения механизмов циркуляции возбудителей в природных и техногенных экосистемах и их эпидемического проявления;

- появление новых и возврат «старых» инфекционных заболеваний, что связано с изменением условий жизни общества, экологии и климата, переносом возбудителей в другие регионы, обусловленным интенсификацией миграции населения, туризма, перевозкой животных и продуктов животного происхождения, недооценкой необходимости осуществления постоянного мониторинга за этими инфекциями;

- контролируемые инфекции, требующие обязательного мониторинга молекулярно-генетических характеристик возбудителей заболеваний, против которых проводится иммунизация, а также мониторинг иммунитета населения к управляемым инфекциям;

- разработка средств и методов индикации агентов биотерроризма, позволяющих проводить ускоренное их выявление, а также моделировать вероятные свойства потенциальных агентов биотерроризма для проведения противоэпидемических мероприятий в максимально короткие сроки с наименьшим ущербом для здоровья населения;

- инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, вызываемые условно-патогенными микроорганизмами, и нарастающая устойчивость возбудителей инфекции к противомикробным лекарственным средствам и дезинфектантам, для борьбы с которыми необходим молекулярно-генетический мониторинг, целью которого являются получение данных о структуре популяций госпитальных штаммов и расшифровка механизмов появления, формирования и циркуляции эпидемических штаммов в стационарах;

- биоразнообразие возбудителей инфекционных заболеваний, что определяет трудности в идентификации и выявления возбудителя и источника инфекции;

- смешанные инфекции — как модель сложности диагностики, лечения и эпидемиологии инфекций, одновременно вызываемых возбудителями различных видов — для диагностики которых необходимо использование разнообразных микробиологических, молекулярно-генетических и биологических методов для получения доказательств этиологической значимости выделяемых культур микроорганизмов;

- получение доказательств инфекционной природы ряда заболеваний с неустановленной этиологией (язвенная болезнь желудка, сердечно-сосудистые заболевания, опухоли, саркоидоз и др.) [3, 4].

Развитие эпидемиологической ситуации по инфекционным заболеваниям в нашей стране неразрывно связано с мировыми тенденциями по этой проблеме. При этом в Республике Беларусь на протяжении последних лет отмечается стабильная ситуация по данной группе заболеваний. В стране достигнуто и сохраняется эпидемиологическое благополучие по инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики, в т. ч. по полиомиелиту, кори, краснухе, эпидемическому паротиту, дифтерии, коклюшу, столбняку; удалось добиться значительного снижения заболеваемости вирусным гепатитом В; продолжается работа по совершенствованию национального календаря профилактических прививок и верификации элиминации кори и краснухи [5].

Вместе с тем отмечается нарастание значимости острых кишечных инфекций вирусной этиологии. Регулярно регистрируются вспышки норо- и энтеровирусной инфекции. В структуре острых кишечных инфекций доля гастроэнтероколитов вирусной этиологии является преобладающей. Остается нестабильной ситуация по клещевым инфекциям, наблюдается рост заболеваемости клещевым энцефалитом и болезнью Лайма, существует высокий риск возникновения смешанных инфекций. Заболеваемость хроническими гепатитами имеет тенденцию к росту. Постоянных усилий требует контроль гриппозной инфекции, обусловленный возникновением новых возбудителей — вируса гриппа птиц A(H7N9), выявленного в Китае, нового коронавируса — возбудителя ближневосточного респираторного синдрома. Ежегодно регистрируются спорадические случаи вакциноуправляемых инфекций (корь, краснуха, эпидемический паротит), связанные с миграцией населения и ввиду этого требующие проведения дифференциации на местные и завозные случаи [5–9].

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» (далее — Центр) выполняет широкий спектр научно-исследовательских работ фундаментального и прикладного характера в области эпидемиологии, медицинской вирусологии, микробиологии, иммунологии и паразитологии. Специалистами Центра осуществляется разработка и совершенствование системы эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями [10].

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 [10–12].

На базе Центра успешно функционирует ряд национальных референс-центров и референс-лабораторий (Национальный центр по гриппу, Национальный референс-центр по полиомиелиту, Региональная референс-лаборатория по ротавирусам ЕРБ ВОЗ (для Армении, Азербайджана, Грузии, Республики Молдовы, Таджикистана, Украины), республиканская референс-лаборатория по кори и краснухе, республинаский референс-центр мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов, республиканская референс-лаборатория по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний, республиканская референс-лаборатория генодиагностики ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов В и С, республиканская референс-лаборатория по диагностике кишечных вирусных инфекций и санитарной вирусологии, республиканский референс-центр по диагностике особо опасных, природно-очаговых и вновь возникающих инфекций).

Референс-лаборатории осуществляют научно-методическое руководство выполнения на территории Беларуси программ эпидемиологического надзора за соответствующими инфекциями, являются национальными корреспондентами ВОЗ, работают в тесном сотрудничестве с региональными центрами ВОЗ (обмен информацией, биологическими материалами, стажировки аспирантов, подготовка совместных документов и т. д.). В своей деятельности национальные референс-центры подотчетны Министерству здравоохранения Республики Беларусь и Европейскому региональному бюро (ЕРБ) ВОЗ и предоставляют в установленном порядке отчеты о результатах исследований, обзоры по эпидситуации, заключения о выполнении программ эпидемиологического надзора в республике и др. [13–23]

Референс-лаборатории координируют деятельность организаций здравоохранения по реализации взятых на себя Республикой Беларусь международных обязательств в рамках соответствующих глобальных и региональных программ [10–15].

В результате научно-исследовательских работ предыдущего периода были определены основные наиболее значимые для нашей страны инфекции, налажена система их мониторинга. Разработаны и внедрены в практику новые технологии, обеспечивающие современный уровень работы в области контроля инфекционных заболеваний, созданы новые средства диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний [10–12, 14–31].

Выполняя подпрограмму «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» 2011–2015 гг., расширен спектр инфекций, подлежащих постоянному контролю (ОРВИ и грипп, гепатиты, ВИЧ, полиомиелит, корь, краснуха, природно-очаговые инфекции, энтеровирусные инфекции). Введены методы молекулярной биологии, позволяющие дать исчерпывающую характеристику возбудителя [16–22, 26–37]. Проведены исследования с целью установления роли инфекционных агентов в патогенезе заболеваний, которые ранее не считались инфекционными [38–40].

Разработаны молекулярно-биологические методы детекции и средства диагностики вирусных и бактериальных инфекций на основе полимеразной цепной реакции, что позволило внедрить новые технологии мониторинга вирусных и бактериальных инфекций [16, 17, 19, 21, 22, 26–28].

Использование современных генно-инженерных технологий позволило разработать отечественные диагностические тест-системы, создать компоненты тест-систем (кишечные, природно-очаговые, особо опасные инфекции). Разработаны технологии создания тест-системы для диагностики персистентных форм хламидийной инфекции на основе функционализированных наночастиц, биосовместимых тонкопленочных антибактериальных покрытий с программируемым высвобождением наночастиц, диагностики паразитарных инвазий с использованием нанотехнологий (метод ДНК-комет), клеточной терапии онкозаболеваний и туберкулеза аутологичными дендритными клетками и др. [41, 42].

В Центре в рамках государственных научно-технических программ разработано и зарегистрировано 147 наименований изделий медицинского назначения (ИМН) для диагностики инфекционных и паразитарных болезней, из которых около 54% входят в годовую заявку ИМН, закупаемых в рамках централизованного конкурса. За последние 5 лет в Центре разработано и внедрено в практическое здравоохранение 59 новых методов диагностики и профилактики инфекционных заболеваний.

В результате выполнения плана освоения и внедрения научно-технической продукции, созданной на основе современных технологий (методы биотехнологий, генной инженерии), обеспечены потребности организаций здравоохранения республики в отечественных диагностических препаратах в среднем до 70%, а по некоторым позициям — до 100%, и, соответственно, валютосбережение и импортозамещение аналогичных видов продукции.

Основные потребители продукции, разработанной в центре, — организации здравоохранения Республики Беларусь. Ряд инновационных разработок уникальны, имеют мировую новизну, будут производиться только в нашей стране и имеют спрос в других странах. С учетом имеющегося экспортного потенциала на новые разработки созданное производство позволит увеличить выпуск продукции для зарубежных стран.

Полученные результаты подпрограммы «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» 2011–2015 гг. закладывают научные, технологические, методологические основы для дальнейшей работы, направленной на предупреждение возникновения и распространения инфекционных заболеваний и укрепление национальной биологической безопасности Республики Беларусь.

Результаты научных исследований, выполненных в рамках запланированных НИР, оформлены в виде научно-технической продукции, которая утверждена и внедрена в практическую, научную или образовательную деятельность, что считается одним из основных критериев, характеризующих эффективность научной работы [10–12, 32–37].

В соответствии с рекомендациями ВОЗ сегодня развитие здравоохранения во многих странах включает, прежде всего, необходимость совершенствования высокотехнологичных методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации. Для решения проблем биобезопасности страны необходимо эффективное функционирование национальной системы мониторинга и прогноза развития эпидемического процесса социально значимых и опасных инфекционных заболеваний, включая экзотические [10–14, 43–47].

Обязательным и важным направлением деятельности Центра в этом плане является участие в противоэпидемических мероприятиях, направленных на предупреждение завоза и дальнейшего распространения в нашей стране различных особо опасных инфекций.

В 2014–2015 гг. основные усилия по данному направлению были сосредоточены на предупреждении завоза лихорадки Эбола, эпидемия которой возникла сначала в странах Западной Африки, затем распространилась на другие регионы этого континента и была завезена в ряд стран Европы и США.

Центр осуществлял большую информационно-аналитическую работу по оценке развития эпидситуации по данной инфекции, вырабатывал научные и практические рекомендации, которые были использованы для создания комплексной системы предупредительных и профилактических мероприятий по защите населения и территории страны от лихорадки Эбола.

Центр, располагая специальными лабораториями максимальной безопасности, соответствующими международным стандартам уровня Р3–Р4, постоянно проводит различные научные исследования на наиболее потенциально опасных возбудителях, разрабатывает препараты и технологии для индикации и идентификации этих возбудителей, а также средства химиотерапии и химиопрофилактики, вызываемых ими заболеваний [43–47].

Именно эти отечественные препараты, изготовленные на основе современных молекулярно-биологических методах детекции, были успешно использованы при диагностических исследованиях проб биологического материала, полученного от пациентов — иностранных граждан, прибывших из стран Западной Африки и госпитализированных с подозрением лихорадки Эбола.

Мероприятия по повышению уровня биобезопасности страны должны постоянно совершенствоваться, и многие изучаемые вопросы прошлого периода остаются актуальными, но на основании накопленных знаний требуют новых подходов в их решении. Исходя из современной эпидемиологической ситуации, с целью обеспечения биологической безопасности государства является актуальным пересмотр и расширение спектра инфекций, подлежащих постоянному мониторингу и контролю (бактериальные инвазивные заболевания, природно-очаговые и особо опасные инфекции, вирусные кишечные инфекции). С этой целью в ближайший период в Центре будут разработаны инновации с использованием новых передовых технологий — генодиагностика, геномика, протеомика, рекомбинантные технологии и нанотехнологии, основанные на последних достижениях молекулярной биологии в области клеточных биотехнологий и включающие:

- новые поколения отечественных иммунобиологических диагностических средств для более полного обеспечения потребностей практического здравоохранения;

- методики идентификации и генотипирования возбудителей инфекции, в т. ч. позволяющие сократить сроки верификации диагноза;

- алгоритмы мониторинга циркуляции возбудителей инфекций, включающего изучение генетических характеристик возбудителей и способствующего своевременной организации санитарно-противоэпидемических мероприятий;

- технологии производства реагентов с целью обеспечения импортозамещения зарубежных аналогов;

- методики выявления маркеров устойчивости возбудителей инфекции к противомикробным средствам, обеспечивающие рациональную терапию и улучшение качества лечения пациентов;

- алгоритмы контроля качества отечественных иммунобиологических лекарственных средств, способствующие их выходу на международный рынок.

Все планируемые в Центре научно-исследовательские работы будут соответствовать V–VI технологическим укладам (использование биотехнологий, методов генной инженерии и нанобиотехнологий), что обеспечит высокий уровень создаваемой научно-технической продукции и эффективную ее реализацию в рамках инновационной деятельности. Предлагаемые к разработке технологии будут отличаться новизной, конкурентоспособностью, соответствовать по своим характеристикам международным стандартам, не наносить вреда окружающей природной среде, здоровью и генетическому фонду человека.

Достижения генетики, молекулярной биологии, развитие метагеномных и протеомных технологий открывают перспективы принципиального изменения качества этиологической диагностики инфекций.

**Литература**

1. Брико, Н.И. Парадигма современной эпидемиологии / Н.И. Брико // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2013. — № 6. — С. 4–11.

2. Брико, Н.И. Глобализация и эпидемический процесс / Н.И. Брико, В.И. Покровский // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2010. — № 4. — С. 4–10.

3. Жебрун, А.Б. Молекулярная, геномная, метагеномная эпидемиология: перспективы / А.Б. Жебрун // Инфекция и иммунитет. — 2013. — № 3. — С. 105–106.

4. Лобзин, Ю.В. Учение об инфекционных болезнях: прошлое, настоящее, будущее / Ю.В. Лобзин // Журн. инфектологии. — 2013. — Т. 5, № 3, прилож. — С. 9–25.

5. Государственный санитарный надзор в области общей инфекционной и паразитарной заболеваемости // Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Беларусь в 2014 году» / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. — Минск, 2015. — Раздел. III. — С. 16–54.

6. Рост заболеваемости населения клещевыми инфекциями в условиях техногенного загрязнения окружающей среды / Т.И. Самойлова [и др.] // Мед.-биол. проблемы жизнедеятельности. — 2015. — № 2. — С. 79–85.

7. Оценка видового состава, численности и степени зараженности иксодовых клещей спирохетами комплекса *Borrelia burgdorferi s. l* на урбанизированных территориях Минской области / О.Р. Князева [и др.] // Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. — 2014. — № 1. — С. 111–114.

8. Анализ эпидемических сезонов по гриппу в Республике Беларусь в постпандемический период / Н.В. Грибкова [и др.] // Здравоохранение. — 2015. — № 2. — С. 10–13.

9. Грибкова, Н.В. Ретроспективная оценка профилактики гриппа вакциной «Флюваксин» в постпандемические сезоны 2010–2013 годов / Н.В. Грибкова, Н.П. Шмелева // Мед. новости. — 2014. — № 10. — С. 50–52.

10. Деятельность РНПЦ эпидемиологии и микробиологии по борьбе с инфекционными заболеваниями в Республике Беларусь / В.А. Горбунов [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2013. – Вып. 6. — С. 3–7.

11. Современные аспекты инфекционной патологии человека и обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Республики Беларусь / В.А. Горбунов [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2014. — Вып. 7. — С. 3–8.

12. Титов, Л.П. Республиканскому научно-практическому центру эпидемиологии и микробиологии — 90 лет (1924–2014) / Л.П. Титов, В.А. Горбунов // Здравоохранение. — 2014. — № 10. — С. 4–8.

13. Start of the 2014/15 influenza season in Europe: drifted influenza A(H3N2) viruses circulate as dominant subtype / E. Broberg [et al.] / WHO European Region and the European Influenza Surveillance Network // Euro Surveill. — 2015. — Vol. 20, № 4. — pii: 21023.

14. Самойлович, Е.О. Надзор за вакциноуправляемыми инфекциями в Республике Беларусь: соответствие международным стандартам / Е.О. Самойлович // Здравоохранение. — 2014. — № 6. — С. 7–12.

15. Самойлович, Е.О. Надзор за корью в Республике Беларусь : подготовка к верификации элиминации инфекции / Е.О. Самойлович // Мед. журн. — 2014. — № 2. — С. 94–99.

16. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг эпидемического паротита в Республике Беларусь / В.П. Шиманович [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2014. — Вып. 7. — С. 107–114

17. Молекулярно-эпидемиологический анализ неполиомиелитных энтеровирусов, доминирующих в Беларуси в 2012–2013 гг. / Н.В. Поклонская [и др.] // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2014. — № 4. — С. 58–64.

18. Вирусное загрязнение водных объектов возбудителями социально значимых вирусных инфекций / Т.В. Амвросьева [и др.] // Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. — Минск: РНМБ, 2014. —Т. 1, вып. 24. — С. 3–7.

19. Научно-экспериментальное обоснование и разработка алгоритма санитарно-вирусологического контроля объектов среды обитания человека / Т.В. Амвросьева [и др.] // Достижения медицинской науки Беларуси: рец. науч.-практ. ежегодник. — Минск: ГУ РНМБ, 2014. — Вып. 19. — С. 36.

20. Энтеровирусные инфекции в Республике Беларусь / Т.В. Амросьева [и др.] // Эпидемиол. инфекц. болезни. — 2014. — Т. 19, № 5. — С. 37–43.

21. Групповая заболеваемость норовирусными гастроэнтеритами в Республике Беларусь и молекулярная эпидемиология возбудителей / Н.В. Поклонская, Т.В. Амвросьева, К.Л. Дедюля // Мед. новости. — 2013. — № 12. — С. 78–81.

22. Rotavirus genotypes in Belarus, 2008–2012 / G.V. Semeiko [et al.] // Infect. Genet. Evol. — 2014. — Vol. 28. — P. 480–485.

23. Viral gastroenteritis in rotavirus negative hospitalized children <5 years of age from the independent states of the former Soviet Union / P. Chhabra, E. Samoilovich, M. Yermalovich [et al.] // Infect. Genet. Evol. — 2014. — Vol. 28. — P. 283–288.

24. Титов, Л.П. Анализ международного опыта оценки деятельности ученых, учреждений науки, приоритетности научных направлений / Л.П. Титов, В.А. Филонюк, В.А. Горбунов // Мед. новости. — 2014. — № 1. — С. 21–29.

25. Характеристика эпидемического процесса вирусного гепатита А / В.Г. Гудков [и др.] // Здравоохранение. — 2014. — № 10. — С. 49–53.

26. Полякова, Н.В. Генотипический пейзаж ротавирусов — этиологических агентов острых гастроэнтеритов у детей в г. Минске в 2012–2013 гг. / Н.В. Полякова, Г.В. Семейко, Е.О. Самойлович // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. — Минск, 2014. — Т. 7. — С. 19–27.

27. Генотипирование ротавирусов с использованием мультиплексной ПЦР: возможности, проблемы, пути их решения / Г.В. Семейко [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2013. — Вып. 6. — С. 92–96.

28. Лебедев, Ф.А. ПЦР-определение серогрупп *Neisseria meningitidis*, выделенных в Беларуси в 2011–2013 гг. / Ф.А. Лебедев, Л.П. Титов // Достижения медицинской науки Беларуси: рец. науч.-практ. ежегодник. — Минск: ГУ РНМБ, 2013. — Вып. 17. — С. 62–63.

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

30. Скрипова, Л.В. Лабораторная диагностика кишечных паразитарных заболеваний / Л.В. Скрипова // Здравоохранение. — 2013. — № 12. — С. 62–64.

31. Изучение устойчивости-чувствительности Mycoplasma genitalium к антибактериальным препаратам / Т.В. Руденкова [и др.] // Мед. журн. — 2013. — № 4. — С. 92–95.

32. Вирусы, вызывающие кишечные инфекции. Этиология и лабораторная диагностика вирусных гастроэнтеритов: учеб. пособие / Е.С. Носова [и др.]. — Минск: БГМУ, 2014. — 121 с.

33. ВИЧ-инфекция (диагностика, эпидемический процесс в Республике Беларусь): учеб.-метод. пособие / Н.Д. Коломиец [и др.]. — Минск: БелМАО, 2013. — 45 с.

34. Генетическая инженерия. Применение в химии и биологии: учеб. пособие (курс лекций) / И.А. Толмачева [и др.]; Перм. гос. ун-т. — Пермь, 2013. — 98 с.

35. Легионеллез (этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение, профилактика): учеб.-метод. пособие / Н.Д. Коломиец [и др.]. — Минск: БелМАПО, 2014. — 31 с.

36. Парвовирусная В19 инфекция: эпидемиология, клиника, лабораторная диагностика, лечение: учеб.-метод. пособие / Н.В. Климович [и др.]. — Минск: БелМАПО, 2014. — 35 с.

37. Клиническая, эпидемиологическая и санитарная микробиология: практикум для мед.-проф. ф-та / Т.А. Канашкова [и др.]. — 7-е изд. — Минск: БГМУ, 2014. — 63 с.

38. Вирусные инфекции у пациентов с дилатационной кардиомиопатией / Т.В. Амвросьева [и др.] // Мед. журн. — 2013. — № 2. — С. 39–41.

39. Данилов, Д.Е. Вирусный гепатит «С» у пациентов с гемофилией / Д.Е. Данилов, В.Ф. Еремин, И.А. Карпов // Мед. журн. — 2013. — № 2. — С. 79–81.

40. Клиническая характеристика суставного синдрома у пациентов с парвовирусной В19 инфекцией / Н.В. Климович [и др.] // ARS medica. — 2013. — № 1. — С. 41–48.

41. Характеристика дендритных клеток для иммунотерапии рака поджелудочной железы / А.Е. Гончаров [и др.] // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2014. — № 2. — С. 4–12.

42. Метод иммунотерапии пациентов, страдающих туберкулезом легких со множественной устойчивостью, с использованием аутологичных дендритных клеток / Л.П. Титов [и др.] // Достижения медицинской науки Беларуси: рец. науч.-практ. ежегодник. — Минск: ГУ РНМБ, 2013. — Вып. 17. — С. 56–57.

43. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка / М.И. Буаро [и др.] // Мед. новости. — 2012. - № 12. — С. 15–19.

44. Спорадические случаи геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Минске / Е.П. Счесленок [и др.] // Здравоохранение. — 2014. — № 1. — С. 56–61.

45. Особенности разработки и использования иммунобиологических диагностических тестов, основанных на методе иммуноферментного анализа, на примере особо опасных вирусных геморрагических лихорадок Ласса, Марбург и Эбола / А.С. Владыко [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2013. — Вып. 6. — С. 129–134.

46. Лихорадка Эбола: клинические проявления, особенности работы с пациентами / А.С. Владыко [и др.] // Мед. знания. — 2014. — № 6. — С. 3–5.

47. Разработка комплексных диагностических лекарственных средств для опасной природно-очаговой группы вирусных инфекций / П.А. Семижон [и др.] // Достижения медицинской науки Беларуси: рец. науч.-практ. ежегодник. — Минск: ГУ РНМБ, 2013. — Вып. 17. — С. 66–67.

Поступила 16.10.2015

# АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ КИШЕЧНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ЭТИОЛОГИЯ, ОСОБЕННОСТИ ЭПИДПРОЦЕССА, МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДОМИНИРУЮЩИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

*Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Богуш З.Ф., Лозюк С.К.*

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

**Реферат.** В статье представлены результаты лабораторного контроля за вирусными кишечными инфекциями в Республике Беларусь за последние 5–7 лет, включая этиологическую структуру и молекулярно-эпидемиологические характеристики доминирующих возбудителей в условиях эндемичной и групповой заболеваемости. Полученные данные указывают на необходимость регулярного молекулярно-эпидемического мониторинга за циркулирующими кишечными вирусными патогенами с целью своевременного выявления их новых серо-, генотипов и геновариантов для прогнозирования возможных сценариев развития эпидситуации.

**Ключевые слова:** кишечные вирусы, заболеваемость, эпидемиология.

**Введение.** Несмотря на значительные успехи в современной инфектологии еще остаются проблемы, имеющие серьезное социально-экономическое значение для всех стран мира. К их числу относятся острые кишечные инфекции (ОКИ). По последним данным среди детей до 5 лет ежегодно регистрируется около 1,7 млрд случаев ОКИ, в т. ч. 36 млн с тяжелым течением, около 700 тыс. детей погибают [1, 2]. Эта группа инфекционной патологии объединена общим фекально-оральным механизмом передачи возбудителей, главной мишенью которых является кишечник. Среди большого разнообразия известных возбудителей ОКИ доминируют вирусные агенты. По современным представлениям наибольшую эпидемическую значимость имеют рота-, норо-, сапо-, кишечные адено-, астро- и энтеровирусы. В основной своей массе вызываемые ими вирусные ОКИ (кроме ротавирусных) являются вакцинонеуправляемыми, что обусловливает особую актуальность и профилактическую значимость регулярного эпиднадзора за данной многочисленной группой инфекций.

Лабораторный контроль как важная составляющая такого надзора за вирусными ОКИ с применением самых современных методов и технологий, включая молекулярно-эпидемиологические исследования, систематически проводится в нашей стране, как на уровне человеческой популяции, так и эпидемически значимых объектов окружающей среды (воды и пищевых продуктов). По результатам этих исследований в течение 2009–2014 гг. на территории Республики Беларусь циркулировал весь спектр известных возбудителей вирусных ОКИ, постоянно регистрируемых в странах ближнего и дальнего зарубежья (рисунок 1). В целом по стране среди них преобладали ротавирусы (28%) и норовирусы I и II геногрупп (26,3%). Наиболее редко регистрировались астровирусы (2,6%). В разрезе административных областей наблюдалась аналогичная ситуация. Существенных различий в этиологической структуре вирусных ОКИ, регистрируемых у детей и взрослых за последние 6 лет, не наблюдалось (рисунки 2, 3). Хотя доминирующими возбудителями у детей были ротавирусы (29,2%) и норовирусы 1 и 2 генотипов (26,2%). У взрослых наиболее часто регистрировались норовирусы 2 генотипа (16,2%), следующими в рейтинге этиологических агентов оказались энтеро- и ротавирусы (по 13,5%).

Если говорить о сезонности в доминировании различных типов кишечных вирусов, то по результатам более 3 тыс. диагностических исследований норо-, рота- и астровирусы более часто выступали в качестве этиологических агентов вирусных ОКИ в зимнее время, в то время как кишечные аденовирусы детектировались в течение года практически на одном уровне (18–20%).

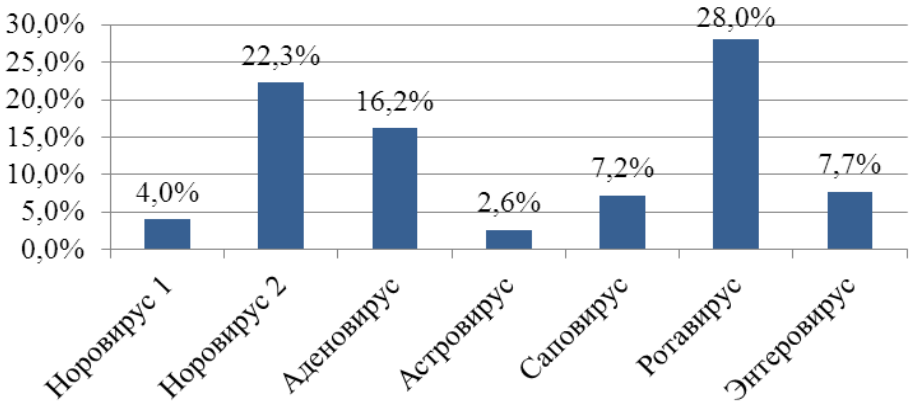



**Рисунок 1. — Спектр возбудителей ОКИ, циркулировавших на территории Республики Беларусь в 2009–2014 гг.**

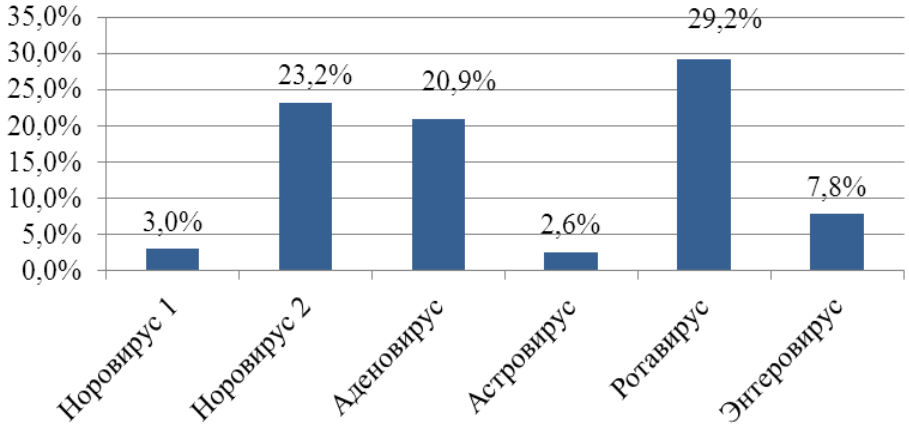



**Рисунок 2. — Этиологическая структура вирусных ОКИ у детей (2009–2014 гг.)**

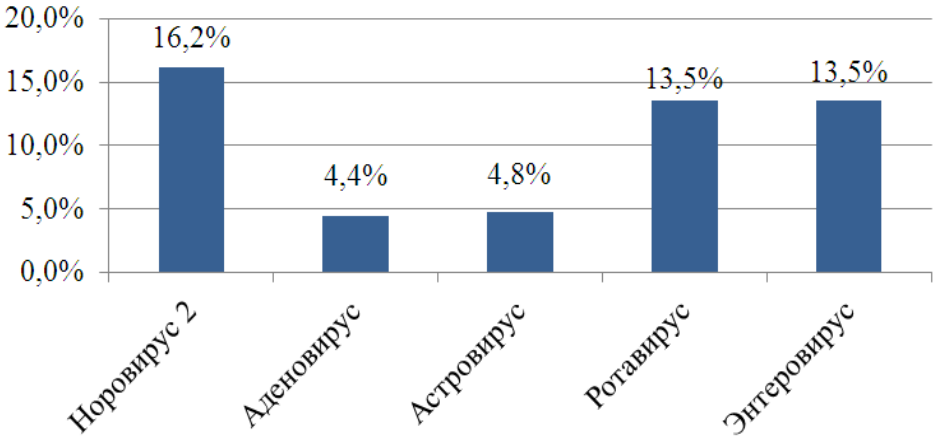



**Рисунок 3. — Этиологическая структура вирусных ОКИ у взрослых (2009–2014 гг.)**

Как известно, характерной особенностью ОКИ является возможность развития эпидпроцесса по типу групповой и вспышечной заболеваемости. На протяжении последних 6 лет (2009–2014 гг.) на территории Минского и Брестского регионов зарегистрировано 15 эпизодов такой заболеваемости в закрытых коллективах, в результате которой по официальным данным заболело более 200 чело-

век. Этиологические агенты групповой заболеваемости принадлежали к 4 родам вирусов: *Norovirus*, *Rotavirus A*, *Sapovirus*, *Enterovirus* (таблица). Какой-либо сезонности в ее регистрации не прослеживалось. Основным клиническим диагнозом был острый гастроэнтерит (ОГЭ). Возрастной состав пациентов характеризовался большим разнообразием — от 4 до 86 лет. По результатам диагностических исследований с применением тест-системы ОКИ-скрин (производства «Амплисенс», РФ), направленной на детекцию не только вирусных, но и актуальных бактериальных возбудителей, в этиологической структуре групповой заболеваемости доминировала норовирусная инфекция — 66,7% (рисунок 4). Саповирусная инфекция была диагностирована у 13,3% пациентов. Среди другой заболеваемости с одинаковой частотой зарегистрированы инфекции, вызванные энтеро-, ротавирусами и сальмонеллой (по 6,7%). При этом почти треть заболевших имели смешанную инфекцию.

Таблица — Групповая заболеваемость вирусными ОКИ в 2009–2014 гг.

| Дата (месяц, год) | Регион | Клинический диагноз | Кол-во обследованных | Возраст, годы | Этиологический(е) агент(ы) | Доля этиологического подтверждения, % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Май, 2009 | г. Минск | ОГЭ | 8 | 18–20 | Саповирус | 75 |
| Февраль, 2010 | Минская обл. | ОГЭ | 10 | 18–20 | Саповирус<br>Норовирус II<br>Энтеровирус | 60<br>10<br>30 |
| Март, 2010 | г. Минск | ОГЭ | 8 | 45–86 | Норовирус II | 87,5 |
| Май, 2010 | г. Минск | ОГЭ | 15 | 16–17 | Норовирус II | 86,6 |
| Февраль, 2011 | г. Минск | ОГЭ | 5 | 18–25 | Норовирус II<br>Энтеровирус | 80,0<br>40,0 |
| Январь, 2012 | г. Ляховичи | ОГЭ | 11 | 11–18 | Норовирус II | 81,8 |
| Май, 2012 | г. Лунинец | ПТИ | 5 | 7–8 | Норовирус II | 100 |
| Июль, 2012 | г. Борисов | ОГЭ | 6 | 7–12 | Энтеровирус | 100 |
| Июль, 2012 | г. Мядель | ОГЭ | 5 | 9–15 | Норовирус I | 80 |
| Июль, 2012 | г. Минск | ОГЭ | 6 | 18–20 | Норовирус II | 33,3 |
| Октябрь, 2012 | г. Лунинец | ОГЭ | 3 | 16–17 | Норовирус II | 66,6 |
| Июль, 2013 | Минский р-н | ОГЭ | 7 | 6–13 | Норовирус II<br>Энтеровирус | 85,7<br>14,3 |
| Август, 2013 | Минский р-н | ОГЭ | 6 | 18–20 | *Salmonella spp.* | 83,3 |
| Октябрь, 2013 | Минский р-н | ОГЭ | 6 | 18–20 | Ротавирус А | 83,3 |
| Январь, 2014 | Минский р-н | ОГЭ | 2 | ОГЭ | Норовирус II | 100 |

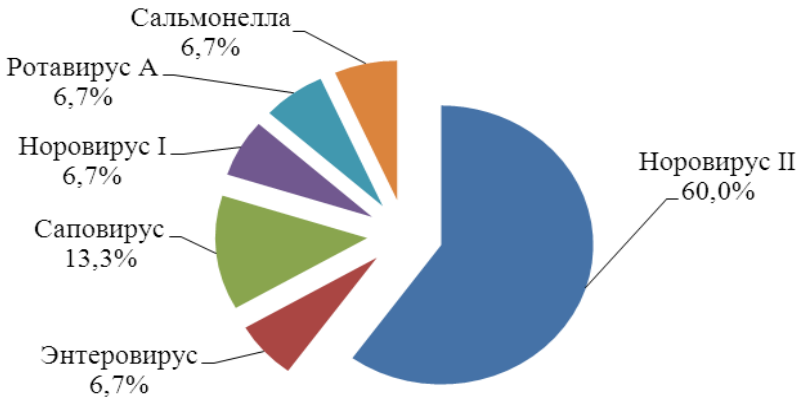



**Рисунок 4. — Этиологическая структура групповой заболеваемости ОКИ**

Учитывая доминирующее положение норовирусной инфекции в этиологической структуре ОКИ на протяжении последних лет, особый интерес вызывают полученные нами данные молекулярно-эпидемиологических исследований, направленных на идентификацию циркулирующих генотипов ее возбудителей и анализ их перемещений во времени и пространстве. По результатам молекулярного типирования в 2009–2015 гг. в нашей стране идентифицировано 6 генотипов и 4 глобальных эпидемических геновариантa норовирусов. Ведущую роль на протяжении всего периода наблюдения занимал преобладающий в настоящее время в мировом масштабе генотип GII.4 [3]. Он вызвал наибольшее количество случаев спорадической заболеваемости, а также чаще всего ассоциировался с развитием групповой заболеваемости. Высокая генетическая изменчивость норовирусов и активная циркуляция данного генотипа приводят к постоянному возникновению в его составе новых геновариантов, которые характеризуются глобальным распространением и сменяют друг друга на протяжении времени так же, как это было ранее установлено для вирусов гриппа. За весь период наблюдения нами была зарегистрирована циркуляция следующих эпидемических геновариантов генотипа GII.4: GII.4 2006b — 2009–2010 гг. (пик циркуляции — 2009 г.), GII.4 2009 New Orleans — 2010–2012 гг. (пик циркуляции — 2011 г.), GII.4 2012 Sydney-New Orleans и GII.4 2012 Sydney-Pe — 2015 г. В 2013–2014 гг. циркуляция генотипа GII.4 не регистрировалась. В этот период были генотипированы только норовирусные агенты групповой заболеваемости, принадлежавшие к генотипам GII.g-GII.1 и GII.2. Следует отметить, что наибольшее генетическое разнообразие циркулирующих норовирусов наблюдалось в период наиболее низкой активности доминирующего генотипа GII.4 в 2012 г.: в это время наблюдалась циркуляция 4 различных генотипов: GII.4 2009 New Orleans, GII.g-GII.1, GII.6 и GII.3. Наиболее часто зарегистрированная за период наблюдения групповая заболеваемость, кроме генотипа GII.4, была вызвана генотипами GII.g-GII.1 и GII.2, тогда как среди доминировавших в различное время этиологических агентов спорадической заболеваемости, кроме вышеупомянутого генотипа GII.4, довольно часто встречались генотипы GII.6 и GII.g-GII.12.

**Заключение.** Таким образом, молекулярно-эпидемиологический анализ норовирусов, циркулировавших в последние 7 лет в нашей стране и за рубежом, свидетельствовал об их глобальном распространении. При этом массовое появление нового генотипа в Беларуси происходило практически одновременно с его появлением и/или активизацией в других странах. В 2015 г. впервые у нас в стране зарегистрирована циркуляция доминирующих в мировом масштабе, начиная с 2013 г., эпидемических геновариантов GII.4 2012 Sydney-New Orleans и GII.4 2012 Sydney-Pe. Полученные на текущий момент данные не позволяют говорить о преобладании какого-либо одного из этих геновариантов, т. к. доля пациентов, у которых они были идентифицированы, приблизительно одинакова.

Представленные результаты лабораторного контроля за эпидемически значимыми кишечными вирусными инфекциями в нашей стране указывают на необходимость осуществления регулярного молекулярно-эпидемического мониторинга за циркулирующими возбудителями с целью своевременного выявления новых для данной территории серо-, генотипов и геновариантов с последующей оценкой их эпидемического потенциала и своевременного прогнозирования возможных сценариев развития эпидситуации.

**Литература**

1.Global burden of childhood pneumonia and diarrhea / C.L.F. Walker [et al.] // Lancet. — 2013. — Vol. 381. — P. 1405–1416.

2. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000 / L. Liu [et al.] // Lancet. — 2012. — Vol. 379. — P. 2151–2161.

3.Noroviruses: epidemiology, immunity and prospects for prevention / K. Pringle [et al.] // Future Microbiol. — 2015. — Vol. 10, № 1. — P. 53–67.

## CURRENT ISSUES OF ENTERIC VIRAL INFECTION IN BELARUS: ETIOLOGY, EPIDEMIOLOGICAL FUTURES, MOLECULAR EPIDEMIOLOGI OF PREDOMINANT AGENTS

*Amvrosieva T.V., Paklonskaya N.V., Bogush Z.F., Lozuk C.K.*

*State Institution "Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

The article summarizes the results of laboratory control of viral enteric infection in Belarus for the last seven years: etiology of sporadic cases and outbreaks, molecular epidemiology of predominant enteric viruses. Obtained data indicates an importance of molecular surveillance to operatively detect emerging types of viruses and prognose probable changes in epidemic process.

**Keywords:** enteric viruses, disease, epidemiology.

Поступила 28.08.2015

## РЕГИОНАЛЬНОЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ МНОГООБРАЗИЕ РОТАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2014 г.

*Полякова Н.В.[1], Семейко Г.В.[2], Самойлович Е.О.[2], Клюйко Н.Л.[3], Ляховская Н.В.[4], Борисевич С.И.[5], Кузмич И.А.[6], Думова С.А.[7], Лосева Е.М[8]*

*[1]Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;*

*[2]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь;*

*[3]Учреждение здравоохранения «Городская детская инфекционная клиническая больница», Минск, Республика Беларусь;*

*[4]Учреждение здравоохранения «Витебская областная клиническая инфекционная больница», Витебск, Республика Беларусь;*

*[5]Государственное учреждение «Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Брест, Республика Беларусь;*

*[6]Учреждение здравоохранения «Гродненская областная клиническая инфекционная больница», Гродно, Республика Беларусь;*

*[7]Государственное учреждение «Гомельсикй областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Гомель, Республика Беларусь;*

*[8]Учреждение здравоохранения «Могилевский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Могилев, Республика Беларусь*

**Реферат.** Генотипирование 289 ротавирусов, обнаруженных в пробах стула детей с острым гастроэнтеритом из г. Минска и пяти областей Республики Беларусь (Брестской, Витебской, Гомельской, Гродненской и Могилевской), показало, что в 2014 г. в стране циркулировало восемь генотипов ротавирусов: G4P[8], G1P[8], G3P[8], G2P[4], G2P[8], G9P[8], G3P[9], G12P[8]. В одной из проб была обнаружена смесь G2P[4+8]. Наибольшее генотипическое разнообразие ротавирусов было зарегистрировано в г. Минске и Могилевской области, наименьшее — в Витебской области. Наиболее распространенными и обнаруженными во всех регионах страны были генотипы G4P[8] (62,6±2,8%) и G1P[8] (21,8±2,4%). Повсеместно, за исключением Витебской области, был обнаружен и генотип G2P[4] (3,8±1,4%). Генотип G3P[8] (5,5±1,4%) был идентифицирован только в Гродненской, Могилевской и Брестской областях. Значительно реже и преимущественно в г. Минске и Могилевской области регистрировались генотипы G9P[8] (2,8±1%), G2P[8] (1,7±0,9%), G3P[9] (1,0±0,6%) и G12P[8] (0,3±0,2%).

**Ключевые слова:** ротавирусная инфекция, генотипический пейзаж, мультиплексная полугнездовая ОТ-ПЦР.

**Введение.** Острые кишечные инфекции (ОКИ) представляют одну из серьезных проблем здравоохранения, устойчиво занимая 3–4-е место в структуре детской заболеваемости [1]. Сегодня одним из наиболее распространенных этиологических агентов острых гастроэнтеритов (ОГЭ), как

в развитых, так и развивающихся странах мира, являются ротавирусы, ежегодно вызывающие более 2 млн госпитализации и 600 тыс. смертей [2].

Согласно данным официальной регистрации, в 2014 г. в Республике Беларусь удельный вес ротавирусной инфекции (РВИ) в структуре ОКИ установленной этиологии составил 51,9%, что значительно превышает показатель десятилетней давности (34,5% в 2004 г.) [3].

Ежегодно в нашей стране регистрируется 3–5 тыс. заболевших РВИ. Из них более половины (58,9%) случаев приходится на г. Минск и Могилевскую область, в которых уровень заболеваемости в 2014 г. составил 104,75 и 80,40 на 100 тыс. населения соответственно, а наиболее низкий показатель был зарегистрирован в Гомельской области — 13,56 на 100 тыс. [3].

Существенные различия в уровне регистрируемой заболеваемости на отдельных административных территориях могут объясняться не только качеством организации лабораторной диагностики в регионах, но и особенностями генотипического спектра ротавирусов, циркулирующих в различных областях.

Геном ротавирусов (род *Rotavirus*, семейство *Reoviridae*) состоит из одиннадцати фрагментированных сегментов двуцепочечной РНК и кодирует 6 структурных (VP1-VP6) и 6 неструктурных (NSP1-NSP6) белков [4]. Определение серотипа ротавируса, основанного 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 с помощью мультиплексной ОТ-ПЦР определяют его генотип.

На сегодняшний день выявлено 27 различных G-генотипов и 37 P-генотипов ротавирусов [5], которые образуют около 70 G/P комбинаций [6]. В последнее время в Европе наиболее широко распространены 6 генотипов ротавирусов: G1P[8], G4[8], G2P[4], G9P[8], G3P[8] и G12P[8] [7]. Однако генотипический пейзаж ротавирусов может значительно различаться даже в рамках одной страны, а частота их встречаемости изменяться со временем, что объясняется высокой степенью изменчивости ротавирусов. Известно три механизма, приводящих к генетическому разнообразию: точечные мутации, реассортация сегментов генома и рекомбинация. Ротавирусы имеют высокую частоту мутаций, что обусловлено функционированием собственной РНК полимеразы. Предполагают, что в среднем на каждую репликацию генома происходит одна мутация. Реассортация, т. е. перераспределение фрагментов сегментированного генома, происходит с высокой частотой в период смешанной инфекции, в которой участвует два или более генетических варианта ротавирусов [8]. Реассортация обусловливает многообразие циркулирующих генотипов ротавируса.

Систематически проводимый в Республике Беларусь молекулярно-эпидемиологический мониторинг популяции ротавирусов позволяет определить спектр циркулирующих штаммов, выявить доминирующие генотипы, своевременно отслеживать их смену, осуществлять прогнозирование эпидемической ситуации.

**Цель** исследования — сравнительный анализ генотипического пейзажа ротавирусов, циркулировавших в 2014 г. различных в регионах Республики Беларусь.

**Материалы и методы.** Для установления генотипического разнообразия ротавирусов, циркулировавших в 2014 г. в Республике Беларусь, было отобрано 289 проб стула детей с подтвержденным в ИФА ротавирусным ОГЭ: 102 из г. Минска, по 60 из Брестской и Могилевской областей, 16 из Витебской области, 30 из Гомельской и 21 из Гродненской областей.

Выделение РНК ротавирусов из 10%-й суспензии стула проводили с использованием автоматической системы для выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах MagMAX Express (Applied Biosystems, США) с помощью наборов 5X MagMAX-96 Viral Isolation kit (Ambion, США). Генотипирование ротавирусов осуществляли на основании анализа поверхностных белков VP4 (P-генотип) и VP7 (G-генотип) с использованием мультиплексной полугнездовой ОТ-ПЦР. Для амлификации фрагмента гена VP7 с целью последующего G-генотипирования использовали праймеры 9con1L иVP7-R [9]. Для амплификации фрагмента гена VP4 с целью последующего P-генотипирования использовали праймеры con3 и con2 [10]. ОТ-ПЦР проводили в один раунд с использованием набора QIAGEN OneStep RT-PCR kit, QIAGEN (Германия). Начальную денатурацию РНК проводили в течение 5 мин при температуре 94°C в присутствии праймеров, затем вносили реакционную смесь, содержащую смесь ферментов, и проводили реакцию в следующих условиях: об-

ратная транскрипция — 30 мин при 42°С, денатурация смеси обратных транскриптаз и активация полимеразы — 15 мин при 95°С и 40 циклов амплификации. Каждый цикл включал: денатурацию при 94°С — 30 с, отжиг праймеров при 42°С — 30 с, элонгацию при 72°С — 45 с. Для второго раунда использовали набор специфических праймеров для определения G и P генотипов [11, 12]. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 3%-м агарозном геле с добавлением красителя Gelstar 10000X, Lonza (США) для визуализации ДНК.

При статистической обработке полученных данных рассчитывали ошибку репрезентативности относительной величины (m). Различия между сравниваемыми показателями считали статистически значимыми при $p<0,05$.

**Результаты и их обсуждение.** Выполненное с помощью мультиплексной ОТ-ПЦР генотипирование 289 ротавирусов, обнаруженных в образцах стула детей, по генам, кодирующим структурные белки VP7 и VP4, показало, что в Республике Беларусь в 2014 г. вклад в заболеваемость внесли восемь генотипов ротавирусов: G4P[8], G1P[8], G3P[8], G2P[4], G2P[8], G9P[8], G3P[9], G12P[8], которые были дополнены смесью G2P[4+8] (рисунок 1).

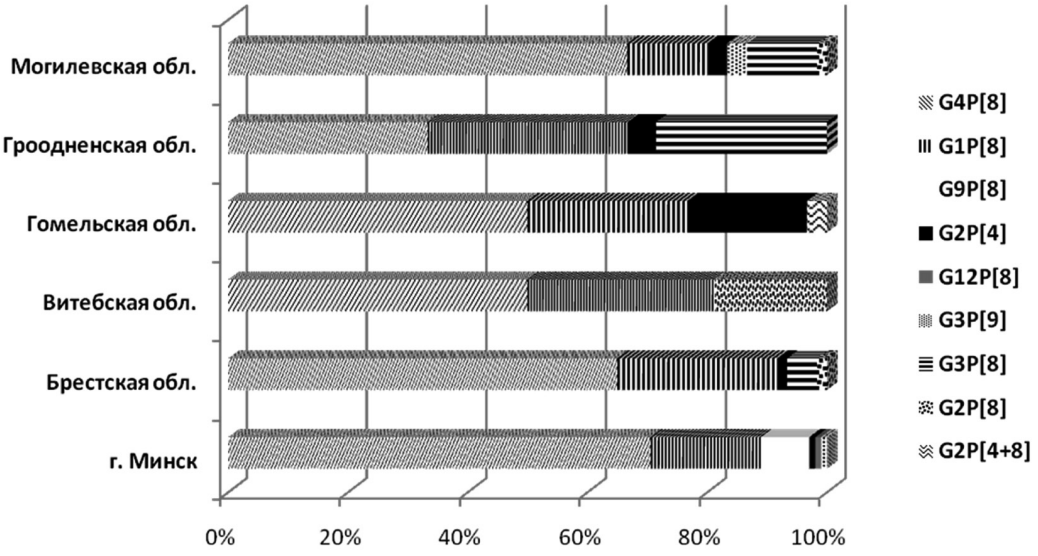



**Рисунок 1. — Генотипический пейзаж ротавирусов, циркулировавших в Республике Беларусь в 2014 г.**

Наибольшее генотипическое разнообразие ротавирусов было выявлено в г. Минске и Могилевской области, в которых генотипический пейзаж был представлен вирусами шести генотипов: G4P[8], G1P[8], G3P[8], G2P[4], G9P[8], G3P[9] и G4P[8], G1P[8], G3P[8], G2P[4], G3P[8], G2P[8] соответственно. Согласно данным официальной регистрации, на протяжении шестилетнего периода (2009–2014 гг.) самые высокие показатели заболеваемости РВИ ежегодно регистрируются именно в этих регионах Республики Беларусь (рисунок 2).

В Брестской области, которая занимает третье место в Беларуси по уровню заболеваемости РВИ, в 2014 г. циркулировало 5 генотипов ротавирусов: G4P[8], G1P[8], G3P[8], G2P[4] и G2P[8].

В остальных регионах, где заболеваемость ротавирусным гастроэнтеритом несколько ниже, генотипический пейзаж был представлен вирусами четырех генотипов в Гомельской и Гродненской областях (G4P[8], G2P[4], G1P[8], G2P[4+8] и G4P[8], G1P[8], G3P[8], G2P[4] соответственно) и трех — в Витебской области (G4P[8], G1P[8], G2P[8]).

Во всех регионах Республики Беларусь в 2014 г. доминировали ротавирусы генотипа G4P[8], доля которого составила 62,6±2,8%. Наибольший вклад в заболеваемость РВИ вирусы данного генотипа внесли в г. Минске (70,6±4,6%), Могилевской (68,3±6,0%) и Брестской (65±6,1%) областях. В Гомельской и Витебской областях ротавирусами генотипа G4P[8] было обусловлено 50±8% и 47±10% генетического разнообразия идентифицированных в 2014 г. вирусов соответственно.

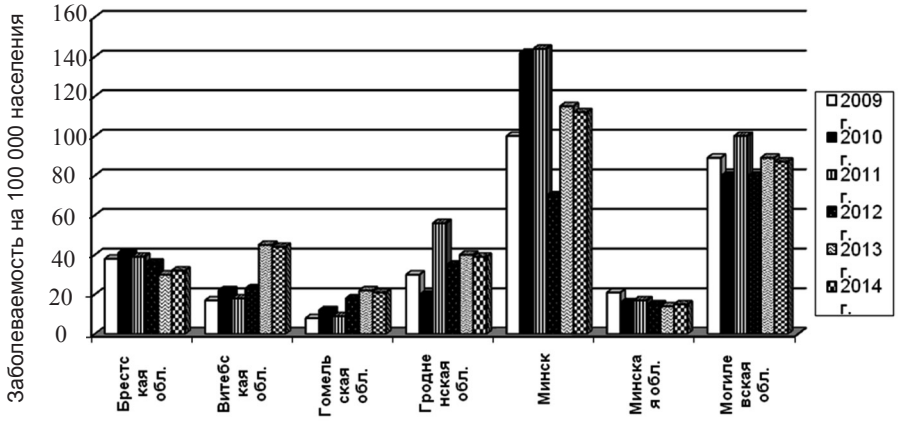



**Рисунок 2. — Заболеваемость ротавирусной инфекцией в различных регионах Республики Беларусь, 2009–2014 гг.**

Несколько реже ротавирусы генотипа G4P[8] регистрировались в Гродненской области, в которой их удельный вес составил 33,3±9,0%.

Следует отметить, что в Республике Беларусь генотип G4P[8] являлся доминирующим в 2008–2009 гг., несколько утратив свои лидирующие позиции в 2010–2011 гг., а в 2012–2014 гг. опять вышел на первое место в структуре заболеваемости [12]. В странах европейского региона генотип G4P[8] в последнее десятилетие устойчиво занимает лидирующие позиции, уступая по частоте встречаемости лишь генотипу G1P[8] [7].

Вторым по распространенности генотипом, также выявленным во всех регионах республики, был генотип G1P[8], доля которого составила 21,8±2,4%. Наибольший удельный вес в генотипический пейзаж идентифицированных ротавирусов данный генотип внес в Гродненской области — 33,3±9,0%. Практически с равной частотой вирусы генотипа G1P[8] регистрировались в Витебской, Брестской и Гомельской областях, составив 29,4±10, 26,7±8,0 и 26,7±9,0% генетического разнообразия вирусов данных областей соответственно. В Могилевской области и г. Минске ротавирусы генотипа G1P[8] выявлялись в сравнении с другими регионами страны несколько реже – 13,3±4,3 и 18,6±3,8% соответственно.

На третьем месте по частоте встречаемости в Республике Беларусь в 2014 г. был генотип G3P[8] (5,5±1,4%). Наиболее часто данный генотип регистрировался в Гродненской области (28,6±5,6%), уступая там лишь генотипам G4P[8] и G1P[8], и значительно реже — в Могилевской и Брестской областях (11,7±4,2 и 5,0±2,8% соответственно). В г. Минске, Витебской и Гомельской областях ротавирусы генотипа G3P[8] в 2014 г. выявлены не были.

Генотип G2P[4], регистрируемый во всех регионах страны, за исключением Витебской области, занял четвертое место в генотипичском пейзаже ротавирусов, идентифицированных в Республике Беларусь в 2014 г. Удельный вес данного генотипа был самым высоким в Гомельской области (20,0±6%), в остальных регионах вклад гентипа G2P[4] был не большим и составил от 1,0±0,6% в г. Минске до 4,8±3,7% в Гродненской области. Несмотря на то, что в странах Европейского Союза генотип G2P[4] устойчиво входит в тройку самых распространенных, в Республике Беларусь его удельный вес на протяжении 2008–2014 гг. колебался от 1 до 10% за исключением 2009 г., когда он составил 30% [12].

Значительно реже в Республике Беларусь в 2014 г. были идентифицированы генотипы: G9P[8] (2,8±1%), G2P[8] (1,7±0,9%), G3P[9] (1,0±0,6%) и G12P[8] (0,3±0,2%).

Ротавирусы генотипов G9P[8] и G12P[8] были выявлены только в эпидемический сезон РВИ в г. Минске. Стоит отметить, что начиная с 2008 г., генотип G9P[8] с различной частотой регулярно регистрировался в Беларуси, за исключением 2009 г., а генотип G12P[8] был обнаружен впервые. Однако в последние годы ротавирусы генотипа G12P[8] устойчиво входит в шестерку самых распространенных в Европе [7].

В 2014 г. генотип G3P[9] был идентифицирован только в г. Минске и Могилевской области, а G2P[8] был обнаружен в Республике Беларусь впервые в Витебской и Могилевской областях.

**Заключение.** В 2014 г. в Республике Беларусь генотипический пейзаж ротавирусов был представлен восьмью генотипами: G4P[8], G1P[8], G3P[8], G2P[4], G2P[8], G9P[8], G3P[9], G12P[8] и смесью G2P[4+8]. Наибольшее генотипическое разнообразие ротавирусов было зарегистрировано в г. Минске и Могилевской области, где уровень заболеваемости ротавирусным гастроэнтеритом наиболее высокий, наименьшее — в Витебской области. На протяжении года во всех регионах страны регистрировались генотипы G4P[8] и G1P[8], удельный вес которых составил 62,6±2,8 и 21,8±2,4% соответственно. Во всех регионах страны, за исключением Витебской области, был обнаружен генотип G2P[4] (3,8±1,4%). Генотип G3P[8] (5,5±1.4%) был идентифицирован только в Гродненской, Могилевской и Брестской областях. Значительно реже и преимущественно в г. Минске и Могилевской области в Республике Беларусь в 2014 г. регистрировались генотипы G9P[8] (2,8±1%), G2P[8] (1,7±0,9%), G3P[9] (1,0±0,6%) и G12P[8] (0,3±0,2%).

**Литература**


1.Васильев, Б.Я. Острые кишечные заболевания. Ротавирусы и ротавирусная инфекция / Б.Я. Васильев, Р.И. Васильева, Ю.В. Лобзин. — СПб.: Лань, 2000. — 272 с.

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

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

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

5.Matthijnssens, J. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) / J. Matthijnssens, C.M. McDonald // Arch. Virol. — 2011. — Ch. 15. — P. 1397–1413.

6.Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses / E. Trojnar [et al.] // J. Gen. Virol. — 2013. — Vol. 94. — P. 136–142.

7.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.

8.Encyclopedia of virology / J. Angel [et al.]. — 3 ed. — Elsevier Ltd, 2008. — P. 507–513.

9.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.

10. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India / B.K. Das [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1994. — Vol. 32, № 7. — P. 1820–1822.

11. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens / V. Gouvea [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1990. — Vol. 28. — P. 276–282.

12. Rotavirus genotypes in Belarus, 2008-2012 / G.V. Semeiko [et al.] // Infect. Genet. Evol. — 2014. — Vol. 28. — P. 480–485.


## REGIONAL GENOTYPIC DIVERSITY OF ROTAVIRUSES CIRCULATING IN BELARUS IN 2014


*Polyakova N.V.[1], Semeiko G.V.[2], Samoilovich E.O.[2], Klyuyko N.L.[3],*
*Lyahovskaya N.V.[4], Borisevich S.I.[5], Kuzmich I.A.[6], Dumova S.A.[7], Loseva E.M.[8]*

*[1]Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus;*
*[2]State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;*
*[3]Healthcare Institution "Municipal Children's Infectious Clinical Hospital", Minsk, Republic of Belarus;*
*[4]Healthcare Institution "Regional Infectious Clinical Hospital", Vitebsk, Republic of Belarus;*
*[5]State Institution "Brest Region Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health", Brest, Republic of Belarus;*
*[6]State Institution "Regional Infectious Clinical Hospital", Grodno, Republic of Belarus;*
*[7]State Institution "Gomel Region Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health", Gomel, Republic of Belarus;*
*[8]Healthcare Institution "Mogilev Region Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health", Mogilev, Republic of Belarus*



The results of genotyping of 289 rotaviruses suggests that 8 genetic variants (G4P[8], G1P[8], G3P[8], G2P[4], G2P[8], G9P[8], G3P[9], G12P[8] and mix G2P[4+8]) of rotavirus have been detected

among children with acute gastroenteritis from Minsk city and 5 regions of Belarus (Brest, Vitebsk, Gomel, Grodno and Mogilev) in 2014. Genotypes G4P[8] and G1P[8] were predominant in all regions of Belarus, amounting to 62,6±2,8 and 21,8±2,4% respectively. Genotype G2P[4] (3,8±1,4%) was also detected everywhere with exception of Vitebsk region. Genotype G3P[8] (5,5±1,4%) was identified in Grodno, Mogilev and Brest regions. Genotypes G9P[8] (2,8±1,0%), G2P[8] (1,7±0,9%), G3P[9] (1,0±0,6%) and G12P[8] (0,3±0,2%) were recorded in Belarus much less frequently and mainly in Minsk and Mogilev region.

**Keywords:** rotavirus infection, genotypic diversity, semi-nested multiplex RT-PCR.

Поступила 23.09.2015

## О РЕЗУЛЬТАТАХ АНАЛИЗА ДАННЫХ ПО КОРИ И КРАСНУХЕ И ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ИХ В ЕВРОПЕЙСКУЮ РЕГИОНАЛЬНУЮ КОМИССИЮ ПО ВЕРИФИКАЦИИ ЭЛИМИНАЦИИ ЭТИХ ИНФЕКЦИЙ

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

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

**Реферат.** В статье представлен анализ данных по эпидемиологическому надзору за корью и краснухой в Республике Беларусь за 2012–2014 гг. На основании результатов выявления и лабораторного обследования подозрительных на корь и краснуху пациентов, а также молекулярного изучения вирусов представлены убедительные доказательства отсутствия эндемичной циркуляции вирусов кори и краснухи в стране в течение исследуемого периода.

**Ключевые слова:** корь, краснуха, элиминация, эпидемиологический надзор.

**Введение.** В соответствии с поставленной целью элиминации кори и краснухи в Европейском регионе ВОЗ перед всеми странами региона поставлена задача сбора, детального анализа данных по кори и краснухе и представление их в специальном формате в Европейскую региональную комиссию по верификации элиминации этих инфекций. Под элиминацией понимается отсутствие эндемичных случаев кори или краснухи на определенной географической территории в течение не менее 12 мес. при наличии хорошо функционирующей системы эпидемиологического надзора [1].

К основным регламентированным ВОЗ индикаторным показателям, которые применяются для оценки качества надзора за корью и краснухой на этапе элиминации, относятся следующие:

- показатель лабораторных исследований (процент случаев подозрения кори или краснухи с адекватными пробами, исследованными в аккредитованной ВОЗ лаборатории) — не менее 80%;
- показатель исключенных случаев (показатель случаев подозрения кори или краснухи, обследованных и исключенных как случаи не кори или не краснухи на основании результатов лабораторных исследований в аккредитованной ВОЗ лаборатории и/или наличия эпидемиологической связи с лабораторно подтвержденными случаями других инфекций) — не менее 2 на 100000;
- репрезентативность регистрации исключенных случаев (процент субнациональных административных территорий, где показатель исключенных случаев составил как минимум 2 на 100000 населения) — не менее 80%;
- выявление вирусов (соотношение числа цепочек передачи вируса с установленным генотипом вируса к числу выявленных цепочек передачи вирусов кори и краснухи) — не менее 80%;
- источник инфекции установлен (процент случаев кори и краснухи с установленным источником инфекции, т. е. завозной случай, связанный с завозом или эндемичный) — не менее 80% [1].

В предложенном Европейским региональным бюро ВОЗ (ЕРБ ВОЗ) формате отчетности данные по ситуации по кори и краснухе в Республике Беларусь трижды (за 2012, 2013 и 2014 гг.) были представлены в Республиканскую комиссию по верификации элиминации кори и краснухи Министерства здравоохранения и через эту комиссию — в Европейскую региональную комиссию.

В данной работе представлен анализ информации по эпидемиологическому надзору за корью и краснухой в Республике Беларусь за 3-летний период (2012, 2013 и 2014 гг.) с результатами ее оценки Республиканской комиссией по верификации элиминации кори и краснухи и Европейской региональной комиссии.

**Материалы и методы.** Проанализированы результаты выявления и лабораторного обследования подозрительных на корь пациентов в Республике Беларусь в 2012–2014 гг. В качестве подозрительных рассматривались случаи, соответствующие стандартному определению случая кори для целей эпидемиологического надзора [2].

В соответствии с рекомендациями ВОЗ основным методом исследования было выявление IgM антител к вирусам кори и краснухи. В некоторых случаях (при сомнительном результате исследования IgM антител, при наличии клинической картины инфекции у ранее вакцинированного пациента) проводилось выявление нарастания концентрации IgG антител в парных сыворотках и обнаружение РНК вируса в клиническом материале в ОТ-ПЦР [3]. Кроме того, выявление РНК вируса в ОТ-ПЦР с последующим генотипированием вируса проводили для всех тех случаев, которые не имели четкой эпидемиологической связи с другим лабораторно подтвержденным случаем с уже установленным генотипом вируса.

Антитела классов IgM и IgG к вирусам кори и краснухи определяли с использованием соответствующих иммуноферментных тест-систем производства Siemens (Германия). Для обнаружения вирусной РНК клинический материал (для кори — гепаринизированная кровь, носоглоточный мазок, моча; для краснухи — носоглоточный мазок, моча) исследовали в ОТ-ПЦР. В целях генотипирования выполняли секвенирование С-терминальной области N-гена (450 нуклеотидов) вируса кори и фрагмента Е1-гена (739 оснований) вируса краснухи.

Выделение вирусной РНК из клинического материала выполняли с использованием набора «QIAamp Viral RNA Mini Kit» (QIAGEN, Германия). Идентификацию вируса кори проводили с помощью гнездовой ОТ-ПЦР, описанной J.R. Kremer и соавт. [4]. Диагностическую ОТ-ПЦР для выявления РНК вируса краснухи выполняли с праймерами Ru1-Ru4 [5] согласно протоколу, представленному J.M. Huebschen с соавт. [6]. Для положительных образцов проводили амплификацию в соответствии с протоколом для получения фрагмента длиной 739 п.о., необходимого для генотипирования вируса краснухи [7]. С этой целью для каждого положительного образца выполняли по 2 однораундовых ОТ-ПЦР с использованием набора QIAGEN OneStep RT-PCR kit (QIAGEN, Германия) и двух пар праймеров (8633F и 9112R, 8945F и 9577R) и синтезировали два перекрывающихся фрагментов длиной 480 и 633 п.о.

Амплифицированные фрагменты кДНК вирусов кори и краснухи вырезали из геля, очищали с использованием набора QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия) и секвенировали в обоих направлениях с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США) на капиллярном секвенаторе (Model 3100 Avant, Applied Biosystems, США). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием алгоритма W. Clustal, встроенного в программу BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0. Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA версии 6 [8]. Эволюционные расстояния между последовательностями определяли на основании двухпараметрической модели эволюции Кимура. Достоверность топологий филограмм оценивали методом псевдореплик (bootstrap) (анализировали 1000 псевдореплик).

**Результаты и их обсуждение.** В течение трех лет наблюдения в Республике Беларусь было выявлено 1120 пациентов, подозрительных на корь и/или краснуху (368 — в 2012 г., 329 — в 2013 г., 423 — в 2014 г.). Клинический материал от всех пациентов был доставлен в Республиканскую лабораторию по диагностике кори и краснухи (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии) и исследован рекомендованными ВОЗ методами на обе инфекции — корь и краснуху. На основании результатов лабораторных исследований было подтверждено 90 случаев кори (10 — в 2012 г., 16 — в 2013 г., 64 — в 2014 г.) и 12 случаев краснухи (10 — в 2012 г., 1 — в 2013 г., 1 — в 2014 г.). В остальных случаях, которые исходно рассматривались как подозрительные на корь или краснуху, оба эти диагноза были исключены. Показатель исключенных случаев соответствовал рекомендованному ВОЗ критерию — не менее 2 случаев на 100000 населения (2012 г. — 3,64, 2013 г. — 3,29, 2014 г. — 3,8), этот показатель был достигнут во всех областях страны.

Как известно, основную информацию по степени готовности страны к верификации элиминации кори и краснухи предоставляют результаты молекулярного изучения вирусов — по крайней мере по одному штамму вируса из каждой цепочки передачи [1]. Особый интерес представляет информация по анализу вспышек. Под вспышкой в соответствии с определением ЕРБ ВОЗ понимает-

ся цепочка передачи инфекции, т. е. два или более случаев кори или краснухи, которые наблюдаются в одно время и связаны по эпидемиологическим и/или вирусологическим характеристикам. К важным терминам также относятся определения эндемичной передачи вируса и возобновления эндемичной передачи. Под эндемичной передачей понимается продолжительная передача местных или завозных вирусов кори или краснухи, которая сохраняется на определенной географической территории не менее 12 мес. Возобновление эндемичной передачи — это ситуация, при которой эпидемиологические и лабораторные данные свидетельствуют о наличии цепочек передачи вирусов кори или краснухи, которая непрерывно продолжается в течение 12 мес. и более на определенной географической территории, где ранее была достигнута элиминация этой болезни [1].

Анализируя ситуацию в Республике Беларусь с использованием данных подходов, следует отметить, что за трехлетний период в стране было выявлено 6 цепочек передачи вируса кори, по 2 цепочки в каждый год наблюдения. Так, среди 12 зарегистрированных случаев кори в 2012 г., вызванных вирусами трех различных генетических вариантов цепочки передачи вируса, имели место в г. Бресте (5 случаев, вирус генотипа *D4*, *Manchester*) и г. Добруш, Гомельской области (2 случая в семейном очаге, вирус генотипа *D4*, *Bandarabas*). Кроме того, было выявлено 3 не связанных между собой единичных случая кори (генотип *D8*, *Villupuram* — 1 случай, генотип *D4*, *Manchester* — 2 случая) [9]. Среди 16 случаев кори, выявленных в 2013 г., вызванных вирусами пяти генетических вариантов (*D8* — 2 варианта (*Frankfurt* и *Republic of Komi*); *D4*, *Manchester*; *D9*, *Yamenashi* и *B3*), 12 являлись единичными не связанными между собой. В 2 случаях были выявлены короткие цепочки передачи завозных вирусов (*D8*, *Frankfurt* и *D9*, *Yamanashi*), состоящие из двух заболевших в семейных очагах, когда взрослые пациенты инфицировали непривитых детей в возрасте 11 мес. [10]. В 2014 г. в Республике Беларусь было зарегистрировано 64 случая кори, вызванные вирусами четырех генетических вариантов (*D8* — 2 варианта (*Frankfurt* и *Republic of Komi*), *D4*, *Manchester* и *B3*). Для обоих вариантов D8 были выявлены цепочки передачи. Для варианта *Frankfurt* цепочка передачи включала 58 случаев, для варианта *Republic of Komi* — 4 случая [11]. Варианты *D4* и *B3* распространения не получили.

Таким образом, для всех 6 цепочек передачи, выявленных в течение трех лет наблюдения, был установлен генотип вируса. В основном цепочки передачи были короткими и состояли из одной генерации распространения инфекции. Только в 2014 г. была выявлена достаточно длинная цепочка передачи вируса генотипа *D8*, *Frankfurt*. Циркуляция вируса продолжалась 3,5 мес., возобновления его эндемичной передачи не произошло.

Все 12 зарегистрированных за 3 года случаев краснухи (10 — в г. Минске, по одному — в Гомельской и Гродненской областях) были представлены единичными не связанными между собой случаями. Цепочек передачи вируса выявлено не было [12].

На основании эпидемиологических данных и молекулярно-генетической характеристики вируса было установлено происхождение случаев кори и краснухи. По определению ВОЗ, завозной случай — это случай заболевания у человека, имевшего контакт с источником инфекции за пределами данной страны за 7–18 дней (корь) или за 12–23 дня (краснуха) до появления сыпи, на что указывают эпидемиологические и/или вирусологические данные [1]. В соответствии с этим определением к завозным были отнесены 14 случаев кори: 3 — в 2012 г. (из Европы — *D4*, *Manchester*, из России — *D4*, *Bandarabas* и из Таиланда — *D8*, *Villupuram*); 8 — в 2013 г. (из Украины — *D4*, *Manchester*, из Таиланда — *D9*, из Индонезии — *D9*, *Yamanashi*, из Египта (вирусологическое исследование не проводилось, весь инкубационный период заболевания пациент провел в Египте), из России — *D8*, *Frankfurt* (2 случая) и *D8*, *Republic of Komi* и из ОАЭ — *B3*); 3 — в 2014 г. (из России — *D8*, *Frankfurt* и *D8*, *Republic of Komi* и из Украины — *D4*, *Manchester*).

Для случая, связанного с завозным, ЕРБ ВОЗ предложено следующее определение: случай местного заражения корью или краснухой как часть цепочки передачи инфекции от завозного случая, на что указывают эпидемиологические и/или вирусологические данные [1]. К таким случаям были отнесены 7 случаев кори в 2012 г., 8 — в 2013 г. и 61 — в 2014 г. В свою очередь случаи, которые были классифицированы как связанные с завозными, включали несколько групп заболевших. Наиболее простыми в классификации оказывались те случаи, когда заболевшие из страны не выезжали и имели эпидемиологическую связь с завозным случаем кори. К таким случаям были отнесены 5 в 2012 г., 2 — в 2013 г. и 58 — в 2014 г. Вторую группу случаев, классифицированных как за-

возные, представляли случаи, когда пациенты за пределы страны не выезжали и эпидемиологическую связь их с конкретным завозным случаем кори установить не удалось. Вероятно, для них более подходит определение «связанный с завозным вирусом кори». Таких случаев было 8 (1 — в 2012 г., 6 — в 2013 г., 1 — в 2014 г.). В число случаев, классифицированных как связанные с завозными, в 2014 г. вошли также 2 случая, когда часть инкубационного периода инфекции заболевшие провели в Республике Беларусь, а часть — вне страны (в одном случае — в Грузии, в другом — в Израиле). Выделенные от них вирусы относились к генотипу *D8*, *Frankfurt* и по характеристике С-терминальной области N-гена были абсолютно идентичны вирусам, которые циркулировали в этот период в Республике Беларусь. Известно, что в Израиле в 2014 г. было зарегистрировано только 3 случая кори (по одному случаю в январе, июне, сентябре) [13], которые были обусловлены вирусами генотипов *B3* и *G3*. В Грузии имела место вспышка кори (3190 случаев в 2014 г.), вызванная вирусом генотипа *D8*, *Frankfurt* [13], однако предоставить убедительные доказательства инфицирования за пределами страны и, следовательно, классифицировать этот случай как завозной не представлялось возможным.

Что касается краснухи, к завозным случаям были отнесены 3 случая: 2 — в 2012 г. (из Китая и Таиланда) и 1 — в 2014 г. (из Польши). Остальные 9 заболевших краснухой (8 — в 2012 г., 1 — в 2013 г.) в течение инкубационного периода из страны не выезжали. Эти случаи были классифицированы как связанные с завозными (с завозными случаями либо с завозными вирусами).

В одном случае краснухи (случай 2014 г., завозной из Польши) удалось установить генотип вируса — 2B. Амплификация РНК вируса краснухи в ОТ-ПЦР представляет определенные трудности, связанные с наличием множества стабильных вторичных структур в геноме вируса, обусловленных высоким содержанием Г-Ц оснований, снижающих эффективность молекулярных методов диагностики, в связи с этим установление генотипа вируса краснухи представляет огромную ценность для программы элиминации краснухи в целом [14].

Вирус 2B генотипа идентифицирован в нашей стране впервые. Если еще 10 лет назад вирусы такого генотипа выявлялись во всем мире редко и на ограниченных территориях (преимущественно в восточной части Российской Федерации и некоторых странах Азии), то в последние годы отмечено их широкое распространение в Европе, Африке, Северной Америке, в странах Ближнего Востока. В частности вспышка краснухи в Румынии в 2011–2012 гг. была обусловлена циркуляцией вирусов 2B генотипа. К сожалению, в литературе, а также в Международных генетических базах данных GenBank и RubeNS информация о вирусах, вызвавших вспышку краснухи в Польше в 2013–2014 гг., отсутствует, поэтому результаты молекулярно-генетического исследования вируса краснухи, выделенного от завозного случая краснухи из Польши, представляет несомненную важность.

К эндемичным случаям кори или краснухи, по определению ЕРБ ВОЗ, относятся случаи, возникшие в результате эндемичной передачи (продолжающейся не менее 12 мес.) вируса. Поскольку получены убедительные доказательства отсутствия эндемичной передачи как вируса кори, так и вируса краснухи на территории Республики Беларусь (кори — с 2004 г., краснухи — с 2007 г. [16]), случаев, классифицированных как эндемичные в 2012–2014 гг., не было.

При расчете показателя заболеваемости, а также при анализе возрастного состава и прививочного статуса заболевших в соответствии с критериями ВОЗ завозные случаи не принимаются во внимание, учитываются только связанные с завозными и другие местные случаи. Анализируя заболеваемость корью и краснухой в разрезе возрастных групп (до года, 1–4 года, 5–9, 10–14, 15–19, 20–29, 30 лет и старше), следует отметить, что обе эти инфекции в Республике Беларусь уже не относятся к детским инфекциям. Из 76 случаев кори, связанных с завозными, выявленных в течение 3 лет наблюдения, 68 (89,5%) оказались среди лиц 20 лет и старше. Три случая кори (3,9%) были выявлены у детей младше 1 года (которые по возрасту еще не получили вакцинацию против кори) и 5 случаев (6,6%) — у лиц в возрасте 1–19 лет (таблица). В целом по Европейскому региону в 2014 г. только 41% всех выявленных случаев кори относились к возрастной группе 20 лет и старше, 59% случаев были выявлены среди лиц 0–19 лет [15].

Таблица — Возраст и прививочный статус заболевших корью в Республике Беларусь в 2012–2014 гг. (исключая завозные случаи)

| Корь | <1 года | 1–4 года | 5–9 лет | 10–14 лет | 15–19 дет | 20–29 лет | 30+ лет | Нет данных | Всего |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 доз | 3 | 4 | 0 | 0 | 0 | 3 | 17 | 0 | 27 |
| 1 доза | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 6 | 0 | 8 |
| 2 или больше доз | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 18 | 9 | 0 | 28 |
| Нет данных | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 12 | 0 | 13 |
| Всего | 3 | 4 | 0 | 0 | 1 | 24 | 44 | 0 | 76 |

Из 9 случаев краснухи, связанных с завозными, 5 относились к возрастной группе 20–29 лет и 4 — к возрастной группе 30 лет и старше. Отсутствие случаев краснухи и очень редкая встречаемость случаев кори у детей подтверждает правильность используемой в настоящее время тактики вакцинации. Об этом свидетельствует и анализ прививочного статуса заболевших. Среди заболевших краснухой лиц, вакцинированных против этой инфекции, не было. Среди 8 заболевших корью в возрасте 0–19 лет 7 (87,5%) не были привиты против кори, один (12,5%) получил две дозы вакцины. Среди 68 заболевших старше 20 лет 20 человек (29,4%) не были привиты против кори, у 13 (19,1%) данные о вакцинации отсутствовали, у 35 (51,4%) имелись данные о ранее проведенной вакцинации (8 — с использованием одной дозы вакцины, 27 — с использованием 2 доз). Данные по вакцинальному статусу заболевших корью в Республике Беларусь существенно отличаются от данных по Европейскому региону в целом, где среди заболевших в 2014 г. доля невакцинированных составила 71%, а 29% получили по крайней мере 1 дозу вакцины [15]. Как известно, при высоком уровне привитости населения, позволившим достичь низкого уровня заболеваемости, среди выявленного небольшого числа заболевших существенную долю могут составлять те, кто был привит ранее. Быстрая утрата поствакцинальных антител либо их недостаточная выработка отмечаются при применении слабо иммуногенных вакцин, либо при несоблюдении условий холодовой цепи при их транспортировке и хранении [17]. Нельзя исключить, что эти проблемы могли иметь место до утверждения современных требований к контролю качества вакцин. Однако полученные еще в первые десятилетия вакцинации против кори данные свидетельствуют о том, что если поствакцинальные неудачи и могут играть определенную роль в поддержании трансмиссии вируса кори в случае его заноса в хорошо вакцинированную популяцию, эта трансмиссия непродолжительная, заканчивается спонтанно после не более чем 4 генераций инфекции и не приводит к восстановлению эндемичной циркуляции вируса [18].

**Заключение.** Анализ данных по эпидемиологическому надзору за корью и краснухой за 3-летний период позволил подтвердить отсутствие эндемичной циркуляции обоих вирусов — кори и краснухи — в Республике Беларусь при хорошо функционирующей системе надзора за этими инфекциями. Хорошее качество проводимого надзора подтверждено следующим:

- показатель лабораторных исследований достиг 100%, т. е. все выявленные в стране случаи подозрения кори и краснухи (1120 случаев за 3 года) прошли лабораторное обследование на эти инфекции;

- показатель исключенных случаев кори/краснухи составил более 2 на 100000 населения во все годы наблюдения (2012 г. — 3,64, 2013 г. — 3,29, 2014 г. — 3,8);

- этот показатель был достигнут во всех регионах страны;

- генотип вируса кори был установлен для всех цепочек его передачи;

- в зависимости от источника инфекции случаи кори и краснухи классифицированы как завозные или связанные с завозными. Эндемичных случаев выявлено не было.

Республиканская комиссия по верификации элиминации кори и краснухи Министерства здравоохранения Республики Беларусь, проанализировав представленные данные за 2012, 2013 и 2014 гг., сделала заключение об отсутствии эндемичной циркуляции вирусов кори и краснухи в

стране. Европейская региональная комиссия также подтвердила, что в 2012 и 2013 гг. в Республике Беларусь отсутствовала эндемичная циркуляции вирусов кори и краснухи, данные 2014 г. находятся в процессе анализа. По заключению Европейской комиссии из 53 стран Европейского региона ВОЗ в число стран с прерванной передачей вируса кори в 2012 г. вошли 23 страны, в 2013 г. — 22 страны, с прерванной передачей вируса краснухи — 25 и 24 страны соответственно. К сожалению, более половины стран Европейского региона все еще не относятся к странам, где передача вирусов кори и краснухи прервана.

Поскольку достижение элиминации кори и краснухи в Европейском Регионе ВОЗ может быть объявлено только после того, как все 53 страны подтвердят отсутствие эндемичной циркуляции вирусов в течение не менее 36 мес., всем странам региона, в т. ч. и Беларуси, необходимо продолжать осуществлять надзор за этими инфекциями в соответствии со стандартами, рекомендованными ВОЗ, и усилить все необходимые направления работы для достижения цели элиминации этих инфекций.

**Литература**


1.Элиминация кори и краснухи. Основы процесса верификации в Европейском регионе ВОЗ / Всемирная Организация Здравоохранения. Европейское региональное бюро ВОЗ. — Копенгаген, 2014. — 32 с.

2.WHO Regional Office for Europe. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. — Copenhagen, 2010. — 48 p.

3.WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. — 2nd ed. — Geneva: WHO, 2006. — 100 p.

4.Genotyping of recent measles virus strains from Russia and Vietnam by nucleotide-specific multiplex PCR / J.R. Kremer [et al.] // J. Med. Virol. — 2007. — Vol. 79, № 7. — P. 987–994.

5.Detection of rubella virus gene sequences by enzymatic amplification and direct sequencing of amplified DNA / F. Eggerding [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1991. — Vol. 29, № 5. — P. 945–952.

6.Co-circulation of multiple rubella virus strains in Belarus forming novel genetic groups within clade 1 / J.M. Hübschen [et al.] // J. Gen. Virol. — 2007. — Vol. 88, № 7. — P. 1960–1966.

7.Phylogenetic analysis of rubella viruses identified in Uganda, 2003–2012 / P. Namuwulya [et al.] // J. Med. Virol. — 2014. — Vol. 86, № 12. — P. 2107–2113.

8.MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. — 2013. — Vol. 30. — P. 2725–2729.

9.Самойлович, Е.О. Надзор за корью в Республике Беларусь; подготовка к верификации элиминации инфекции / Е.О. Самойлович // Мед. журн. — 2014. — № 2. — С. 94–99.

10. Самойлович, Е.О. Ситуация по кори в Республике Беларусь в 2013 г. / Е.О. Самойлович // Воен. медицина. — 2014. — № 2. — С. 48–51.

11. Распространение завозного вируса кори в Минске / И.Н. Глинская [и др.] // Здравоохранение. — 2014. — № 10. — С. 44–48.

12. Самойлович, Е.О. Краснуха в Республике Беларусь: этап верификации элиминации инфекции / Е.О. Самойлович // Здравоохранение. — 2014. — № 5. — С. 13–17.

13. WHO EpiData. A report on the epidemiology of selected vaccine-preventable diseases in the European region. — 2014. — № 12. — 6 p.

14. Jin, L. Application of molecular and serological assay to case based investigation of rubella and congenital rubella syndrome / L. Jin, B. Thomas // J. Med. Virol. — 2007. — Vol. 79, № 7. — P. 1017–1024.

15. WHO EPIbrief. A report on the epidemiology of selected vaccine-preventable diseases in the European Region. — 2015. — № 1. — 8 p.

16. Самойлович, Е.О. Надзор за вакциноуправляемыми инфекциями в Республике Беларусь: соответствие международным стандартам / Е.О. Самойлович // Здравоохранение. — 2014. — № 6. — С. 7–11.

17. Nationwide measles epidemic in Ukraine: the effect of low vaccine effectiveness / I. Velicko [et al.] // Vaccine. — 2008. — Vol. 26, № 52. — P. 6980–6985.

18. Measles outbreak in a vaccinated school population: epidemiology, chains of transmission and the role of vaccine failure / B.M. Ncowane [et al.] // Am. J. Public Health. — 1987. — Vol. 77. — P. 434–438.

## THE RESULTS OF DATA ANALYSIS FOR MEASLES AND RUBELLA AND THEIR SUBMISSION TO THE EUROPEAN REGIONAL COMMISSION ON VERIFICATION OF THE ELIMINATION OF THESE INFECTIONS

*Samoilovich E.O., Semeiko G.V., Shimanovich V.P., Yermalovich M.A., Svirchevskaya E.Yu.*

*State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

Analysis of the data on measles and rubella surveillance in the Republic of Belarus in 2012–2014 was presented. Based on identification of suspected measles and rubella patients, their laboratory examination, as well as molecular investigation of viruses the strong evidence of the absence of endemic circulation of measles and rubella virus in the country during the observed period was obtained.

**Keywords:** measles, rubella, elimination, surveillance.

Поступила 04.09.2015

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ДЕТЕЙ С СИНДРОМОМ ОСТРОГО ВЯЛОГО ПАРАЛИЧА В БЕЛАРУСИ В 2012–2015 гг.

*Ухова И.Ф., Самойлович Е.О., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю.*

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

**Реферат.** За январь 2013 г. — август 2015 г. вирусологически обследованы 125 детей с синдромом острого вялого паралича (ОВП). От 6 (4,8±3,6%) из них выделены полиовирусы (ПВ), от 7 (5,6±4,2%) — аденовирусы. Молекулярно-генетическое исследование изолированных ПВ методом двойного анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов показало, что 4 из 13 штаммов являлись рекомбинантными. Гетеротипичные ПВ относились к серотипу 3 и имели структурную организацию генома ПВ3ХПВ1. Все случаи с выделением ПВ были классифицированы как ОВП неполиомиелитной этиологии, поскольку выделенные ПВ не являлись этиологическими агентами заболеваний и их обнаружение отражало естественный процесс экскреции вирусов детьми, недавно привитыми с использованием оральной полиовакцины в составе комбинированной схемы иммунизации инактивированной и оральной полиовакцинами.

**Ключевые слова:** полиовирус, острый вялый паралич, рекомбинация.

**Введение.** Благодаря усилиям Глобальной инициативы по ликвидации полиомиелита, созданной в 1988 г., число случаев заболевания паралитическим полиомиелитом в мире уменьшилось более чем на 99%. Около 80% населения мира живет в регионах, сертифицированных ВОЗ как свободные от полиомиелита: Американский регион (с 1994 г.), регион стран Западной части Тихого океана (с 2000 г.), Европейский регион (с 2002 г.). регион стран Юго-Восточной Азии (с 2014 г.). Эндемичными остаются три страны — Нигерия, Пакистан и Афганистан. На Пакистан приходится около 85% всех случаев заражения диким полиовирусом (ДПВ) в мире [1, 2].

В настоящее время только ДПВ серотипа 1 распространен на эндемичных территориях. Последнее обнаружение серотипа 2 было зарегистрировано в Индии в 1999 г., а последний случай серотипа 3 — в Нигерии в 2012 г. [1, 2].

На заключительном этапе ликвидации полиомиелита потенциальную опасность представляют также вакцино-родственные полиовирусы (ВРПВ) — вирусы, которые вследствие длительной циркуляции в популяции либо длительного размножения в организме иммунодефицитных лиц в значительной степени дивергировали от вакцинных штаммов Себина, приобретая нейровирулентные свойства и способность вызывать вспышки паралитического полиомиелита. Циркулирующие ВРПВ обнаруживаются в странах с низким уровнем охвата вакцинации против полиомиелита. По данным ВОЗ, в 2013 г. семь стран сообщали о случаях паралитического полиомиелита, вызванного ВРПВ серотипа 2. Наибольшее число случаев было зарегистрировано в Пакистане. В 2014 г. в Паки-

стане, Нигерии и Судане было выявлено 54 случая ВРПВ серотипа 2, один случай ВРПВ серотипа 1 был обнаружен на Мадагаскаре. В 2015 г. ВРПВ продолжают циркулировать в Нигерии и на Мадагаскаре. В июле 2015 г. также была получена информация о двух случаях острого вялого паралича (ОВП), вызванных циркулирующим ВРПВ серотипа 1 в Закарпатской области на юго-западе Украины. Вирусы были изолированы от двух невакцинированных против полиомиелита детей в возрасте 10 мес. и 4 лет. В 2014 г. на Украине только 50% детей были полностью вакцинированы против полиомиелита, в то время как в 2015 г. уровень охвата вакцинацией среди детей в возрасте до года составил около 14% [2].

Учитывая складывающуюся в мире ситуацию по полиомиелиту, требуется усиление мониторинга циркуляции полиовирусов (ПВ) и поддержание высокого уровня охвата детей плановой иммунизацией.

Надзор за случаями ОВП у детей до 15 лет является основополагающим в выявлении случаев заболевания полиомиелитом и включает: выявление и регистрацию случаев, сбор и транспортировку образцов стула для анализа в аккредитованную ВОЗ лабораторию, изолирование и идентификацию ПВ, молекулярно-генетическое исследование ПВ с целью определения их происхождения.

В Беларуси разработан и утвержден план мероприятий на 2010–2015 гг. по поддержанию статуса страны, свободной от полиомиелита, который регулирует проведение всех мероприятий по надзору за этим заболеванием. Все исследования по выделению, идентификации и молекулярно-генетическому изучению вирусов от детей с ОВП проводятся в аккредитованном ВОЗ Национальном референс-центре по полиомиелиту (НРЦП), созданном на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

**Цель** исследования — вирусологическое и молекулярно-генетическое исследование вирусов, выделенных от детей с синдромом ОВП при проведении надзора за полиомиелитом в январе 2013 г. — августе 2015 г.

**Материалы и методы.** Образцы стула детей с синдромом ОВП вирусологически исследовали с помощью трех перевиваемых культур клеток — RD (клетки рабдомиосаркомы человека), HEp2C (клетки эпидермоидной карциномы человека), L20B (линия мышиных клеток, экспрессирующих рецептор к ПВ).

Согласно рекомендациям ВОЗ, идентификацию ПВ выполняли в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к ПВ 1, 2 и 3 серотипов (ПВ1, ПВ2, ПВ3), а неполиомиелитных энтеровирусов — в реакции нейтрализации с использованием набора типоспецифических сывороток к энтеровирусам (Институт общественного здравоохранения, Билтховен, Нидерланды) [3].

Идентификацию аденовирусов осуществляли с использованием диагностической ПЦР-тест-системы «Adenovirus-EPh» («АмплиСенс», РФ).

Молекулярно-генетическая характеристика ПВ была получена на основании анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) двух значимых областей генома вируса: области длиной 480 п.о., кодирующей N-концевую часть структурного белка VP1 (ПДРФ-1), и области длиной 291 п.о., кодирующей фрагмент неструктурного белка вирусной 3D-полимеразы (ПДРФ-3D1). Для рестрикционного картирования амплифицированных фрагментов использовали по две соответствующие эндонуклеазы («Promega», США): *Hpa*II, *Hae*III для ПДРФ-1 и *Rsa*I, *Hae*III для ПДРФ-3D1. Принадлежность исследуемых штаммов к вакцинным или диким определяли в агарозном геле путем сравнения их рестрикционных профилей, полученных после обработки каждой из эндонуклеаз, с профилями рестрикции эталонных штаммов [4].

**Результаты и их обсуждение.** За анализируемый период в стране было зарегистрировано 125 случаев заболеваний ОВП у детей в возрасте до 15 лет. Из них 44 случая были выявлены в 2013 г., 40 — в 2014 г. и 41 — за восемь месяцев 2015 г. Случаи ОВП регистрировались во всех регионах республики: Брестской области — 20, Витебской — 14, Гомельской — 25, Гродненской — 11, Минской — 16, Могилевской — 17 и г. Минске — 22.

У всех детей в течение первых двух недель от начала паралича были собраны по два образца стула, которые в трехдневный срок доставлялись в НРЦП для вирусологического и молекулярно-генетического исследований.

Вирусологическое обследование 125 детей с использованием перевиваемых культур клеток показало, что в образцах стула 13 (10,4±7,5%) из них присутствуют цитопатические агенты (ЦПА). Всего при исследовании 250 образцов были обнаружены 25 ЦПА.

В культуре клеток HEp2C в 13 из 25 выявленных ЦПА цитопатический эффект был представлен крупными клетками округлой формы, характерными для аденовируса. Последующее проведение диагностической ПЦР к аденовирусам подтвердило присутствие в образцах ДНК аденовируса. Известно, что аденовирус может вызывать поражения центральной нервной системы с наличием вялых параличей, поэтому выделение аденовирусов от детей с ОВП представляет интерес в плане установления его этиологической значимости [5].

В нашем исследовании аденовирусы были изолированы от 7 (5,6±4,2%) из 125 детей с ОВП. У 6 из них вирус обнаруживался в двух образцах стула, у одного ребенка выделялся только из одного образца. Пять из семи заболевших детей были в возрасте до 3 лет и двое — в возрасте 9 и 10 лет (таблица 1). Ответить на вопрос, являются ли выделенные аденовирусы этиологическими агентами параличей не представляется возможным.

Таблица 1. — Случаи ОВП с выделением аденовирусов в январе 2013 г. — августе 2015 г.

| Эпидномер/ возраст | Заключительный диагноз | № штамма/ тип/ год выделения | Вирус |
|---|---|---|---|
| BY 309-13-12<br>3 года | Мононевропатия нижней конечности | 36938/Adeno/2013<br>36939/Adeno/2013 | Аденовирус<br>Аденовирус |
| BY 617-13-16<br>9 лет | Полирадикулонейропатия | 36944/Adeno/2013<br>36945/Adeno/2013 | Аденовирус<br>Аденовирус |
| BY 608-13-27<br>2 года | Мононевропатия | 36987/Adeno/2013<br>36988/Adeno/2013 | Аденовирус<br>Аденовирус |
| BY 113-14-29<br>9 мес. | Нейропатия малоберцового нерва | 37272/Adeno/2014<br>37273/Adeno/2014 | Аденовирус<br>Аденовирус |
| BY 118-14-31<br>10 лет | Острая демиелинизирующая полинейропатия | 37271/Adeno/2014 | Аденовирус |
| BY 501-15-05<br>1 год 5 мес. | Проксимальный монопарез правой конечности | 37381/Adeno/2015<br>37382/Adeno/2015 | Аденовирус<br>Аденовирус |
| BY 304-15-16<br>3 года | Нейропатия левого седалищного нерва | 37411/Adeno/2015<br>37412/Adeno/2015 | Аденовирус<br>Аденовирус |

Кроме 13 ЦПА, идентифицированных как аденовирусы в культуре клеток HEp2C, еще в 12 образцах стула от шести детей ЦПА были выявлены во всех трех культурах клеток — HEp2C, RD и L20B. Серотипирование этих 12 ЦПА в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к ПВ трех серотипов показало присутствие ПВ. Всего из 250 исследованных образцов стула, полученных от детей, в 12 (4,8±1,8%) образцах было установлено присутствие ПВ (таблица 2).

Пять из шести детей выделяли монотипы ПВ. У одного ребенка в первом образце стула присутствовал монотип ПВ1, в то время как во втором образце ПВ1 обнаруживался в смеси с ПВ2. Среди 13 изолированных ПВ подавляющее большинство (8, 61,5%) было представлено серотипом 3, 2 штамма относились к серотипу 1 и 3 — к серотипу 2.

В сравнении с результатами обследования детей с ОВП в 1996–2007 гг. частота выделения ПВ от детей с ОВП в последние годы снизилась соответственно с 7,2±1,1 до 4,8±3,6% ($p<0,05$) [6]. Это связано с тем, что календарь прививок против полиомиелита в Беларуси в последние годы включает введение первых трех доз инактивированной полиовакцины (ИПВ) с последующим введением трех доз оральной полиовакцины (ОПВ). В организме ранее иммунизированного ИПВ ребенка введенный в составе ОПВ живой вирус размножается и выделяется более короткое время.

Дети, выделявшие ПВ в период январь 2013 г. — август 2015 г. были привиты в соответствии с комбинированной схемой вакцинации, применяемой в стране, и первоначально получили несколько доз ИПВ. У двух детей ПВ изолировались в течении нескольких дней после введения пятой дозы ОПВ, в то время как у четырех детей ПВ выявлялись на более поздних (несколько недель) сроках. От одного ребенка в возрасте семи лет с диагнозом «нейропатия правого малоберцового нерва», зарегистрированном в 2014 г., ПВ3 изолировался на 36 и 37-й дни после вакцинации шестой дозой ОПВ.

Таблица 2. — Полиовирусы, выделенные от детей с ОВП в январе 2013 г. — августе 2015 г.

| Эпидно-мер/ возраст | Заключительный диагноз | Вакцинация | | | № штамма/ серотип / год выделения | ПДРФ | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | -1 | | -3D1 | |
| | | число доз ИПВ | число доз ОПВ | период от введения последней дозы ОПВ до изоляции ПВ | | *Hpa*II | *Hae*III | *Rsa*I | *Hae*III |
| BY 402-13-22 2 года | Нейромиалгический синдром | 3 | 5 | 1 день | 36965/ПВ1/2013 | S1 | S1 | S1 | S1 |
| | | | | 2 дня | 36966/ПВ1/2013<br>36966/ПВ2/2013 | S1<br>S2 | S1<br>S2 | S1<br>S2 | S1<br>S2 |
| BY 618-13-38 2 года | Острая нейропатия | 3 | 5 | 17 дней | 37070/ПВ3/2013 | S3 | S3 | S3 | S3 |
| | | | | 19 дней | 37071/ПВ3/2013 | S3 | S3 | S3 | S3 |
| BY 319-13-44 1 год 6 мес. | Левосторонний нижний монопарез | 3 | 4 | 27 дней | 37097/ПВ3/2013 | S3 | S3 | **S1** | **S1** |
| | | | | 29 дней | 37098/ПВ3/2013 | S3 | S3 | **S1** | **S1** |
| BY 703-14-12 6 лет | Нейропатия малоберцового нерва | 2 | 6 | 36 дней | 37184/ПВ3/2014 | S3 | S3 | S3 | S3 |
| | | | | 37 дней | 37185/ПВ3/2014 | S3 | S3 | S3 | S3 |
| BY 501-14-38 2 года | Острый вялый паралич | 4 | 5 | 21 день | 37356/ПВ3/2014 | S3 | S3 | **S1** | **S1** |
| | | | | 22 дня | 37357/ПВ3/2014 | S3 | S3 | **S1** | **S1** |
| BY 501-15-31 2 года | Нейропатия малоберцового нерва | 3 | 5 | 3 дня | 37465/ПВ2/2015 | S2 | S2 | S2 | S2 |
| | | | | 4 дня | 37466/ПВ2/2015 | S2 | S2 | S2 | S2 |

Вероятность обнаружения ПВ также зависела от возраста ребенка, т. к. в соответствии с календарем прививок дети получают ОПВ в возрасте 18, 24 мес. и 6 лет. Среди шести детей, выделяющих ПВ, пять детей были в возрасте до двух лет и один ребенок в возрасте 6 лет.

Согласно клинико-эпидемиологическим данным, изолированные от детей с ОВП ПВ не являлись этиологическими агентами заболеваний и их обнаружение представляло собой естественный процесс выделения вируса из кишечника детей, недавно привитых с использованием живой ОПВ. Никто из детей, выделявших ПВ, не имел характерных для полиомиелита остаточных параличей. Все случаи с выделением ПВ были классифицированы как ОВП неполиомиелитной этиологии.

Поскольку высокая пластичность генома РНК-содержащих вирусов, обусловленная генетической изменчивостью вследствие возникновения мутаций и/или рекомбинаций, наряду со способностью длительно бессимптомно персистировать в клетках кишечника или объектах окружающей среды ведет к появлению вирусов с новыми биологическими свойствами, а соответственно и их непредсказуемой патогенностью для популяции представлялось целесообразным изучить молекулярно-генетическую характеристику ПВ.

С помощью двойного ПДРФ, основанного на рестрикционном картировании двух дистальных областей генома ПВ, кодирующих основной структурный белок VP1 и белок вирусной 3D-полимеразы, были исследованы 13 штаммов ПВ (таблица 2).

При сравнении рестрикционных профилей штаммов с профилями рестрикции эталонных ДПВ и вакцинных штаммов Себина серотипов 1, 2 и 3 было показано, что профили рестрикции исследуемых штаммов по сайтам рестрикции *Hpa*II и *Hae*III в области VP1 полностью соответствуют профилям рестрикции эталонных штаммов Себина, что подтверждает вакцинное происхождение ПВ.

Согласно результатам, полученным для ПДРФ-3D1, тип анализируемых штаммов совпадал для 9 (69,2%) из 13 штаммов ПВ, что соответствует гомотипичной организации генома вирусов. Рестрикционные профили четырех (30,8%) штаммов ПВ3 являлись отличными от профилей рестрикции эталонного штамма Себина серотипа 3. По сайту рестрикции *Rsa*I они были представлены двумя фрагментами длинной 208 и 83 п.о. вместо фрагментов длинной 116, 92, 43 и 40 п.о., характер-

ных для вакцинного ПВ3. После обработки амплифицированных фрагментов длинной 291 п.о. эндонуклеазой *Hae*III профили рестрикции этих штаммов были представлены двумя фрагментами длинной 147 и 144 п.о., что также являлось нетипичным для вакцинного ПВ3, который не содержит сайта рестрикции по *Hae*III в 3D1 области генома. Наличие подобных профилей рестрикции в 3D1 области у штаммов 37097/ПВ3/2013, 37098/ПВ3/2013, 37356/ПВ3/2014 и 37357/ПВ3/2014 являлось характерным для эталонного вакцинного штамма Себина серотипа 1, а следовательно, свидетельствовало о гетеротипичной структуре генома вирусов ПВ3ХПВ1.

Как известно, обнаружение ПВ3 с рекомбинантным геномом является довольно частым событием, поскольку геном этого серотипа содержит дополнительный сайт инициации трансляции, что ведет к увеличению вероятности рекомбинационного события с ПВ1 или ПВ2 и дает такому рекомбинантному вирусу некоторые селективные преимущества при репликации *in vivo*.

Наиболее «горячей точкой» для рекомбинантов ПВ3 является участок генома между нуклеотидами 4921 и 4948 в области неструктурных белков и затрагивает регион, кодирующий вирусный белок 2С. Вероятно, рекомбинационные события между вариантами вакцинных штаммов Себина серотипов 3 и 1 произошли в непосредственной близости от этой «горячей точки». Для установления локализации точки перекреста у выявленных гетеротипичных штаммов необходимо более детальное молекулярно-генетическое исследование области генома 3АС длинной 1005 п.о. с использованием ПДРФ-3АС анализа и/или частичное секвенирование генома вирусов.

Вирусы с рекомбинантным геномом были выделены от двух детей. В 2013 г. от годовалого ребенка из Гомельской области с диагнозом «левосторонний нижний монопарез» рекомбинантные штаммы 37097/ПВ3/13 и 37098/ПВ3/13 были обнаружены на 27 и 29-й дни после введения четвертой дозы ОПВ. Гетеротипичные штаммы 37356/ПВ3/2014, 37357/ПВ3/2014 были также изолированы в 2014 г. в г. Минске от ребенка 2 лет на 21 и 22-й дни после вакцинации пятой дозой ОПВ. Вероятнее всего после вакцинации ИПВ кишечный иммунитет у детей полностью не сформировался и введенные в составе ОПВ живые ПВ некоторое время размножались в их кишечнике, что способствовало образованию вирусов с измененной генетической структурой.

**Заключение.** Таким образом, анализ полученных данных показал, что ПВ, выделенные от детей с ОВП при проведении надзора за полиомиелитом в 2013–2015 гг., являлись вакцинными. Присутствие вакцинных ПВ в популяции обусловлено применением для иммунизации детей ОПВ, содержащей живые аттенуированные штаммы ПВ трех серотипов. Преобладание среди полученных изолятов ПВ3, вероятнее всего, обусловлено более медленным формированием кишечного иммунитета к ПВ этого типа. Выявление рекомбинантных штаммов среди ПВ3 свидетельствует о селективном преимуществе, которое приобрели рекомбинантные ПВ3 благодаря включению гетеротипичной вирусной полимеразы, принадлежащей вирусу типа 1.

**Литература**

1. ВОЗ. Полиомиелит [Электронный ресурс]: информ. бюлл. — 2014. — № 114. — Режим доступа: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/ru/. — Дата доступа: 09.09.2015.

2. Global Polio Eradication Initiative. Data and monitoring [Electronic resource]. — Mode of access: http://www.polioeradication.org/dataandmonitoring/poliothisweek.aspx. — Date of access: 09.09.2015.

3. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. — Женева: ВОЗ, 2005. — 112 с.

4. The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment lenth polymorphism assay / J. Balanant [et al.] // Virology. — 1991. — Vol. 184. — P. 645–654.

5. Adenovirus isolation rates in acute flaccid paralysis patients / O.E. Ivanova [et al.] // J. Med. Virol. — 2012. — Vol. 84. — P. 75–80.

6. Изоляция полио- и неполиомиелитных вирусов от детей с синдромом острого вялого паралича при различных схемах иммунизации против полиомиелита / И.Ф. Ухова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск, 2008. — Вып. 1. — С. 319–322.

## MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTIC OF THE VIRUSES ISOLATED FROM CHILDREN WITH A SYNDROME OF ACUTE FLACCID PARALYSIS IN BELARUS, 2012–2015

*Uhava I.F., Samoilovich E.O., Yermalovich M.A., Svirchevskaya E.Yu.*

*State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

For the period from January 2013 to August 2015 in total 125 children with AFP syndrome were examined. Polioviruses were isolated from 6 (4.8±3.6%), adenoviruses — from 7 (5.6±4.2%) of them. According to RFLP analysis 4 of 13 isolated polioviruses were intertype vaccine/vaccine recombinants. All recombinants belonged to serotype 3 and have genomic organization PV3XPV1. All cases with PVs isolation were classified as AFP of non-polio etiology. Isolation of PVs reflected a natural process of viruses excretion by children vaccinated with OPV according to combined IPV/OPV immunization schedule.

**Keywords:** poliovirus, acute flaccid paralysis syndrome, recombination.

Поступила 30.09.2015

## ДОЗОРНЫЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА БАКТЕРИАЛЬНЫМИ МЕНИНГИТАМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ (2013–2014 ГГ.)

*Шиманович В.П.[1], Титов Л.П.[1], Давыдов А.В.[1, 4], Глинская И.Н.[2], Левшина Н.Н.[2], Бойко Т.В.[2], Миклаш Л.В.[3], Клюйко Н.Л.[5], Кузьмич И.А.[6]*

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

*[2]Государственное учреждение «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии», Минск, Республика Беларусь;*

*[3]Государственное учреждение «Гродненский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Гродно, Республика Беларусь;*

*[4]Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;*

*[5]Учреждение здравоохранения «Детская инфекционная клиническая больница», Минск, Республика Беларусь;*

*[6]Учреждение здравоохранения «Гродненская областная инфекционная клиническая больница», Гродно, Республика Беларусь*

**Реферат.** Инвазивные бактериальные заболевания являются актуальной проблемой практического здравоохранения и нуждаются в постоянном внимании. Дозорный эпидемиологический надзор за бактериальными менингитами является важным элементом совершенствования национальной системы эпиднадзора за инфекционными заболеваниями, внедрен в Республике Беларусь с октября 2012 г. и основан на лабораторном обследовании каждого подозрительного на менингит случая инфекции у госпитализированных детей до 5 лет. Среди 165 случаев, подозрительных на бактериальный менингит, выявленных в 2013–2014 гг., 65 (39,4%) были отнесены к вероятному случаю бактериального менингита. Лабораторно подтвержденный бактериальный менингит был выявлен в 21,8% случаях, среди них *Neisseria meningitidis* являлся возбудителем в 44,4% случаях, *Streptococcus pneumoniae* — в 36,1% случаев, *Haemophilus influenzae* — в 19,5% случаях.

**Ключевые слова:** дозорный эпидемиологический надзор, бактериальный менингит, инвазивные бактериальные заболевания, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*.

**Введение.** Менингиты бактериальной этиологии являются одними из самых опасных заболеваний детского возраста и ассоциированы с летальностью и тяжелыми осложнениями, характеризующимися длительными (иногда постоянными) проявлениями. Несмотря на появление новых антибактериальных лекарственных средств, летальность от бактериальных менингитов остается высокой и варьирует в пределах от 2 до 30%. У 10–20% перенесших заболевание лиц в результате поражения ЦНС возникают осложнения, такие как эпилепсия, задержка умственного развития или сенсорная глухота [1–3].

Наиболее частыми этиологическими агентами бактериальных менингитов являются *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) и *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), вызывающими около 90% всех случаев бактериальных менингитов у детей в возрасте старше 1 мес. [3–5].

Наибольшую озабоченность в мире вызывают менингококковые менингиты из-за эпидемий, создающих сложные ситуации не только для стран (территорий), пораженных эпидемическим менингитом, но и для соседних стран. С 40-х гг. XX в. и до настоящего времени эпидемии менингита в Африке по своему размаху представляют исключительное явление, не описанное ранее в каких-либо других странах. Эта зона высокой заболеваемости, относящаяся к субэкваториальному поясу и расположенная между Сахарой с севера и экваториальным лесом с юга, в 1963 г. исследователем L. Lapeyssonnie названа «менингитным поясом» [6]. Эпидемии менингококкового менингита встречаются не только на африканском континенте. Известны крупные вспышки и эпидемии в СССР, Бразилии, на Кубе, в Иране, Ираке, Непале, Китае, Индии, Монголии, Саудовской Аравии, в европейских странах (Англия, Норвегия), в Новой Зеландии. Показатель заболеваемости в межэпидемический период в развитых странах составляет от 1 до 10 на 100 тыс. населения, в то время как в развивающихся странах — 20 на 100 тыс. населения. Уровень заболеваемости в период эпидемий характеризуется показателями от 500 на 100 тыс. населения и выше.

Менингиты пневмококковой и гемофильной этиологии распространены в мире повсеместно. Уровень заболеваемости менингитом, вызванным *H. influenzae*, в странах Западной Европы составляет 1–3 случая на 100 тыс. населения. Свыше 90% случаев заболевания регистрируется среди детей до 5 лет с пиками заболеваемости в странах умеренного климата осенью и весной. Показатели заболеваемости пневмококковым менингитом в развитых странах составляют 1–2 случая на 100 тыс. населения, в развивающихся — 10–20 на 100 тыс. населения. В регионах умеренного климата заболеваемость повышается в холодное время года [7–9].

Первое исследование по изучению этиологической структуры бактериальных менингитов у детей до 5 лет в Республике Беларусь было выполнено в период с 1996 г. по 2002 г. на базе Городской детской инфекционной клинической больницы г. Минска. Из 45 бактериологически подтвержденных случаев бактериального менингита 28 были вызваны менингококком (62,2%), 9 — гемофильной палочкой (20,0%) и 8 — пневмококком (17,8%) [10]. С 2006 по 2012 гг. более интенсивно проводился молекулярно-генетический мониторинг за циркуляцией, серо- и генотипами, а также резистентностью изолятов менингококков и гемофильной палочки к антибиотикам [11–13].

Применение конъюгированных вакцин против *H. influenzae* типа *b*, *S. pneumoniae* и *N. meningitidis* в течение последних 20 лет в странах с развитой экономикой изменили эпидемиологию бактериальных менингитов, снизив на 90–98% заболеваемость и смертность в странах, внедривших плановую вакцинацию [8, 9].

В Республике Беларусь вакцинация против пневмококковой и гемофильной инфекций включена в Национальный календарь профилактических прививок с 2013 г. и проводится детям, имеющим одно из следующих заболеваний или состояний: хронический гепатит, цирроз печени, хронические заболевания почек, сердца и легких, иммунодефицитные состояния, муковисцидоз. В г. Минске плановая вакцинация против гемофильной инфекции внедрена в 2009 г. и иммунизации подлежат все дети, достигшие возраста 3 мес. Профилактические прививки против гемофильной инфекции в г. Минске позволило снизить заболеваемость Hib-менингитами в течение 2009–2011 гг. в 3,34 раза среди детей в возрасте до 5 лет по сравнению с довакцинальным периодом (2002–2008 гг.) [14, 15].

Опыт стран с активной позицией специфической иммунопрофилактики инвазивных бактериальных заболеваний указывает на важность и необходимость организации системы эпидемиологического мониторинга, основанного на данных лабораторной диагностики. С целью оценки бремени заболеваний, вызываемых *H. influenzae*, *S. pneumoniae* и *N. meningitidis*, для принятия решений по тактике вакцинации в сентябре 2012 г. в Республике Беларусь была внедрена система дозорного эпидемиологического надзора за бактериальными менингитами. Дозорными организациями здравоохранения являлись УЗ «Детская инфекционная клиническая больница» г. Минска (ГДИКБ), УЗ «3-я детская клиническая больница» г. Минска (3 ДКБ) и УЗ «Гродненская областная инфекционная киническая больница» (ГОИКБ). Микробиологические исследования проводились в ГДИКБ и ГОИКБ, а также ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии» и ГУ «Республиканский научно-

практический центр эпидемиологии и микробиологии», на базе которого была создана Республиканская референс-лаборатория по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний.

Все получаемые в рамках исследования сведения направлялись в Европейскую базу данных по инвазивным бактериальным заболеваниям, в которой аккумулируются данные о проведении дозорного эпидемиологического надзора во всех странах региона, а затем используются для сравнительного анализа по странам.

**Цель** исследования — анализ результатов дозорного эпидемиологического надзора за случаями бактериального менингита среди госпитализированных детей до 5 лет в 2013–2014 гг.

**Материалы и методы.** В систему дозорного эпидемиологического надзора были включены лица младше 5 лет (дети в возрасте до 59 мес. и 29 дней), госпитализированные в дозорные организации здравоохранения с подозрением бактериального менингита.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ подозрительным на бактериальный менингит является любой случай заболевания с внезапным повышением температуры тела и появлением одного из следующих симптомов: ригидность затылочных мышц, выбухание родничка (у детей в возрасте до 12 мес.), измененный/сниженный уровень сознания, судороги, сниженный сосательный рефлекс и раздражительность, прострация или летаргия, петехиальная/геморрагическая сыпь, рвота.

К вероятному случаю бактериального менингита относили случай, подозрительный на бактериальный менингит, при котором по результатам исследования СМЖ выявлен по крайней мере один из следующих признаков: мутность или непрозрачность; лейкоцитоз (более 100 клеток/мм$^3$); лейкоцитоз (10–99 клеток/мм$^3$) с одновременно повышенным содержанием белка (более 100 мг/дл) или пониженным содержанием глюкозы (менее 40 мг/дл).

Подтвержденным случаем бактериального менингита является подозрительный или вероятный случай, подтвержденный выделением возбудителя (*H. influenzae*, *S. pneumoniae* и *N. meningitidis*) из СМЖ или крови бактериологическим (культуральным) методом, выявлением в них ДНК возбудителя методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), обнаружением бактериального антигена в СМЖ в реакции латекс-агглютинации или с использованием иммунохроматографии.

Клинико-биохимические исследования образцов проводились в лабораториях всех ДОЗ, культуральные исследования выполнялись в ГДИКБ и ГОИКБ. Выявление ДНК возбудителя методом ПЦР-РВ осуществлялось в ГДИКБ и ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии» с использованием коммерческих мультиплексных наборов «АмплиСенс N.meningitidis/H. influenzae/ S.pneumoniae-FL» (Амплисенс, РФ). Выделение ДНК из образцов биологического материала осуществлялось сорбентным методом с применением коммерческих наборов «ДНК-Сорб-Б» (Амплисенс, РФ). Выявление пневмококкового антигена в СМЖ проводили в ДОЗ иммунохроматографическим экспресс-тестом BinaxNOW (Alere, США), а также с использованием наборов для латекс-агглютинации Pastorex Meningitis (Bio-Rad, США).

Выделенные в ходе исследования культуры бактерий, а также образцы биологического материала от пациентов направлялись в Республиканскую референс-лабораторию по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний. Изоляты бактерий и образцы биологического материала подвергались ретестированию и молекулярно-генетическому типированию. Первично отрицательные образцы направлялись в Региональную референс-лабораторию Европейского регионального бюро Всемирной организации здравоохранения по инвазивным бактериальным заболеваниям, управляемым вакцинацией (г. Москва, РФ, НИИ им. Габричевского), для выполнения контрольных исследований.

Исследования в Национальной референс-лаборатории выполнялись в соответствии с руководством по диагностике менингитов, разработанным ВОЗ совместно с Центром по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) [16]. Экстракцию ДНК из биологического материала проводили сорбентным методом с применением коммерческих центрифужных колонок с фильтром из силики (диоксид кремния). Для детекции менингококков использовался ген супероксиддисмутазы *Cu/Zn* (*sodC*), выявляющий как капсулированные, так и негруппируемые менингококки. Детекцию ДНК пневмококка проводили по гену аутолизина (*lytA*), детекцию ДНК капсульных и бескапсульных вариантов *H. influenzae* проводили по гену липопротеина D наружной мембраны (*hpd*). Для контроля выделения ДНК из образцов биологического материала, контроля деградации ДНК и присутствия

ингибиторов ПЦР использовали специфическую реакцию ПЦР-РВ на ДНК человека, детектирующую фермент *РНКаза Р*.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Statistica 10, Microsoft Excel. Применялись методы непараметрической статистики для анализа категориальных данных (проверка статистических гипотез о равенстве относительных частот для бинарных признаков) и сравнения количественных признаков (критерий Манна–Уитни). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p<0,05$.

**Результаты и их обсуждение.** За 2013–2014 гг. в дозорных организациях здравоохранения выявлено 165 подозрительных на бактериальный менингит случаев среди детей до 5 лет. Среди них 106 (64,2%) были зарегистрированы в 2013 г. и 59 (35,8%) — в 2014 г. Подозрительные на бактериальный менингит случаи регистрировались во всех дозорных организациях здравоохранения (таблица 1): ГДИКБ — 81 случай (49,1%), 3 ДКБ — 10 (6,1%) и ГОИКБ — 74 (44,8%).

Таблица 1. — Классификация случаев бактериального менингита, выявленных в дозорных организациях здравоохранения в 2013–2014 гг.

| Дозорная точка | Подозрительный | | | Вероятный | | | Лабораторно подтвержденный | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | всего | 2013 | 2014 | всего | 2013 | 2014 | всего | 2013 | 2014 |
| ГОИКБ | 74 | 45 | 29 | 21 | 11 | 10 | 15 | 11 | 4 |
| 3 ДКБ | 10 | 7 | 3 | 7 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| ГДИКБ | 81 | 54 | 27 | 37 | 19 | 18 | 21 | 11 | 10 |
| Итого | 165 | 106 | 59 | 65 | 35 | 30 | 36 | 22 | 14 |

Пациенты с подозрением бактериального менингита госпитализировались ежемесячно в течение всего анализируемого периода (в среднем 6,9 случая в месяц). Месяцами максимального количества госпитализаций являлись: январь (среднее количество случаев за 2 года — 12,0), октябрь — 11,0 случая и февраль — 10,5 случая. В июне было зарегистрировано наименьшее среднее количество случаев с подозрением бактериального менингита — 3,0 случая (рисунок 1).

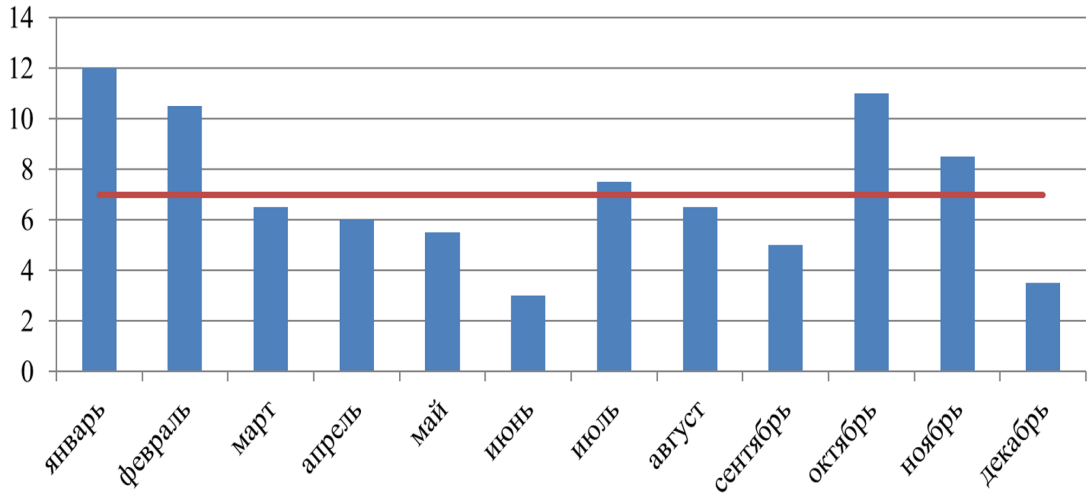



**Рисунок 1. — Годовая динамика случаев, подозрительных на бактериальный менингит, выявленных в рамках дозорного эпидемиологического надзора в 2013–2014 гг.**

По результатам клинико-биохимических исследований СМЖ 65 случаев из 165 подозрительных (39,4%) были отнесены к категории «вероятный случай бактериального менингита». Данный показатель в отдельных дозорных организациях здравоохранения составил: 28,4% в ГОИКБ (21 из 74 подозрительных случаев), 70% — в 3 ДКБ (7 из 10 подозрительных случаев) и 45,7% — в ГДИКБ

(37 из 81 подозрительного случая). Среди общего числа вероятных случаев бактериального менингита 32,3% (21/65 случаев) было зарегистрировано в ГОИКБ, 10,8% (7/65 случаев) — в 3 ДКБ, 56,9% (37/65 случаев) — в ГДИКБ.

Лабораторно подтвержденные случаи бактериального менингита, вызванные *H. influenzae*, *S. pneumoniae* и *N. meningitidis*, были выявлены в 21,8% (36/165) подозрительных случаев. Данный показатель в отдельных дозорных организациях здравоохранения составил: 20,3% в ГОИКБ (15 из 74 подозрительных случаев) и 25,9% — в ГДИКБ (21 из 81 подозрительного случая). В 3 ДКБ лабораторно подтвержденных случаев бактериального менингита, вызванного *H. influenzae*, *S. pneumoniae* и *N. meningitidis*, зарегистрировано не было. Среди общего числа лабораторно подтвержденных случаев бактериального менингита 41,7% (15/36 случаев) было зарегистрировано в ГОИКБ и 58,3% (21/36 случаев) — в ГДИКБ.

Этиологическим агентом менингитов среди 36 случаев инфекции в 16 случаях (44,4%) являлся *N. meningitidis*, в 13 (36,1%) — *S. pneumoniae*, в 7 (19,5%) — *H. influenzae* (таблица 2). Все дети, у которых был подтвержден бактериальный менингит, не были привиты против данных инфекций.

Таблица 2. — Лабораторно подтвержденные случаи бактериального менингита, выявленные в дозорных организациях здравоохранения в 2013–2014 гг.

| Дозорная организация | Всего случаев | *N. meningitidis* | *S. pneumoniae* | *H. influenzae* |
|---|---|---|---|---|
| ГОИКБ | 15 | 8 | 3 | 4 |
| ГДИКБ | 21 | 8 | 10 | 3 |
| Итого | 36 | 16 | 13 | 7 |

При анализе годовой динамики установлено, что случаи лабораторно подтвержденного бактериального менингита регистрировались ежемесячно — от 1 до 5 случаев в месяц, за исключением августа (рисунок 2).

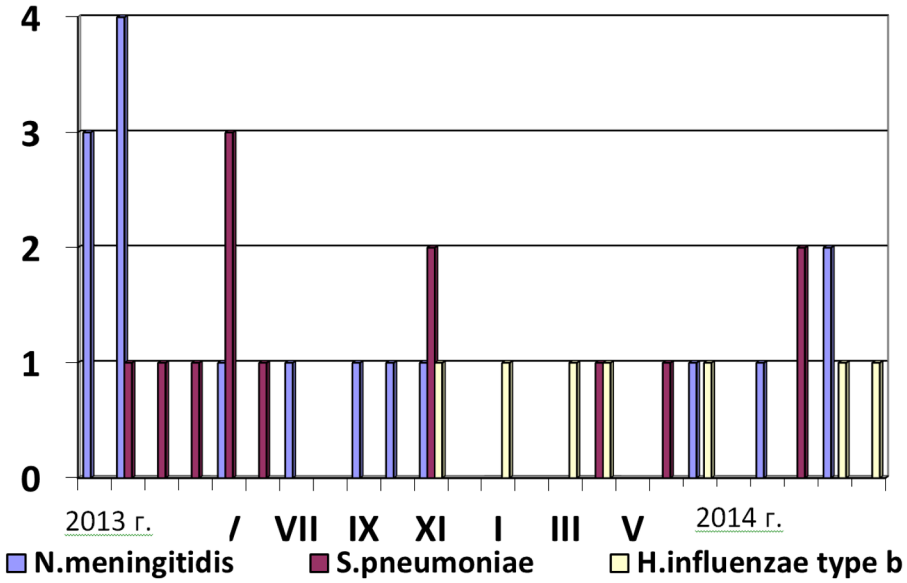



**Рисунок 2. — Сезонное распределение лабораторно подтвержденных случаев бактериального менингита, выявленных среди госпитализированных детей до 5 лет в рамках дозорного эпидемиологического надзора**

Несмотря на то, что бактериологический метод является золотым стандартом диагностики бактериального менингита, уровень положительных результатов культурального исследования относительно низок и составил в данном исследовании 4,8% (7/145) при посевах крови и 7,4% (12/162) при посевах СМЖ, полученных от пациентов с подозрительными случаями бактериального менин-

гита. Доля положительных результатов при исследовании образцов от пациентов с вероятными случаями бактериального менингита ожидаемо являлась достоверно более высокой и составила 11,3% (7/62) при культуральном исследовании крови (p = 0,0449) и 18,8% (12/64) при исследовании СМЖ (p = 0,0063).

Невысокая результативность культурального метода, прежде всего, обусловлена биологическими свойствами трудно культивируемых возбудителей, а также на нее может влиять предшествующее забору биологического материала применение антибактериальных лекарственных средств. Среди пациентов с подозрением бактериального менингита 17,6% (29 из 165) в течение 48 ч до забора крови и СМЖ принимали антибиотики. Традиционно более высокой чувствительностью в этом отношении обладает метод ПЦР-РВ. ДНК возбудителя с применением данного метода была выявлена в 17,0% (19/112) образцах крови и в 17,2% (27/157) образцах СМЖ при обследовании пациентов с подозрительными случаями и в 21,7% (10/46) и 35,9% (23/64) при обследовании пациентов с вероятными случаями бактериального менингита. Таким образом, в данном исследовании выявляемость возбудителей молекулярным методом достоверно выше выявляемости культуральным методом среди пациентов с подозрительными случаями бактериального менингита как при исследовании крови (p = 0,001), так и СМЖ (p = 0,0038). У пациентов с вероятными случаями бактериального менингита выявляемость молекулярным методом достоверно выше таковой для культурального метода при исследовании образцов СМЖ (p = 0,0146) и статистически не отличается при исследовании образцов крови (p = 0,0702).

За время исследования всего в Республиканскую референс-лабораторию по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний поступило 7 культур микроорганизмов, все из которых были выделены из СМЖ пациентов с менингитом. Культуры были реидентифицированы и отнесены к следующим видам бактерий: *S. pneumoniae* (2 культуры), *N. meningitidis* (2 культуры), *H. influenzae* (2 культуры) и *S. aureus* (1 культура). Штаммы пневмококка были отнесены к 14-му и 19F серотипам, штаммы менингококка — к серогруппам B и C. Оба штамма гемофильной палочки относились к серотипу *b*. Из поступивших 27 образцов биологического материала, в которых при первичном исследовании методом ПЦР-РВ в ГДИКБ и ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии» была обнаружена ДНК возбудителей инвазивных бактериальных заболеваний, 17 образцов (63,0%) являлись СМЖ, а 10 образцов (37,0%) — плазмой крови. В 12 из 27 образцов (44,4%) первично была обнаружена ДНК гемофильной палочки, в 8 (29,6%) — ДНК пневмококка и в 7 (25,9%) — ДНК менингококка. При выполнении повторных контрольных исследований на предмет наличия генетических маркеров возбудителей ИБЗ было установлено, что 20 из 27 образцов (74,1%) содержат ДНК возбудителей ИБЗ, а именно: 11 образцов — ДНК *H. influenzae*, 5 образцов — ДНК *S. pneumoniae*, 4 образца — ДНК *N. meningitidis*.

В связи с этим при проведении дозорного эпидемиологического надзора и молекулярно-генетического мониторинга за возбудителями ИБЗ ключевое значение может иметь соблюдение требований к условиям, срокам хранения и транспортировки образцов биологического материала именно в случае молекулярных исследований (не только при культуральном методе исследования). Помимо этого, очевидно, что в будущем при проведении надзора роль Республиканской референс-лаборатории по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний должна включать как организационно-методическую функцию, так и лабораторно-диагностическую.

При изучении данных о результатах микро-, макроскопии и биохимического исследования образцов СМЖ, полученных от пациентов с подозрением ИБЗ, было установлено, что для 158 случаев были получены данные о внешнем виде, цитозе, содержании белка и глюкозы. Показатель цитоза варьировал в пределах от 0 до 20300 кл/мм$^3$ с медианой 10 кл/мм$^3$ и межквартильным интервалом 2–101 кл/мм$^3$; уровень глюкозы находился в пределах от 0 до 85 мг/дл с медианой 9,5 мг/дл и межквартильным интервалом 4-53 мг/дл; содержание белка — от 0 до 600 мг/дл с медианой 5,5 мг/дл и межквартильным интервалом 0–33 мг/дл.

Среди описанных 158 случаев после лабораторных исследований 39 (24,7%) были классифицированы как подтвержденные случаи бактериального менингита. Показатель цитоза СМЖ в данной группе пациентов варьировал в пределах от 1 до 20300 кл/мм$^3$ с медианой 712 кл/мм$^3$ и межквартильным интервалом 21–3797 кл/мм$^3$. В 24 из 39 данных случаев (61,5%) показатель цитоза превышал пороговое значение для определения вероятного случая бактериального менингита (100 кл/мм$^3$).

Дополнительно 8 из 39 случаев (20,5%) также попадали под определение вероятного случая бактериального менингита, т. к. показатель цитоза находился в пределах 10–99 кл/мм$^3$ и уровень глюкозы составлял менее 40 мг/дл. Таким образом, 32 из 39 случаев (82,1%) подтвержденного бактериального менингита на этапе выполнения спинномозговой пункции и микроскопического, биохимического исследования СМЖ попадали под определение вероятного случая бактериального менингита, остальные 7 из 39 случаев (17,9%) — только под определение подозрительного случая.

Показатель цитоза СМЖ во второй группе, состоящей из 119 пациентов, у которых не подтвердилась бактериальная этиология менингита, варьировал в пределах от 0 до 4992 кл/мм$^3$ с медианой 4 кл/мм$^3$ и межквартильным интервалом 2–29 кл/мм$^3$ и достоверно отличался от соответствующего показателя в группе пациентов с подтвержденным бактериальным менингитом ($p<0,001$). С учетом показателя цитоза, уровней содержания глюкозы и белка в СМЖ только 37 из 119 данных случаев (31,1%) попадали под определение вероятного случая бактериального менингита на этапе микроскопического, биохимического исследования СМЖ, что достоверно ниже данного показателя в группе пациентов с подтвержденным менингитом ($p<0,001$).

В связи с этим с целью оптимизации молекулярно-генетического мониторинга за возбудителями инвазивных бактериальных заболеваний в Республике Беларусь считаем целесообразным распространить на все учреждения здравоохранения страны алгоритм и критерии определения подозрительного, вероятного и подтвержденного случаев бактериального менингита, используемые при дозорном эпидемиологическом надзоре. Помимо этого необходимо наладить немедленное (быстрое) поступление из всех учреждений здравоохранения страны в Республиканскую референс-лабораторию по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний: а) СМЖ от пациентов с вероятными и подтвержденными случаями бактериального менингита; б) плазмы или сыворотки крови от пациентов с подозрительными случаями бактериального менингита (в случае наличия противопоказаний для выполнения люмбальной пункции); в) плазмы крови от пациентов с подозрением прочих ИБЗ (бактериемия, сепсис и др.). Следует отметить, что исключение из молекулярно-генетических исследований образцов СМЖ от пациентов с подозрительными случаями бактериального менингита целесообразно только для целей осуществления мониторинга (при ретроспективной постановке диагноза). При клинической лабораторной диагностике образцы СМЖ от пациентов с подозрительными случаями бактериального менингита в обязательном порядке должны подлежать молекулярно-генетическим исследованиям на наличие возбудителей ИБЗ.

Европейский центр по контролю за заболеваниями осуществляет мониторинг за инвазивными бактериальными заболеваниями, вызванными *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*. Согласно ежегодному эпидемиологическому анализу, случаи инвазивных заболеваний, вызванных *H. influenzae*, в странах Европы редки и составляют 0,49 случая на 100 тыс. населения. Наиболее высокие показатели заболеваемости отмечаются среди детей до года и среди лиц старше 65 лет. Показатели заболеваемости среди лиц мужского пола выше по сравнению с женским полом. В ряде стран севера Европы заболеваемость инвазивными формами инфекции существенно выше среднестатистической. Так, в Швеции она составила 2,26 случая на 100 тыс. населения, Норвегии — 1,56, Финляндии — 1,5, Дании — 1,17, Ирландии — 0,9, Голландии — 0,83. Введение вакцинации снижает заболеваемость инфекцией, обусловленной *H. influenzae* типа *b*, но приводит к возрастанию числа случаев заболеваний, вызываемых бескапсульными вариантами бактерии [17].

Инвазивная менингококковая инфекция в странах Европы также характеризуется низкой частотой, показатель заболеваемости составляет 0,68 случая на 100 тыс. населения, варьируя в пределах от 0,11 до 1,77. В ряде стран заболеваемость данной инфекцией превышает средний ее уровень в Европейском регионе: Литва (1,77 случая на 100 тыс. населения), Ирландия (1,31), Швеция (1,09), Дания (1,0), Великобритания (1,36), Мальта (0,96), Франция (0,84), Австрия (0,67) и Финляндия (0,61). Наиболее высокие показатели заболеваемости отмечаются в группе детей до года, а также в группе лиц 15–24 лет. В популяции менингококка доминируют возбудители, принадлежащие к серогруппам B и C, а в группе пациентов старше 65 лет — к серогруппам B и Y. Летальность составляет от 8 до 15%, а у 20% перенесших инфекцию лиц развиваются серьезные осложнения [17].

Инвазивная пневмококковая инфекция в Европе встречается значительно чаще — 4,28 случая на 100 тыс. населения. Наиболее высокая частота заболеваемости отмечается среди населения северных стран региона — Дании (15,81), Швеции (14,63), Финляндии (13,92), Норвегии (12,56),

Ирландии (7,64). У детей, пожилых лиц старше 65 лет и лиц мужского пола инфекция встречается чаще. Из более чем 90 серотипов возбудителя инфекции доминируют около десяти — 3, 7F, 19A, 1, 8, 22F, 14, 12F, 6C и 15A. Они вызывают около 60% случаев заболеваний [15].

**Заключение.** Как свидетельствуют полученные нами результаты дозорного эпидемиологического надзора среди детей до 5 лет, госпитализированных с подозрением бактериального менингита, в каждом пятом случае заболевание вызвано одним из трех возбудителей *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, поэтому внедрение вакцинации против инвазивных бактериальных заболеваний остается приоритетом в предотвращении случаев бактериального менингита у детей в Республике Беларусь.

**Литература**


1.The epidemiology of bacterial meningitis in Kosovo / S.A. Namani [et al] // J. Infect. Dev. Ctries. — 2014. — Vol. 8, № 7. — P. 823–830.

2.Twelve year outcomes following bacterial meningitis: futher evidence for persisting effects / K. Grimwood [et al.] // Arch. Dis. Child. — 2000. — Vol. 83. — P. 111–116.

3.Титов, Л.П. Менингококковая инфекция: современное состояние проблемы / Л.П. Титов // Здравоохранение. — 2010. — № 12. — С. 15–23.

4.Chávez-Bueno, S. Bacterial meningitis in children / S. Chávez-Bueno, G.H. McCracken // Pediatr. Clin. North Am. — 2005. — Vol. 52. — P. 795–810.

5.Saez-Llorens, X. Bacterial meningitis in children / X. Saez-Llorens, G.H. McCracken // Lancet. — 2003. — Vol. 361. — P. 2139–2148.

6.. Lapeyssonnie, L. Cerebrospinal meningitis in Africa / L. Lapeyssonnie // Bull World Health Organ. — 1963. — Vol. 28 (suppl.). — P. 1–114.

7. Девяткина, Н.П. Менингококковая инфекция / Н.П. Девяткина // Эпидемический процесс как социально-экологическая система. — М., 1986. — С. 88–94.

8.Brouwer, M.C. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis / M.C. Brouwer, A.R. Tunkel, D. van de Beek // Clin. Microbiol. Rev. — 2010. — Vol. 23, № 3. — P. 467–492.

9.Prasad, K. Prevention of bacterial meningitis: An overview of Cochrane systematic reviews / K. Prasad, N. Karlupia // Respirat. Med. — 2007. — Vol. 101. — P. 2037–2043.

10. Ethiology of bacterial meningitidis in children under 5 years in Minsk / O.M. Morozova [et al.] // 1st FEMS Congr. Eur. Microbiol., Ljubljana, Cankarjev Dom, Slovenia, 29 June – 3 July, 2003: abstr.— Lubljana, 2003. — P. 251–252.

11. Глазкова, С.Э. Чувствительность штаммов *Neisseria meningitidis* к антибиотикам / С.Э. Глазкова, Ф.А. Лебедев, Л.П. Титов // Здравоохранение. — 2011. — № 10. — С. 26–30.

12. Молекулярно-генетический мониторинг *Neisseria meningitidis* на территории Республики Беларусь (2006–2010 гг.) / С.Э. Глазкова [и др.] // Здравоохранение. — 2011. — № 11. — С. 10–14.

13. Evolutionary epidemiology of *Neisseria meningitides* strains in Belarus compared to other European countries / L.P. Titov [et al.] // Acta Microbiol. Immunol. Hungarica. — 2013. — Vol. 60, № 4. — P. 397–410.

14. Молекулярно-генетическая индикация изолятов *Haemophilus influenzae* типа *B* и определение их чувствительности к бета-лактамным антибиотикам / Е. С. Носова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2014. — Вып. 7. — С. 300–304.

15. Эффективность вакцинации против Hib-инфекции в Минске / И.Н. Глинская [и др.] // Здравоохранение. — 2013. — № 3. — С. 17–20.

16. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenza*: WHO manual / World Health Organization. — 2nd ed. — WHO/IVB/11.09. — Geneva: WHO Press, 2011. — 311 p.

17. ECDC surveillance report. Annual epidemiological report. Vaccine-preventable diseases — invasive bacterial diseases. — Stockholm, 2015. — 33 p.

## SENTINEL SURVEILLANCE OF BACTERIAL MENINGITIS IN THE REPUBLIC OF BELARUS (2013–2014)

*Shimanovich V.P.[1], Titov L P.[1], Davydov A.V.[1], [4], Glinskaya I.N.[2], Levshina N.N.[2], Boyko T.V.[2], Miklash L.V.[3], Klyuyko N.L.[5], Kuzmich I.A.[6]*

*[1]State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;*
*[2]State Institution "Municipal Center for Hygiene and Epidemiology", Minsk, Republic of Belarus;*
*[3]State Institution "Grodno Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health", Grodno, Republic of Belarus;*
*[4]Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus;*
*[5]Healthcare Institution "Infectious Clinical Children's Hospital", Minsk, Republic of Belarus;*
*[6]Healthcare Institution "Grodno Regional Infectious Diseases Clinical Hospital", Grodno, Republic of Belarus*

Invasive bacterial diseases are an actual problem of healthcare and it requires constant attention. Sentinel surveillance for bacterial meningitis is an important element in improving the national surveillance system for communicable diseases implemented in Belarus since October 2012 and is based on laboratory testing of every suspected case of meningitis in hospitalized children under 5 years. Among the 165 cases of suspected bacterial meningitis identified for the 2013–2014 biennium period 65 (39.4%) were classified as probable cases of bacterial meningitis. Laboratory confirmation of bacterial meningitis was identified in 21.8% of cases, including *Neisseria meningitidis* as the causative agent in 44.4% of cases, *S. pneumoniae* — in 36.1% of cases, *H. influenzae* — in 19.5% of cases.

**Keywords:** sentinel surveillance, bacterial meningitis, invasive bacterial diseases, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*.

Поступила 30.09.2015

## ОТНОШЕНИЕ НАСЕЛЕНИЯ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ К ВАКЦИНАЦИИ

*Карпович С.С., Леонард Н.В., Колисниченко Е.В., Садовникова Г.В.*

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

**Реферат.** Мотивация родителей к вакцинации ребенка зависит от взвешенной и достоверной информации, как о каждой прививке, так и о вакцинопрофилактике в целом. В этой связи специалистами санитарно-эпидемиологической службы Брестской области было проведено анкетирование двух групп населения: взрослого населения (685 человек) и учащихся среднеобразовательных учреждений (637 человек) с целью изучения уровня знаний о профилактических прививках и отношения населения к проводимой вакцинации. Имелось два варианта анкет — для каждой опрашиваемой группы.

**Ключевые слова:** анкетирование, вакцинопрофилактика, прививка, вакциноуправляемые инфекции, дети.

**Введение.** Внедрение массовых программ вакцинопрофилактики в практику здравоохранения разделило во времени эпоху инфекционных заболеваний на до- и поствакцинальную эру. На сегодняшний день очевидно — не существует более эффективных профилактических программ в медицине, чем вакцинопрофилактика: каждый рубль, вложенный в эту область медицины, оборачивается сбереженными финансовыми ресурсами, сохраненными годами полноценной жизни и сэкономленными средствами в здравоохранении. К сожалению, в современном мире вокруг вакцинопрофилактики существует множество мифов, которые мешают осуществлять защиту нации от инфекционной заболеваемости в полной мере и должны быть развеяны прогрессивной медицинской общественностью [1]. Некоторые исследования показывают, что до сих пор в обществе остается настороженное отношение к вакцинопрофилактике, зачастую отказы родителей от прививки обусловлены недоверием, отсутствием информации о важности вакцинации [2]. Воздействуя через средства массовой информации на взрослое население, усиливая разъяснительную работу медицинской службы можно достичь более полного охвата детей вакцинацией [3].

**Цель** исследования — определение уровня знаний о профилактических прививках для возможности дальнейшей разработки областного плана мероприятий по информационно-образовательной работе с населением по формированию позитивного отношения к вакцинопрофилактике.

**Материалы и методы.** В рамках социологического исследования по определению уровня осведомленности населения в области вакцинопрофилактики методом анкетирования путем случайной выборки опрошены две группы населения: взрослые (685 человек) и дети — учащиеся среднеобразовательных учреждений (637 человек), проживающие в Брестской области. Анкеты для взрослых состояли из 14 вопросов и включали в себя общую часть (возраст, образование, место жительства, количество детей) и специальную, выясняющую отношение респондентов к вакцинопрофилактике, а также качество проведения прививок в регионах их проживания. В состав анкет для детей входило 11 вопросов, направленных на изучение осведомленности подростков 11–17 лет по вопросам вакцинопрофилактики.

**Результаты и их обсуждение.** В Республике Беларусь вакцинопрофилактика является инструментом государственной политики, направленной на укрепление здоровья населения. За 2014 г. на территории области охвачено профилактическими прививками в соответствии с Национальным календарем от 97 до 99% населения. Однако за этот период отмечено увеличение числа отказов от прививок. Так, суммарное количество лиц, отказавшихся от прививок, составило 5399 человек (0,4% от общего количества населения). Основные причины отказов от прививок: личные убеждения (38,8%), религиозные убеждения (28,6%), страх развития осложнений (11,7%), неуверенность в эффективности (10%), из-за негативной информации, полученной в СМИ, интернет (6,6%), желание дать возможность ребенку самому решать вопрос о необходимости вакцинации в будущем (0,1%) (рисунок 1).

**Рисунок 1. — Структура причин отказов от вакцинации**

**Анализ опроса взрослого населения**

***Портрет респондента.*** Женщина 30–40 лет (51%), имеет среднеспециальное образование (51,5%), проживает в городской местности (69,2%), воспитывает двоих детей (52%) в возрасте 4–7 лет (47,4%), которая ведет активный образ жизни.

Подавляющее большинство (90,8%) родителей положительно относятся к вакцинации и регулярно делают прививки своему ребенку.

77,9% респондентов проводят только обязательные прививки своим детям, при этом доля лиц, которые не следят за тем, какие прививки проводятся, составила 10,2%.

Из предложенного списка дополнительных прививок, не включенных в Национальный календарь, подавляющее большинство (71,9%) человек выбрали вариант «прививки против гриппа» (рисунок 2).

Только 50,1% опрошенных прививают детей против гриппа ежегодно, т. к. считают, что это опасная инфекция, 27% опрошенных прививают своего ребенка от гриппа неежегодно, 22,9% не считают нужным прививать своего ребенка от гриппа.

На вопрос «Если бы Вы знали о возможности дополнительной вакцинации, то от каких инфекций привили бы ребенка?» большая часть (34,8%) ответила против менингококковой инфекции,

18,3% — от клещевого энцефалита (Брестский, Жабинковский, Ивановский, Каменецкий, Кобринский, Ляховичский, Пинский, Пружанский районы); 14,4% — от ветряной оспы, 13% — от пневмококковой инфекции; 2% опрошенных выбрали пункт «другие» и указали прививку против вируса папилломы человека.

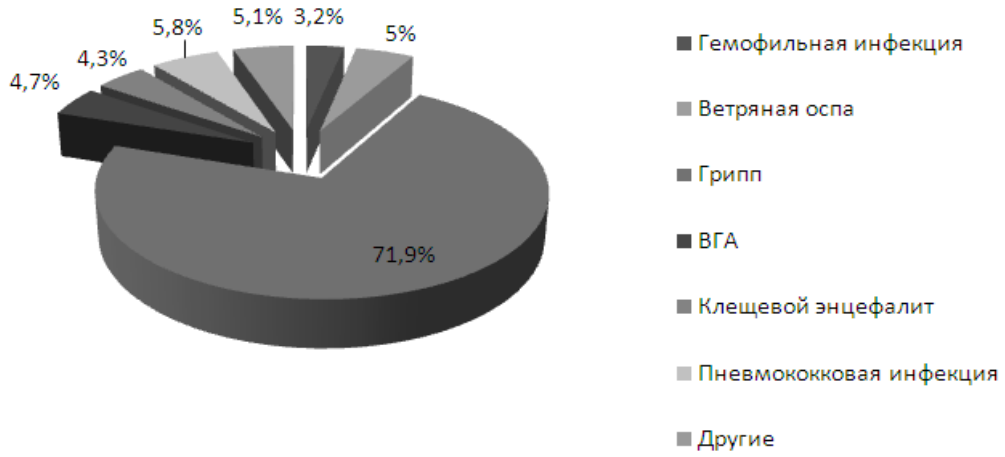



**Рисунок 2. — Инфекция, против которой детям проводят дополнительную прививку, не включенную в Национальный календарь**

При анализе анкет установлена высокая осведомленность населения о встречаемых инфекционных болезнях в регионе их проживания (67,5% опрошенных), 26,9% респондентов не осведомлены, но хотели бы узнать, и только 5,6% опрошенных считают, что им это не нужно.

Часть вопросов была направлена на изучение качества вакцинопрофилактики медицинскими работниками в районах Брестской области.

В 96,7% случаев врачи спрашивают родителей о согласии на прививку, при этом 69,5% опрошенных родителей отмечают, что врач рассказывает о заболевании, от которого ребенок прививается, и о самой прививке.

После прививки в 52,1% случаев медицинский работник приходит на дом через несколько дней в целях наблюдения за ребенком, в 39% случаев медицинский работник звонит по телефону, 4,9% опрошенных ответили, что не знают, что ребенка после прививки надо наблюдать, 4% опрошенных «приходят сами/наблюдают сами»; 35% опрошенных родителей получают информацию о прививках от медицинских работников, 20,2% — из интернета, 13,2% — из телепередач, 10,2% — из газет (рисунок 3).

И в заключительном вопросе 63% родителей ответили, что хотели бы узнать о прививках больше, 37% считают, что это им не нужно.

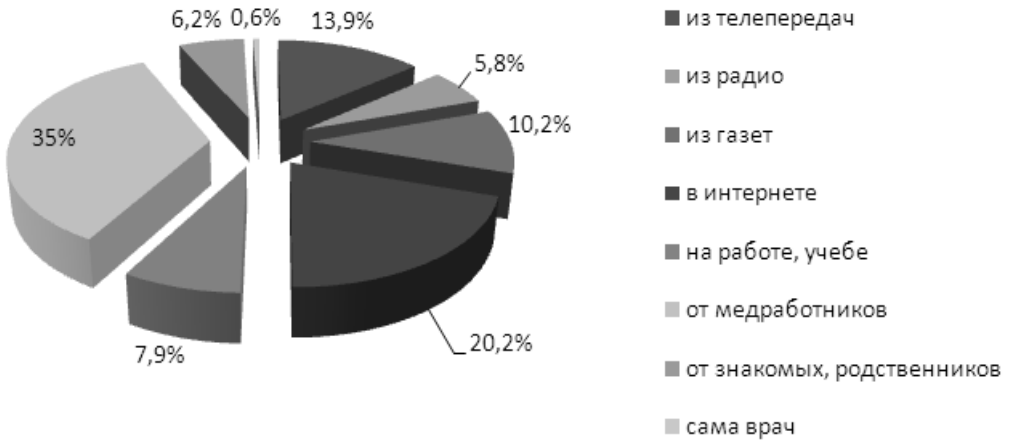



**Рисунок 3. — Источники получения информации о прививках по результатам опроса родителей**

**Анализ опроса детского населения**

***Портрет респондента.*** Большую часть опрошенных (25,3%) составляли дети 15 лет, проживающие в городской местности (65,6%) (рисунок 4).

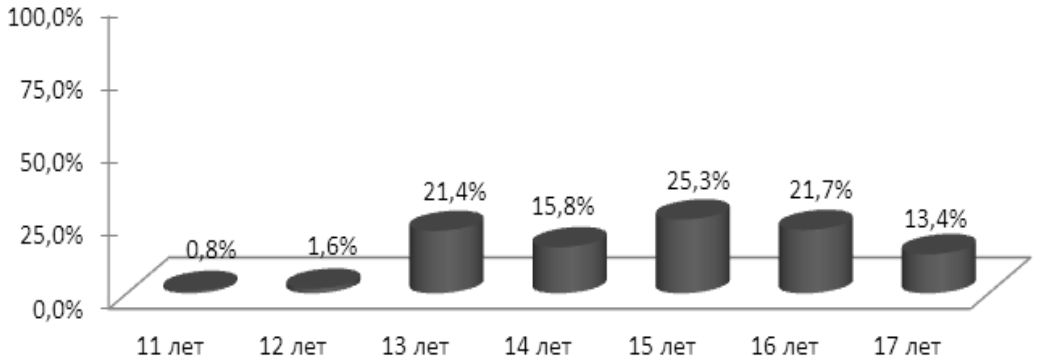



**Рисунок 4. — Распределение опрошенных детей по возрасту**

Подавляющее большинство (96,7%) отвечают утвердительно на вопрос: «Знаешь ли ты, зачем делают прививки?»; 78,8% детей не боятся прививок; 71,1% опрошенных ответили, что им делали все прививки, которые положено, 23,3% не знают, какие прививки им делали, 5% ответили, что родители запрещают делать им прививки.

Подавляющее большинство (90,5%) опрошенных детей считают, что прививки нужны ребенку, чтобы не болеть, по мнению 6,6% детей прививки нужны врачу для выполнения плана, 2,9% детей считают, что прививки никому не нужны.

По мнению большинства (52,7%) опрошенных наиболее объективную информацию о прививке получают от участкового врача, при этом 53,4% доверяют информации, полученной из СМИ (рисунок 5).

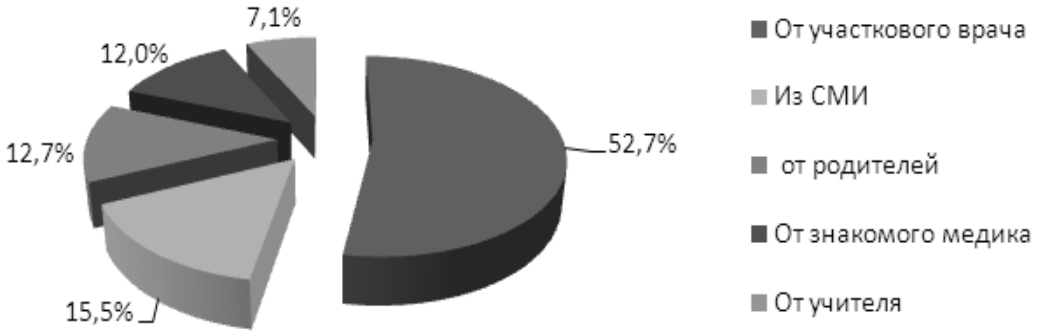



**Рисунок 5. — Источники получения информации о прививках по результатам опроса детей**

На вопрос «От каких инфекций можно себя защитить, сделав прививку?» большинство детей (18,5%) ответили, что от гриппа, 15,1% — от дифтерии, столбняка, 12% — от кори, 11% — от вирусного гепатита *В* (рисунок 6). Этот вопрос проигнорировали 0,2% опрошенных детей.

Детям был задан вопрос «Считаешь ли ты, что необходимо более активное и позитивное освещение вопросов по вакцинопрофилактике инфекционных заболеваний в СМИ?», и 73,5% ответили утвердительно. 87,8% детей считают, что в будущем будут прививаться сами и будут прививать своего ребенка.

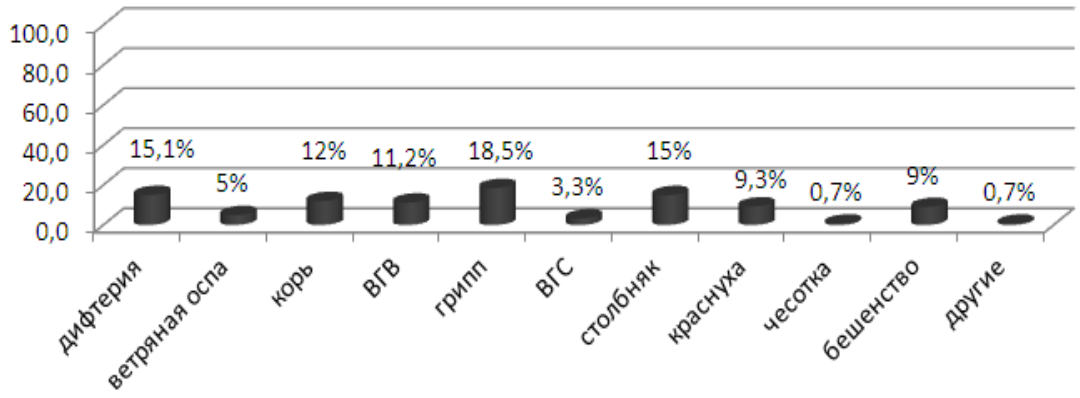



**Рисунок 6. — Осведомленность детей по вопросу инфекций, от которых можно себя защитить, сделав прививку**

**Заключение.** Результаты анкетирования показали, что несмотря на рост отказчиков, на территории Брестской области сохраняется положительное отношение к вакцинопрофилактике.

Населению небезразлично свое состояние здоровья и здоровье своих детей. Большей доли населения важно знать, какие инфекции встречаются в регионах их проживания, а также какие способы предотвращения развития заболеваний существуют.

Большая часть взрослого населения считает, что грипп — это опасная инфекция и ежегодно прививает себя и своих детей.

Среди детского населения отмечается положительное отношение к прививкам, подавляющее большинство считает, что прививки нужны.

Дети настроены на то, что будут прививаться в будущем и будут прививать своих детей.

На данном этапе важную роль в формировании отношения населения (особенно детского) к вакцинопрофилактике играют электронные средства массовой информации (телевидение, интернет), поэтому они должны быть носителями квалифицированной медицинской информации.

**Литература**

1. Баранов, А.А. Научное обоснование вакцинации детей с отклонениями в состоянии здоровья / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, В.К. Таточенко // Педиатр. фармакол. — 2010. — № 2. — С. 6–24.

2. Невинский, А.Б. Профилактика ОРЗ: реалии сегодняшнего дня / А.Б. Невинский, Т.О. Медведева // Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики: материалы IX Общерос. конгр. детских инфекционистов. — М., 2010. — С. 66–67.

3. Левченко, Н.В. Современное отношение родителей к вакцинации против гриппа / Н.В. Левченко, И.К. Богомолова, С.А. Чаванина // Сибир. мед. обозрение. — 2011. — № 6. — С. 59–62.

## ATTITUDE OF THE BREST REGION POPULATION TO BE VACCINATED

*Karpovich S.S., Leonard N.V., Kolisnichenko E.V., Sadovnikova G.V.*

*State Institution "Brest Regional Centre of Hygiene, Epidemiology & Public Health", Brest, Republic of Belarus*

Parents' motivation to child vaccination depends on balanced and reliable information, as each vaccination and vaccine prophylaxis on the whole. In this regard, the specialists of the Brest region sanitary-epidemiological service surveyed two groups: adult population (685 people) and students of secondary educational institutions (637 persons) in order to study the level of knowledge about vaccinations and public attitudes to the ongoing vaccination. There were developed two variants of profiles for each group surveyed.

**Keywords:** survey, vaccination, vaccine-preventable diseases, children.

Поступила 09.09.2015

# ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ JC ВИРУСОВ

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

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

**Реферат.** В статье представлены результаты филогенетического анализа JC вирусов, идентифицированных у белорусских пациентов в 2015 г. Показана принадлежность исследуемых полиомавирусов к субтипу I, в частности к субгруппе Ib-2, которая широко распространена на территории Европы.

**Ключевые слова:** полиомавирус, JC вирус, филогенетический анализ, Республика Беларусь.

**Введение.** JC вирус — один из представителей рода *Poliomavirus*, патогенных для человека. Он широко распространен в человеческой популяции и признан этиологическим агентом прогрессивной мультифокальной лейкоэнцефалопатии (ПМЛ) [1]. Сероэпидемиологические исследования показали, что 70–90% взрослой человеческой популяции имеют антитела к JC вирусу [1]. После первичной инфекции, которая возникает в раннем детском возрасте, он остается в клетках почек и мочевыводящих путей, сохраняясь в них в латентном состоянии. Спорадическая бессимптомная реактивация вируса обнаруживается у 0,5–20% здоровых серопозитивных людей [1]. Тяжелый иммунодефицит обеспечивает подходящие условия для увеличения репликации и распространения JC вируса в ЦНС, где он избирательно разрушает миелин-продуцирующие глиальные клетки — олигодендроциты. Клинические проявления ПМЛ, как правило, включают в себя нарушения двигательной функции, деменцию, визуальные и когнитивные нарушения, а также параличи черепных нервов. Пандемия СПИДа совпала с резким увеличением заболеваемости ПМЛ, т. к. ВИЧ-1-ассоциированная иммуносупрессия является основным заболеванием в 85% случаев ПМЛ [1–6].

Хотя все штаммы JC вируса составляют один серотип, геномный анализ путем секвенирования основного капсидного белка VP1 позволил классифицировать JC вирус на восемь различных генотипов и целый ряд субтипов, имеющих определенные различия в их географическом распространении. Очень близкие друг другу генотипы 1 и 4 распространены среди европейцев и европейских эмигрантов в США. Генотипы 3 и 6 являются африканскими и регистрируются, в частности, в Танзании и Гане. Генотпы 2 и 7 имеют широкое географическое распространение. Субтип 2A в основном обнаруживается в японской популяции и среди коренных американцев, 2B субтип — среди евразийцев, 2D субтип — в индийской, а 2E субтип — в австралийской и западной тихоокеанской популяции. Субтипы 7A и 7B обнаружены в Китае, Юго-восточной Азии, Японии и Монголии. Генотип 8 распространен в Папуа-Новой Гвинеи и на тихоокеанских островах [1–6].

Следует отметить, что гено- и субтипы JC вируса связаны с конкретными этническими группами и часто используются в качестве маркеров для изучения миграции в человеческой популяции. Республика Беларусь, несмотря на свое географическое положение в центре Европы, характеризуется довольно однородной популяцией населения, представленной в основном белорусами и выходцами из западной части России. Несмотря на интенсивную работу зарубежных коллег по молекулярной эпидемиологи JC вируса, до начала настоящих исследований данные о субтиповом составе циркулирующих в Республике Беларусь JC вирусов отсутствовали.

Настоящая работа посвящена генотипированию JC вирусов, идентифицированных в клиническом материале белорусских реципиентов почки.

**Материалы и методы.** Исследовано 12 изолятов JC вирусов, обнаруженных в образцах мочи 12 реципиентов почки, которые были получены из РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я городская клиническая больница».

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

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

Для секвенирования участка генома JC вируса использовали фрагмент из 434 нуклеотидов (нт), локализованный в гене VP1, который накапливали с помощью праймеров PoE1s (5’-GGAGGAGTAGAAGTTCTAGAA-3’) и PoE2as (5’-TCTGGGTACTTTGTYCTGTA-3’) [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, а также последовательностей из базы данных Entrez использовали алгоритм ClustalW, встроенный в программу MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis) версии 6 [8]. Полученные выравнивания корректировали 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), 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.** По данным литературы, сравнение результатов секвенирования целого генома и фрагмента гена VP1 показало, что генотипирование JC вируса на основе фрагмента гена VP1 сравнимо с полногеномным генотипированием [4]. Для генотипирования JC вирусов из клинического материала белорусских реципиентов почки нами использованы праймеры PoE1s и PoE2as, применяемые ранее другими исследователями [6]. Данные праймеры позволяют амплифицировать фрагмент гена VP1 размером в 434 нт. Экспериментально определены оптимальные условия амплификации с каждой парой праймеров. Установлено, что оптимальными для всех четырех праймеров были следующие условия: 95°C — 20 с, 55°C — 20 с, 72°C — 20 с, 40 циклов амплификации.

Амплифицированные фрагменты ДНК 12 изолятов JC вирусов секвенированы и отредактированы вручную. Для филогенетического анализа взяты фрагменты длиной в 402 нт, включающие в себя ключевой для генотипирования участок в 215 нт. Полученные регионы проанализированы для определения оптимального 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 рассчитаны показатели AICc для сравнения значений максимального правдоподобия для каждой из моделей. Установлено, 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 12 белорусских JC вирусов в анализ были включены нуклеотидные последовательности прототипных штаммов из Международного генбанка (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

Полученные результаты показали, что изучаемые белорусские изоляты JC вирусов группировались в общий кластер с прототипными штаммами 1 и 2 типов (рисунок). С субтипом 1A групировалось 7 из 12 белоруских изолятов, с субтипом 1B — 4 изолята, с субтипом 2Aa — один изолят.

Анализ нуклеотидной последовательности белорусских JC вирусов при помощи программы BLAST показал, что наиболее близкими к исследуемым были штаммы, выделенные специалистами из США, Европы, Ближнего Востока и Японии.

**Заключение.** Таким образом, в ходе исследований получены первые в нашей стране данные, подтверждающие факт активной циркуляции субтипов I и 2 JC вируса на территории Республики Беларусь.

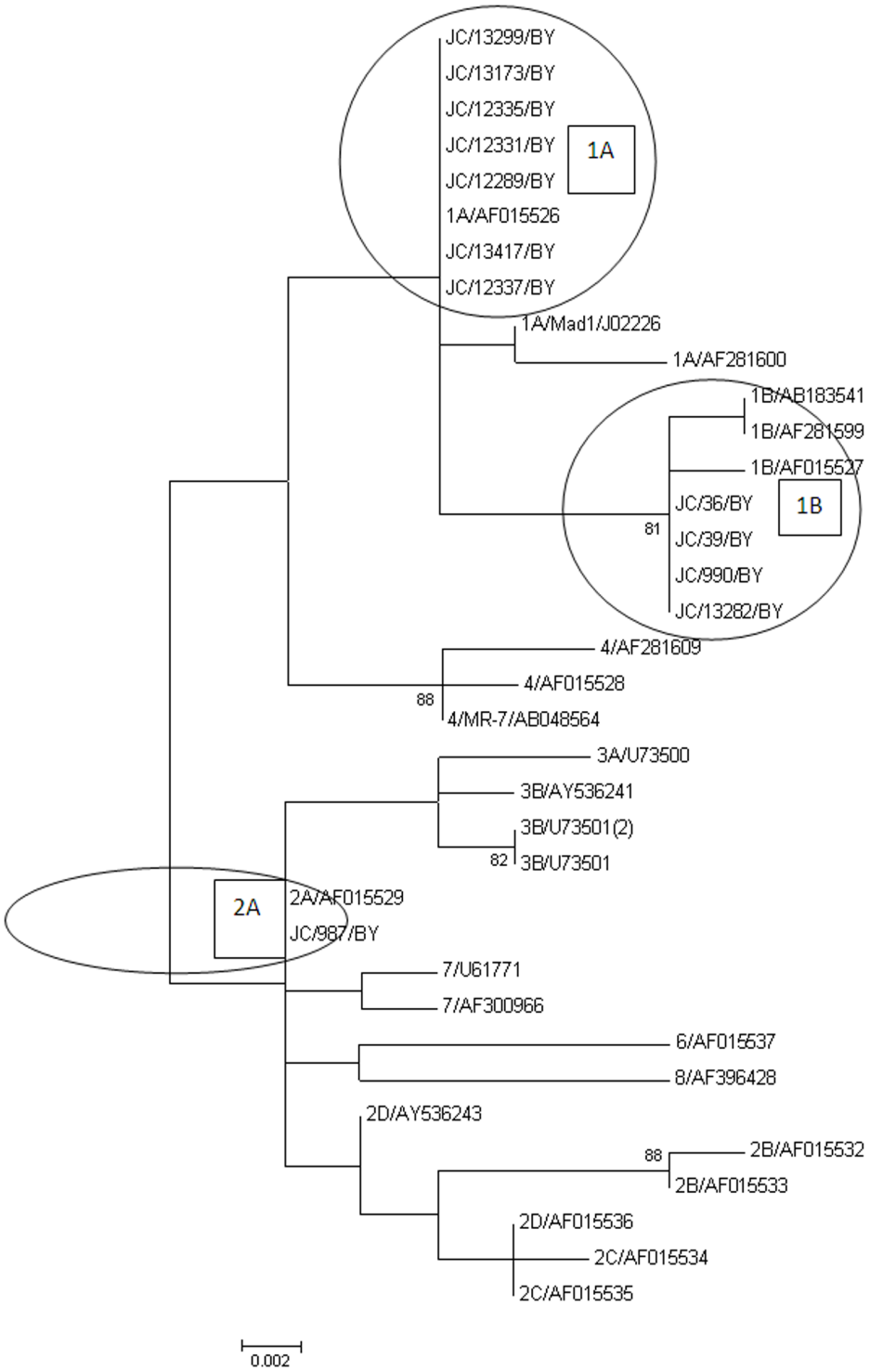



**Рисунок — Филогенетическое древо, построенное на основании фрагмента гена VP1 JC вируса методом NJ. Цифры в узлах древа — значения бутстреп-теста**

**Литература**

1. Easha, S. Human polyomaviruses: Molecular and clinical epidemiology / S. Easha, K. Manleyb, M. Gasparovicb // Cell. Mol. Life Sci. — 2006. — Vol. 63. — P. 865–876.

2. Characterization of JC virus in cerebrospinal fluid from HIV-1 infected patients with progressive multifocal leukoencephalopathy: insights into viral pathogenesis and disease prognosis / A. Marzocchetti [et al.] // J. Neurovirol. — 2007. — Vol. 13. — P. 338–346.

3. Distribution of JC virus genotypes among Serbian patients infected with HIV and in healthy donors / D. Karalic [et al.] // J. Med. Virol. — 2014. — Vol. 86. — P. 411–418.

4. Agostini, H.T. JC virus type 1 has multiple subtypes: three new complete genomes / H.T. Agostini, C.F. Ryschkewitsch, G.L. Stoner // J. Gen. Virol. — 1998. — Vol. 79. — P. 801–805.

5. JC virus genotyping offers a new paradigm in the study of human populations / Y. Yogo [et al.] // Rev. Med. Virol. — 2004. — Vol. 14. — P. 179–191.

6. Chehadeh, W. Genotypic diversity of polyomaviruses circulating among kidney transplant recipients in Kuwait / W. Chehadeh, M.R. Nampoory // J. Med. Virol. — 2013. — Vol. 85. — P. 1624–1631.

7. Basic local alignment search tool / S. Altschul [et al.] // J. Mol. Biol. — 1990. — Vol. 215. — P. 403–410.

8. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. — 2013. — Vol. 30. — P. 2725–2729.

## GENOTYPING OF JC VIRUSES CIRCULATING IN BELARUS

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

*State Institution "Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

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

**Keywords:** polyomavirus, phylogenetic analysis, subtype, Republic of Belarus.

Поступила 01.09.2015

## ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

*Запольская В.В., Волченко А.Н., Наройчик Л.К., Пашкович В.В.*

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

**Реферат.** Парентеральные вирусные гепатиты (ПВГ) в Республике Беларусь относятся к ряду наиболее значимых инфекционных заболеваний с умеренным уровнем регистрации впервые выявленных случаев в среднем 68,0±0,1 на 100 тыс. населения (2012–2014 гг.). ПВГ имеют в стране повсеместное распространение, однако насколько равномерно и интенсивно происходит распределение заболеваемости в разрезе административных территорий изучено недостаточно. ПВГ в республике относятся к числу среднераспространенных инфекций. В 2014 г. было зарегистрировано 5657 вновь выявленных случаев ПВГ, показатель заболеваемости составил 59,8 на 100 тыс. населения, что на 18% случаев ниже уровня 2013 г. (70,6 на 100 тыс. населения) [1].

**Ключевые слова:** парентеральные вирусные гепатиты, гепатит *B*, гепатит *C*, заболеваемость, распространенность, Республика Беларусь.

**Введение.** Современное состояние эпидемического процесса ПВГ характеризуют следующие тенденции в динамике заболеваемости: соотношение в этиологической структуре нозоформ, вызванных вирусом гепатита *B* (ВГВ), к нозоформам, вызванных вирусом гепатита *C* (ВГС), составляет 1:3; динамика выявления случаев инфицирования ВГВ имеет выраженную тенденцию к снижению (с 2002 г. Тснижения = 7,59% случаев в год), а ВГС— умеренную (с 2002 г. Тснижения = 2,83% случаев в год); в структуре нозологических форм ПВГ преобладают хронические формы вирусных гепатитов *B* и *C*, имеющих более неблагоприятный исход заболевания.

Наряду с ежегодным приростом новых случаев заболеваний ПВГ увеличиваются показатели выявления и распространения случаев циррозов и фиброзов печени (за исключением алкогольных, врожденных и с токсическими поражениями) (рисунок 1).

На начало 2015 г. в организациях здравоохранения республики на диспансерном учете находилось 7060 пациентов старше 18 лет с диагнозом «цирроз» и «фиброз печени» (88,25 на 100 тыс. когорты), в т. ч. 4194 пациента трудоспособного возраста [2]. Динамика выявления злокачественных новообразований печени и внутрипеченочных потоков в республике в 2009–2013 гг. отличалась ста-

бильностью с регистрацией показателей в пределах 3,9–4,4 случая на 100 тыс. взрослого населения [3]. При этом у женщин динамика выявления злокачественных новообразований на протяжении 5 лет оставалась стабильной, а у мужчин характеризовалась умеренной тенденцией к росту (Тприроста = 1,9% случаев в год).

Учитывая преобладание хронических форм и носительства инфекции в клиническом течении ПВГ, способность источников к продолжительному периоду заразительности, в т. ч. до выявления у них маркеров и регистрации в территориальных центрах гигиены и эпидемиологии (далее — ЦГЭ), можно заключить, что мониторинг заболеваемости ПВГ без сведений об их распространенности среди населения не позволяет всесторонне характеризовать эпидемическую ситуацию.

**Цель** исследования — изучение частоты обнаружения маркеров ПВГ и получение данных о равномерности распространения инфекции в разрезе административных территорий.

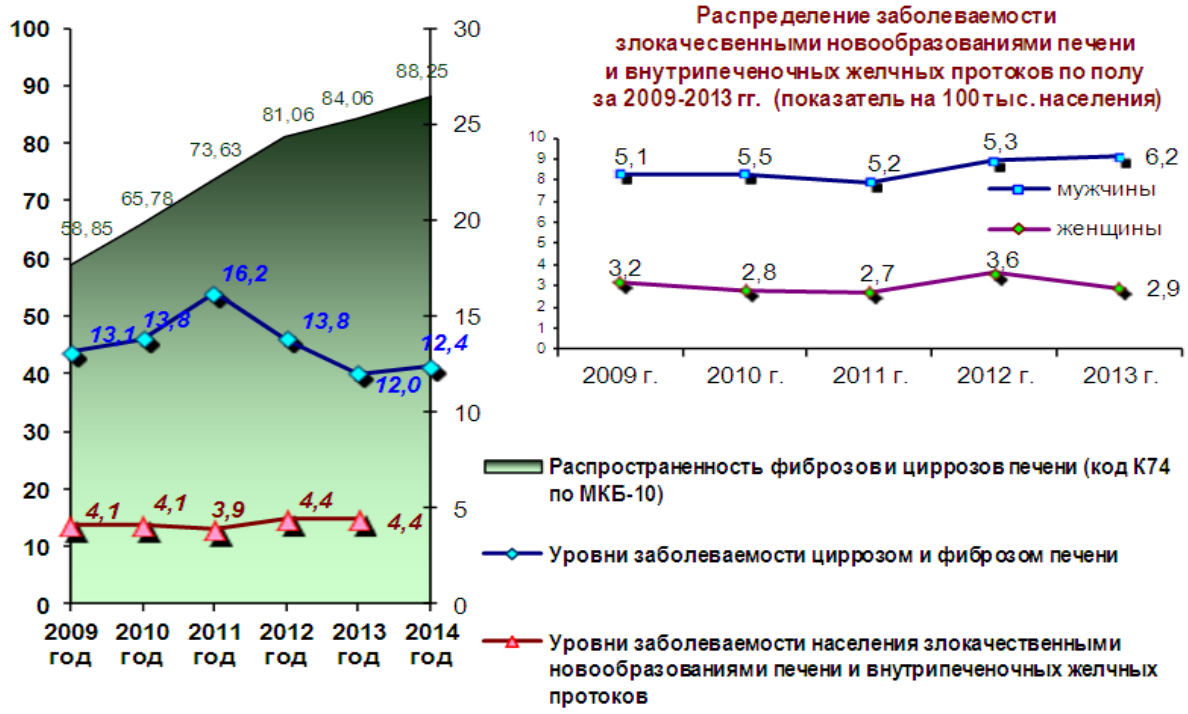



**Рисунок 1. — Распространенность и заболеваемость циррозами и фиброзами печени (исключая алкогольные, врожденные и с токсическими поражениями), а также уровни заболеваемости злокачественными новообразованиями печени и внутрипеченочных протоков среди взрослого населения Республики Беларусь в 2009–2014 гг. (на 100 тыс. когорты)**

**Материалы и методы.** Уровни распространенности ПВГ получены в результате расчета удельного веса обнаружения маркеров ПВГ методом ИФА в 2014 г. у реципиентов крови от общего числа лабораторно обследованных лиц этой группы. Для данного эпидемиологического исследования выборка является случайной (реципиенты лабораторно обследуются на маркеры ПВГ до переливания им крови по причинам, не связанным с заболеваниями ПВГ), объем выборки — репрезентативный (N = 16608 исследований на маркеры ВГВ и N = 16440 исследований на маркеры ВГС), в т. ч. лабораторно обследовано на маркер HbsAg 170439 мужчин и 119158 женщин, и на маркер anti-HCV — 170457 мужчин и 119171 женщина [4].

**Результаты и их обсуждение.** Изучение уровней распространенности ПВГ позволило определить, что интенсивность распространения ВГВ и ВГС в Республике Беларусь различается и составляет 0,9 и 3,4% соответственно. По имеющимся оценочным шкалам распространения заболеваний ПВГ в мире интенсивность распространения ВГВ в стране находится на низком уровне (<2% случаев) [5], а ВГС — на верхней границе среднего уровня (от 1,5 до 3,5%) [6].

В разрезе административных территорий показатели распространенности инфицирования ВГВ и ВГС распределяются неравномерно и колеблются от 0,3 до 1,7% для ВГВ и от 0,9 до 6,4%

для ВГС (рисунок 2). Территорией с наибольшими уровнями распространенности ВГВ и ВГС стала Минская область, а с наименьшими — Брестская область.

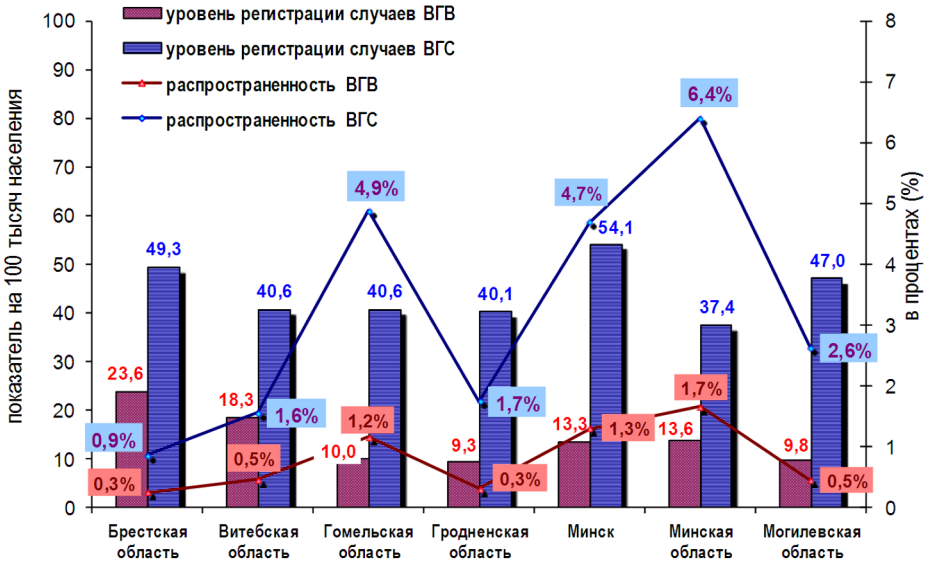



**Рисунок 2. — Уровни регистрации случаев в ЦГЭ и распространенности ПВГ в 2014 г. по административным территориям Республики Беларусь, %**

Уровни распространения инфицирования ВГС на 3 территориях (Гомельская, Минская области и г. Минск) в среднем в 1,6 раза превышают республиканский показатель и отличаются высокой интенсивностью. При этом по данным статистической отчетности на этих территориях интенсивность течения ВИЧ-инфекции выше, чем в остальных регионах страны [7]. Следует предположить, что факторы, формирующие эпидемический процесс ПВГ и ВИЧ-инфекции на данных территориях, имеют некоторую схожесть и для большинства случаев ассоциируются с инъекционным введением наркотических средств.

Анализ частоты обнаружения в 2014 г. маркеров ПВГ у пациентов, обратившихся в организации здравоохранения за медицинской помощью по поводу заболеваний печени и желчевыводящих путей (таблица), позволил определить, что ВГВ являются причиной развития поражения печени у каждого 25 такого пациента (4,2% инфицированы ВГВ от общего количества обследованных лиц данного контингента), а ВГС — у каждого десятого (11,4% инфицированы ВГС) [4].

Таблица — Удельный вес обнаружения маркеров ПВГ у пациентов, обратившихся за медицинской помощью по поводу заболеваний печени, желчевыводящих путей в организации здравоохранения, от общего числа лабораторных исследований этой категории лиц в 2014 г. [4].

| Область | Количество исследований на маркеры ВГВ | Удельный вес обнаружения маркеров ВГВ, % | Количество исследований на маркеры ВГС | Удельный вес обнаружения маркеров ВГС, % |
|---|---|---|---|---|
| Брестская | 13345 | 2,1 | 13369 | 3,2 |
| Витебская | 6257 | 2,8 | 6392 | 4,8 |
| Гомельская | 12660 | 6,9 | 13070 | 17,9 |
| Гродненская | 5536 | 3,6 | 6334 | 10,8 |
| г. Минск | 23410 | 4,0 | 24162 | 12,5 |
| Минская | 8195 | 6,7 | 8735 | 16,4 |
| Могилевская | 6100 | 2,6 | 8650 | 11,4 |
| ИТОГО по РБ: | 75503 | 4,2 | 80712 | 11,4 |

При этом в Гомельской и Минской области удельный вес обнаружения маркеров ВГВ у пациентов, обратившихся за медицинской помощью по случаю подозрения заболевания печени, жел-

чевыводящих путей, оказался выше среднего уровня по республике и составил 6,9 и 6,7% соответственно. Частота обнаружения маркеров ВГС ожидаемо оказалась выше среднего показателя по республике у пациентов в тех регионах, где был установлен высокий уровень распространенности ВГС — это Гомельская, Минская области и г. Минск.

Изучение гендерной структуры распространения ПВГ определило, что оба пола не одинаково принимают участие в эпидемическом процессе. Наиболее пораженной группой являются мужчины, удельный вес которых в структуре положительных результатов лабораторного исследования составил 61% случаев против 39% у женщин [4].

В результате расчета удельного веса обнаружения маркеров ПВГ среди обоих полов в группе реципиентов крови уровни распространения ВГВ и ВГС у мужчин составили 1,2 и 4% случаев соответственно, а у женщин — 0,6 и 2,8% случаев (рисунок 3).

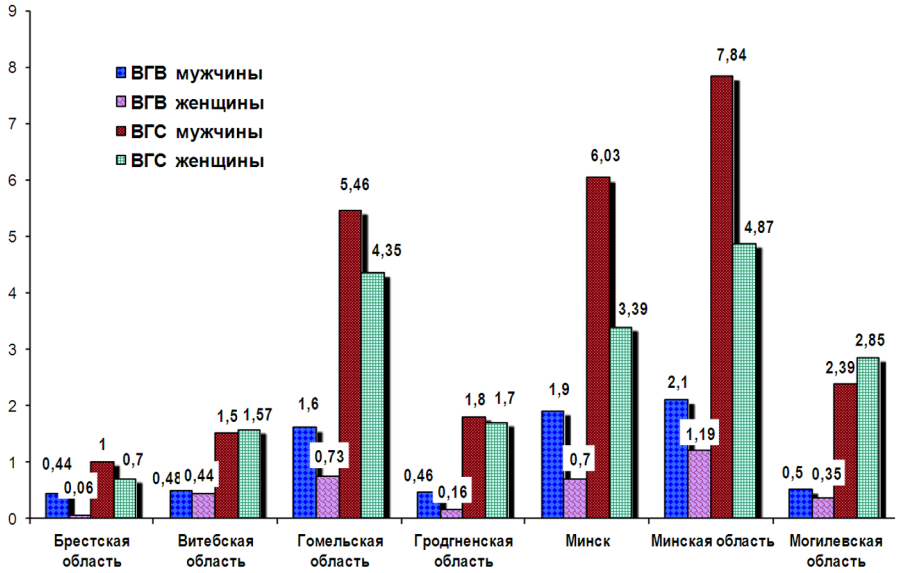



**Рисунок 3. — Гендерная структура распространенности ПВГ в 2014 г. в разрезе административных территорий Республики Беларусь, %**

Частота обнаружения маркеров ВГВ у мужчин на территории 6 регионов (за исключением Витебской области, где показатели инфицирования ВГВ для мужчин и женщин не имеют достоверной разницы) в среднем в 2 раза выше, чем у женщин.

Иные особенности наблюдаются в гендерной структуре инфицирования возбудителям ВГС. Уровни инфицирования мужчин превышают таковые у женщин в среднем в 1,5 раза на территории 4 регионов (Брестская, Гомельская, Минская области и г. Минск). На 2 территориях (Витебская и Гродненская области) отсутствовала достоверная разница в показателях распространения ВГС среди мужчин и женщин. В Могилевской области инфицированность ВГС женщин в 1,2 раза превысила таковую у мужчин.

**Заключение.** Территория республики Беларусь по интенсивности течения эпидемического процесса ПВГ похожа на большинство стран Европейского региона, где отмечается низкий уровень распространения ВГВ и средний уровень распространения ВГС.

Неоднородность распространения инфекций в разрезе административных территорий, а также в гендерной структуре может свидетельствовать об имеющихся отличиях в реализации факторов передачи инфекций, обусловливающих эпидемический процесс ПВГ.

**Литература**

1. Государственная статистическая отчетность ф. 6-инфекция (Минздрав) «Отчет об отдельных инфекционных, паразитарных заболеваниях и их носителях» за 2013–2014 гг. / Нац. стат. комитет Респ. Беларусь (Белстат). — Минск, 2015.

2. Государственная статистическая отчетность ф. 1-заболеваемость (Минздрав) «Отчет о числе заболеваний, зарегистрированных у пациентов в возрасте 18 лет и старше, проживающих в районе обслуживания ор-

ганизаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь» за 2009–2014 гг. / Нац. стат. комитет Респ. Беларусь (Белстат). — Минск, 2015.

3. Зиновский, В.И. Заболеваемость населения злокачественными новообразованиями по отдельным локализациям [Электронный ресурс] / В.И. Зиновский // Здоровье населения Республики Беларусь, 2014 / Нац. стат. комитет Респ. Беларусь (Белстат): стат. сб. — Минск, 2015. — С. 38–40. — Режим доступа: http://belstat.gov.by/bgd/public_compilation/index_521/. — Дата доступа: 12.05.2015.

4. Информация по областям и г. Минску об эпидемической ситуации по парентеральным вирусным гепатитам: табл. 1–3 : прилож. 3: Санитар. нормы и правила «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов» : утв. постановлением М-ва здравоохр. Респ. Беларусь 06.02.2013 № 11.

5. Гепатит В [Электронный ресурс] // Информ. бюл. / ВОЗ. — 2015. — № 204. — Режим доступа: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/ru/. — Дата доступа: 15.08.2015.

6. Holtzman, D. Hepatitis C [Electronic resource] / D. Holtzman // CDC. — Mode of access: http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/hepatitis-c. — Date of access: 17.08.2015.

7. Отчет об инфицировании вирусами иммунодефицита человека, 1987–2014: ведомст. стат. отчетность: прилож. 27: приказ М-ва здравоохр. Респ. Беларусь от 12.12.2013 № 1260.

## STUDY OF PARENTERAL VIRAL HEPATITIS PREVALENCE IN BELARUS

*Zapolskaya V.V., Volchenko A.N., Naroichik L.K., Pashkovich V.V.*

*State Institution "Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health", Minsk, Republic of Belarus*

In the Republic of Belarus parenteral viral hepatitis (PVH) are among the most important infectious diseases with a moderate level of registration of new cases on average 68.0±0.1 per 100 thousand of population (2012–2014). PVH has the country's ubiquitous, but how evenly and intensely is the distribution of disease in the context of administrative territories, has been insufficiently studied. PVG in the country are among the secondary spread of infection. In 2014, the republic was registered 5.657 new cases of PVH, the incidence rate was 59.8 per 100 thousand. Population, which is 18% below the level of 2013 (70.6 per 100 thousand population).

**Keywords:** parenteral viral hepatitis, hepatitis B, hepatitis C, morbidity, prevalence, Republic of Belarus.

Поступила 21.08.2015

## ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2010–2014 гг.

*Волченко А.Н., Запольская В.В., Варивода Е.Б.*

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

**Реферат.** Распространенность парентеральных вирусных гепатитов (ПВГ) среди медицинских работников в 2,1 раза выше, чем среди населения общей популяции Республики Беларусь. В целом по стране заболеваемость ПВГ медицинских работников снижалась за период 2009–2014 гг. с 15,4 до 10,1 зарегистрированных случаев на 10000 медицинских работников, на 12,4 процентных пункта ежегодно. На фоне снижения выявления носителей маркеров ПВГ отмечается тенденция к росту заболеваемости острыми и хроническими формами ПВГ. В этиологии зарегистрированных случаев преобладал гепатит *С*, который кумулятивно за 5 лет был выявлен у 74,1% (95% ДИ 68,1–74,1%) инфицированных медицинских работников.

**Ключевые слова:** парентеральные вирусные гепатиты, медицинские работники.

**Введение.** Всемирный альянс по борьбе с гепатитом при поддержке ВОЗ резолюцией WHA 63.8, принятой в мае 2010 г., признали вирусный гепатит глобальной проблемой здравоохранения [1]. Гепатиты *B*, *C*, *D* рассматриваются как профессиональные заболевания медицинских работ-

ников, имеющих дело с кровью пациентов. Ежедневно в мире умирает один врач от отдаленных последствий вирусного гепатита [2].

Согласно исследованиям российских авторов, проспективное наблюдение за эпидемическим процессом острых и хронических гемоконтактных гепатитов у медицинского персонала (1996–2005 гг.) подтвердило их значимость как профессиональной патологии на территории Российской Федерации. Большая часть респондентов (72,5% лаборантов, 88,7% врачей, 91,5% медицинских сестер) связывали свои заболевания с профессиональной деятельностью и контактами с инфицированными пациентами. Как правило, заболевшие продолжали выполнять свои функциональные обязанности в стационаре [3]. По исследованиям, проведенным В.В. Косаревым и С.А. Бабановым (2010), 39,5% от всех случаев выявленной профессиональной патологии у медицинских работников приходится на заболевания парентеральными вирусными гепатитами [4].

В условиях глобального роста заболеваемости ПВГ очевидна необходимость анализа проявлений эпидемического процесса ПВГ в группах повышенного риска и последующая разработка мероприятий по повышению инфекционной безопасности, как медицинских работников, так и пациентов.

**Цель** исследования — анализ динамики и определение проявлений эпидемического процесса ПВГ среди медицинских работников за 2009–2014 гг.

**Материалы и методы.** Для изучения многолетней динамики заболеваемости ПВГ у медицинских работников использовались данные о регистрации случаев заболеваний острыми, хроническими формами вирусных гепатитов *B* и *C*, а также выявления маркеров парентеральных гепатитов в 2010–2014 гг., поступающие в государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья».

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

При изучении многолетней динамики заболеваемости населения использовали интенсивные грубые показатели, рассчитанные на 100000 населения. Для оценки влияния постоянно действующих факторов определяли многолетнюю эпидемиологическую тенденцию с помощью метода наименьших квадратов и оценивали по направленности и скорости изменения показателей заболеваемости. Направленность тенденции определялась знаком при коэффициенте «b», при «+» — тенденция к росту, при «–» — тенденция к снижению заболеваемости. Скорость изменения показателей оценивали по темпу прироста. Эпидемическую тенденцию считали стабильной при Тпр от 0 до ±0,99%, умеренной — при Тпр от ±1 до ±4,99%, выраженной — от ±5% и выше [5].

Для долей использовался 95% доверительный интервал, который рассчитывался по формуле:

$$\rho-(1{,}96 \times \sqrt{(\rho(1-\rho)) \div n});\ \rho+(1{,}96 \times \sqrt{(p(1-p)) \div n}),$$

где p — доля индивидуумов в выборке с интересующими нас признаками;
n — объем выборки [6].

При дифференциации административных территорий по уровням заболеваемости вирусными гепатитами использовано разделение на квартили. Территории, входившие в первый квартиль, характеризовались низкой заболеваемостью, заболеваемость медицинских работников на территориях контингента второго квартиля была средней, третьего — высокой, а для административных территорий четвертого квартиля характерна была очень высокая заболеваемость медицинских работников [5].

**Результаты и их обсуждение.** В целом по Республике Беларусь заболеваемость ПВГ медицинских работников снижалась за наблюдаемый период с 15,4 до 10,1 зарегистрированных случаев на 10000 медицинских работников. Всего за 2010–2014 гг. было зарегистрировано 1210 случаев ПВГ и выявления носительства маркеров. В среднем по стране в год выявлялось 242 медицинских работника, инфицированных ПВГ, темп снижения за последние 5 лет составил 12,4 процентных пункта ежегодно (таблица 1).

Таблица 1. — Среднемноголетняя заболеваемость (I) и эпидемическая тенденция заболеваемости (Тпр) различными формами ПВГ среди медицинских работников в административных территориях Республики Беларусь

| Область | Суммарно | | Острый | | Хронический | | Носители | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | I | Тпр | I | Тпр | I | Тпр | I | Тпр |
| Республика Беларусь | 14,2 | -12,4 | 0,4 | 10,2 | 5,3 | 5,3 | 9,1 | -26,1 |
| Брестская | 14,7 | -16,0 | 0,3 | -0,7 | 3,8 | 11,8 | 10,6 | -26,4 |
| Витебская | 9,7 | -6,2 | *0,3* | **-66,8** | 4,3 | 13,4 | 5,1 | -19,6 |
| Гомельская | 16,2 | **-22,2** | 0,4 | **69,9** | 2,8 | 14,7 | **13,1** | -32,7 |
| Гродненская | 12,0 | -20,1 | *0,3* | 33,2 | *2,6* | **-5,2** | 9,1 | -26,1 |
| г. Минск | *9,4* | -7,5 | **0,5** | 15,5 | 7,3 | 1,6 | *1,6* | -55,5 |
| Минская | **25,0** | *-5,8* | 0,4 | 37,7 | **11,7** | *0,7* | 12,9 | -12,9 |
| Могилевская | 14,7 | -11,2 | 0,4 | -49,8 | 2,7 | **22,4** | 11,5 | *-17,6* |

Примечание — Жирным шрифтом выделены наибольшие значения показателя (для темпов прироста по модулю), курсивом — наименьшие.

В разрезе административных территорий показатели регистрации заболеваемости ПВГ у медицинских работников распределяются не равномерно и колеблются от 9,4 в г. Минске до 25,0 случая на 10000 медицинских работников в Минской области. Наиболее высокий в Республике Беларусь темп снижения заболеваемости ПВГ и выявляемости носителей отмечается в Гомельской области — в течение последних 5 лет количество ежегодно регистрируемых лиц снижается на 22,2%. Наиболее низкий темп снижения отмечается в Минской области — 5,8. При этом на территории вышеназванных областей (территории четвертого квартиля) отмечаются наиболее высокие показатели регистрации заболеваемости среди медицинских работников, превышающие среднереспубликанский уровень в 1,15 и 1,8 соответственно.

Высокий уровень распространенности ПВГ (14,6–15,1 случая на 10000 медицинских работников) отмечается в Брестской и Могилевской областях, средний уровень распространенности (11,5–14,5 случая на 10000 медицинских работников) зарегистрирован в республике в целом и Гродненской области, низкий (до 11,3 случая на 10000 медицинских работников) — в Витебской области и г. Минске.

Очень высокие (входящие в четвертый квартиль) показатели заболеваемости медицинских работников, превышающие среднереспубликанский уровень, в Минской и Гомельской областях, соотносятся с превышающим среднереспубликанский уровень удельным весом обнаружения маркеров у реципиентов крови в Минской и Гомельской областях (6,1 и 8,1% от общего числа лабораторно обследованных лиц этой группы).

При общей эпидемической тенденции к снижению заболеваемости ПВГ у медицинских работников в Республике Беларусь отмечается выраженная тенденция к росту заболеваемости острыми формами (с 0,36 случая на 10000 медицинских работников до 0,46 случая, темп ежегодного прироста — 10,3%) и хроническими формами ПВГ (с 4,5 до 5,3 случая на 10000 медицинских работников, темп прироста — 5,3% ежегодно). Наибольший показатель заболеваемости острыми формами отмечается в г.Минске (0,5 случая на 10000 медицинских работников), хроническими формами — в Минской области (11,7 случая на 10000 медицинских работников), а распространенность носителей — в Гомельской области (13,1 случая на 10000 медицинских работников).

Тенденция к снижению суммарной заболеваемости ПВГ обусловлена снижением выявляемости носителей ПВГ среди медицинских работников во всех областях республики с 10,6 до 9,1 случая на 10000 медицинских работников, в целом — на 26,1% ежегодно.

Удельный вес носителей маркеров ПВГ среди всех выявленных форм ПВГ составил 59,8% (95% ДИ 56,2–63,7%), пациенты с хроническими формами ПВГ составили 37,5% (95% ДИ 33,1–42,0%). В г. Минске удельный вес выявленных форм ПВГ отличается от среднереспубликанской тенденции в сторону преобладания хронических форм (77,7%, 95% ДИ 45,2–100,0%) (рисунок 1).

В ходе анализа этиологии зарегистрированных случаев ПВГ выявлено, что преобладает гепатит *С*, который кумулятивно за 5 лет был выявлен у 74,1% (95% ДИ 68,1–74,1%) инфицированных

медицинских работников. Гепатит *В* был выявлен у 25,9% (95% ДИ 21,1–30,8%) человек. Сравнение результатов исследований этиологической структуры ПВГ у медицинских работников в 1993–2000 гг., проведенных в Республике Беларусь, показывает уменьшение удельного веса ВГВ в 2,45 раза в настоящее время, что обусловлено введением плановой вакцинации медицинских работников против ВГВ с 2000 г. [7]. В Республике Беларусь в последние 5 лет отмечается эпидемическая тенденция к снижению заболеваемости всеми формами ВГВ на 12,1% ежегодно и на 13,1% — ВГС среди медицинских работников.

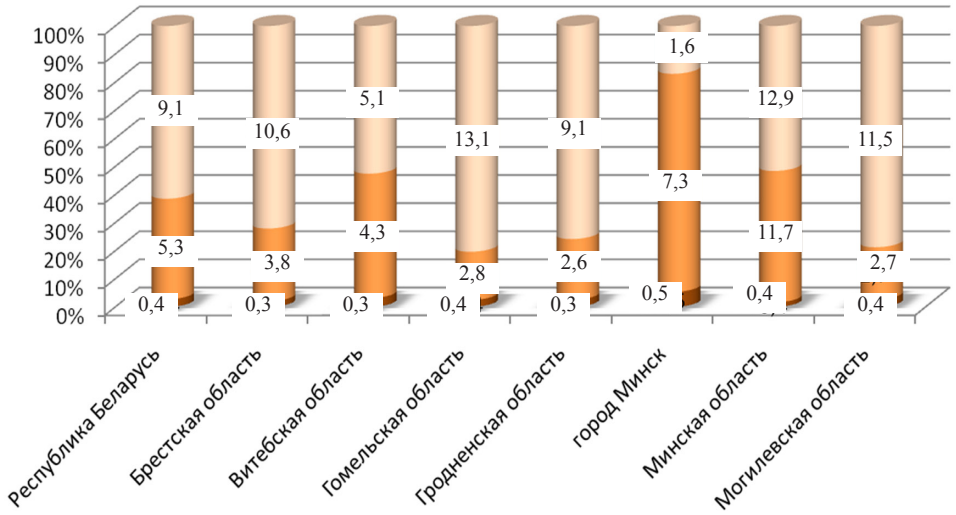



**Рисунок 1. — Заболеваемость различными формами ПВГ, выявленными у медицинских работников на административных территориях Республики Беларусь, на 10000 медицинских работников**

Наиболее выраженная тенденция к снижению заболеваемости всеми формами ВГВ отмечается в г. Минске (32,3% ежегодно), при этом в г. Минске отмечается самый низкий в республике показатель заболеваемости ВГВ. Наиболее интенсивное снижение заболеваемости всеми формами ВГС отмечается в Гродненской (25,3% ежегодно) и Гомельской областях (23,7%), в то же время в Гомельской области зарегистрирован самый высокий уровень заболеваемости ВГС (12,5 случаев на 10000 медицинских работников). Показатели заболеваемости и уровни темпов прироста заболеваемости ВГВ и ВГС представлены в таблице 2.

Таблица 2. — Среднемноголетняя заболеваемость (I) и эпидемическая тенденция заболеваемости (Тпр) ВГВ и ВГС среди медицинских работников в административных территориях Республики Беларусь

| Область | ВГВ | | | ВГС | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | квартиль | I | Тпр | квартиль | I | Тпр |
| Республика Беларусь | третий | 3,7 | -12,1 | третий | 10,5 | -13,1 |
| Брестская | четвертый | 4,8 | -12,2 | третий | 10,0 | -17,8 |
| Витебская | второй | 3,0 | -16,1 | первый | *6,9* | -4,5 |
| Гомельская | третий | 3,7 | -17,0 | четвертый | **12,5** | -23,7 |
| Гродненская | второй | 2,9 | -4,5 | второй | 9,0 | **-25,3** |
| г. Минск | первый | *2,4* | **-32,3** | первый | 7,0 | *0,2* |
| Минская | четвертый | **7,0** | *0,6* | второй | 7,9 | -8,6 |
| Могилевская | первый | 2,6 | -16,5 | четвертый | 12,1 | -10,0 |

Примечание — Жирным шрифтом выделены наибольшие значения показателя (для темпов прироста по модулю), курсивом — наименьшие.

Распространенность ПВГ среди медицинских работников в 2,1 раза выше, чем среди общей популяции Республики Беларусь (рисунок 2).

По результатам анализа литературных данных российских исследователей (В.Г. Акимкин, 2004) уровень заболеваемости медицинского персонала ВГВ превышает показатели заболеваемости населения в 1,5–6,6 раза [8].

**Рисунок 2. — Показатели заболеваемости различными формами ПВГ среди населения Республики Беларусь и медицинских работников**

В целом в популяции медицинских работников отмечаются те же тенденции в проявлении эпидемического процесса ПВГ (преобладание носителей в структуре заболеваемости), как и у населения общей популяции. Одинаковое соотношение выявляемых форм ВГС и ВГВ (4,9:1 для всего населения республики и 4,8:1 для медицинских работников) свидетельствует о том, что на проявления эпидемического процесса, как среди населения, так и среди медицинских работников, влияют сходные факторы.

**Заключение.** Эпидемическую ситуацию по заболеваемости всеми формами ПВГ медицинских работников в Республике Беларусь можно оценить как благополучную с выраженной тенденцией к снижению (ежегодно на 12,4%). Снижение заболеваемости происходит за счет снижения выявления носителей маркеров ПВГ (на 26,1% ежегодно) при росте заболеваемости острыми (на 10,2% ежегодно) и хроническими формами (на 5,3% ежегодно).

Самый высокий показатель заболеваемости как суммарно всеми формами ПВГ, так и хроническими формами, отмечается в Минской области. Наибольший темп снижения заболеваемости всеми формами ПВГ отмечается в Гомельской области, при этом показатель распространенности ПВГ среди медицинских работников превышал среднереспубликаникий уровень в 1,15 раза.

Среди ПВГ в этиологической структуре преобладал ВГС, наибольшая распространенность которого отмечалась в Гомельской области (12,5 случая на 10000 медицинских работников) и превышал среднереспубликанский показатель в 1,19 раза. Наибольшая распространенность ВГВ среди медицинских работников зарегистрирована в Минской области (7,0 случая на 10000 медицинских работников) и превышала среднереспубликанский показатель в 1,9 раза.

Показатель заболеваемости ПВГ среди медицинских работников (14,2 случая на 10000 медицинских работников) в 2 раза выше, чем заболеваемость населения республики (68,8 на 100000), а проявления эпидемического процесса имели сходные тенденции: преобладание носителей в структуре ВГС и в этиологии заболеваемости ПВГ.

**Литература**

1.Гепатит. Глобальная программа по борьбе с гепатитом [Электронный ресурс] / ВОЗ. — Режим доступа: http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/ru. — Дата доступа: 01.09.2015.

2.Шевченко, Ю.Л. Значение социальных факторов во взаимодействии человека и микроорганизмов. Роль здравоохранения в профилактике и лечении инфекционных болезней / Ю.Л. Шевченко // Здравоохранение Рос. Федерации. — 2000. — № 5. — С. 3–16.

3.Бойко, И.Б. О состоянии здоровья медицинских работников Российской Федерации / И.Б. Бойко, А.В. Сашин // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. — 2008. — № 3. — С. 40–47.

4.Косарев, В.В. Профессиональная заболеваемость медицинских работников / В.В. Косарев, С.А. Бабанов // Мед. альманах. — 2010. — № 3. — С. 18–21.

5.Эпидемиологическая диагностика: учеб. пособие / Г.Н. Чистенко [и др.]; под ред. Г.Н. Чистенко. — Минск: БГМУ, 2007. — 148 с.

6.Наглядная медицинская статистика / А. Петри, К. Сэбин; пер. с англ. — 2-е изд. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 168 с.

7.Профилактика профессиональных заболеваний (вирусного гепатита и туберкулеза) у медицинских работников : инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 02.01.2001 № 27-0101 / НИИ санитарии и гигиены; С.В. Федорович [и др.]. — Гомель, 2001. — 28 с.

8.Акимкин, В.Г. Внутрибольничное инфицирование вирусами гепатитов В и С: эпидемиология и направление профилактики / В.Г. Акимкин // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2004. — № 6. — С. 13–17.

## MORBIDITY OF MEDICAL PROFESSIONALS WITH PARENTERAL VIRAL HEPATITIS IN BELARUS, 2010–2014

*Volchenko A.N., Zapolskaya V.V., Varyvoda E.B.*

*State Institution "Republican Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health", Minsk, Republic of Belarus*

The prevalence of parenteral viral hepatitis (PVH) among health care workers is in 2.1 times higher than the prevalence among general population of the Republic of Belarus. Throughout the country, PVH incidence rate of medical workers decreased for the 2009–2014 period from 15.4 to 10.1 cases per 10.000 medical professionals, and in average by 12.4 percentage points annually. With the reduction of PVH-carriers revealing it is marked increasing trend in the incidence rates of acute and chronic forms of the PVH. Hepatitis C was prevailed and detected in 74.1% (95% CI 68.1–74,1%) of infected.

**Keywords:** health care workers, parenteral viral hepatitis.

Поступила 02.10.2015

## ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПАЦИЕНТОВ С HBV-ИНФЕКЦИЕЙ, СОСТОЯЩИХ НА ДИСПАНСЕРНОМ УЧЕТЕ

*Красавцев Е.Л., Бут-Гусаим Л.А, Гулько В.А.*

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

**Реферат.** Среди пациентов с хроническими вирусными поражениями печени и с выявленными маркерами парентеральных вирусных гепатитов, состоящих на диспансерном учете в кабинете инфекционных заболеваний поликлиник г. Гомеля, меньше стало носителей HBsAg и больных хроническим вирусным гепатитом *В* в 2015 г. по сравнению с 2002 г. Среди носителей HBsAg уменьшилась доля молодых (16–29 лет), возросла доля лиц в возрасте 50–59 лет. Среди пациентов с хроническим вирусным гепатитом *В* уменьшилась доля пациентов старше 60 лет. Представляет интерес увеличение доли выявленных при донорстве среди носителей HBsAg с 30,9% в 2002 г. до 42,6% в 2015 г. и снижение доли медицинских работников среди пациентов с хроническим вирусным гепатитом *В* с 5,7% в 2002 г. до 1,3% в 2015 г.

**Ключевые слова:** HBV-инфекция, хронический вирусный гепатит *В*, носитель HBsAg, кабинет инфекционных заболеваний.

**Введение.** В связи с внедрением вакцинации значительно снизилась заболеваемость острыми гепатитом *В*, но отмечается рост хронических форм, как гепатита *С*, так и *В* [1, 5]. В связи с этим парентеральные вирусные гепатиты являются важнейшей медико-социальной проблемой здравоох-

ранения. Вирусом гепатита *С* инфицировано около 3% населения земного шара, а вирусом гепатита *В* инфицировано 350–400 млн человек. Фактически речь идет о пандемии, которая по масштабу в 5 раз превосходит зараженность вирусом СПИДа [1–3]. Есть мнение, что частота хронизации зависит от возраста, когда произошло инфицирование, пола, сопутствующей патологии, вредных привычек, сочетания с другими вирусными поражениями [4–7]. В связи с этим определенный интерес представляет изучение изменения структуры больных различными формами парентеральных вирусных гепатитов по полу, возрасту, предполагаемым путям передачи, наличию сопутствующей патологии.

**Цель** исследования — изучение изменения структуры пациентов с HBV-инфекцией (хроническим вирусным гепатитом *В* (ХВГВ) и носителей HBsAg), состоящих на диспансерном учете в кабинетах инфекционных заболеваний (КИЗах) поликлиник г. Гомеля в 2015 г. по сравнению с 2002 г.

**Материалы и методы.** По данным карт диспансерного наблюдения, в 2015 г. в 3 поликлиниках наблюдалось 115 носителей HBsAg и 121 с ХВГВ. В 2002 г. в 6 поликлиниках находилось под наблюдением 554 носителя HBsAg и 350 с ХВГВ.

Для сравнения использовались методы непараметрической статистики (таблица 2×2, критерий $\chi^2$).

**Результаты и их обсуждение.** Так, в 2015 г. меньше стало носителей HBsAg (17,9%, в 2002 г. — 28,8%, $p<0,01$) и больных хроническим вирусным гепатитом *В* (ХВГВ) (11,9%, в 2002 г. — 16,4%, $p<0,01$) среди пациентов с хроническими вирусными поражениями печени с выявленными маркерами парентеральных вирусных гепатитов, состоящих на диспансерном учете в КИЗах поликлиник г. Гомеля. В то же время уменьшилась доля носителей HBsAg среди пациентов с HBV-инфекцией с 61,3 до 48,7% и,соответственно увеличилась доля пациентов с ХВГВ ($p<0,05$).

Среди носителей HBsAg в 2015 г. несколько ($p>0,05$) уменьшилась доля мужчин (48,7%), в 2002 г. — 53,4%. Среди пациентов с ХВГВ доля мужчин, наоборот, возросла с 58,6 до 61,2% ($p>0,05$).

Среди носителей HBsAg уменьшилась доля молодых (16–29 лет) с 26,4% в 2002 г. до 7,8% в 2015 г. ($p<0,001$), возросла доля лиц в возрасте 50–59 лет (с 12,4 до 26,1%, $p = 0,001$) и старше 60 лет (с 7,4 до 19,1%, $p<0,01$).

Среди пациентов с ХВГВ уменьшилась доля пациентов старше 60 лет с 19,4% в 2002 г. до 5,1% в 2015 г. ($p<0,01$).

Представляет интерес увеличение доли выявленных при донорстве среди носителей HBsAg с 30,9% в 2002 г. до 42,6% в 2015 г. ($p<0,01$). Особо необходимо отметить снижение доли медицинских работников среди пациентов с ХВГВ с 5,7% в 2002 г. до 1,3% в 2015 г., а среди носителей HBsAg — с 9,6 до 4,4%. Отмечается значительное снижение неработающих среди пациентов с ХВГВ — с 35,7 до 12,7%.

Потребители инъекционных наркотиков наблюдались в единичных случаях, как в 2002 г., так и в 2015 г.

**Заключение.** Среди пациентов с хроническими вирусными поражениями печени и с выявленными маркерами парентеральных вирусных гепатитов, состоящих на диспансерном учете в КИЗах поликлиник г. Гомеля, меньше стало носителей HBsAg и больных хроническим вирусным гепатитом *В* в 2015 г. по сравнению с 2002 г. Среди носителей HBsAg уменьшилась доля молодых (16–29 лет), возросла доля лиц в возрасте 50–59 лет. Среди пациентов с хроническим вирусным гепатитом *В* уменьшилась доля пациентов старше 60 лет. Представляет интерес увеличение доли выявленных при донорстве среди носителей HBsAg с 30,9% в 2002 г. до 42,6% в 2015 г. и снижение доли медицинских работников среди пациентов с ХВГВ с 5,7% в 2002 г. до 1,3% в 2015 г.

**Литература**

1. Абдурахманов, Д.Т. Хронический гепатит В и Д / Д.Т. Абдурахманов. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 288 с.

2. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение / Н.Д. Ющук [и др.]. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.

3. Вирусные гепатиты / К.В. Жданов [и др.]. — СПб.: Фолиант, 2011.

4. Медицинская помощь больным с хроническими вирусными гепатитами в г. Москве — основные аспекты (по данным Консультативно-диагностического центра Инфекционной клинической больницы № 1) / Е.А. Нурмухаметова [и др.] // Инфекционные болезни. — 2014. — № 4. — С. 88–98.

5. Хронический вирусный гепатит / Под ред. В.В. Серова, З.Г. Апросиной. — М.: Медицина, 2002. — 384 с.

6. Значимость факторов риска в развитии хронических вирусных гепатитов В и С / О.И. Яхонтов [и др.] // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. — 2002. — № 5. — С. 29–34.

7. Хронический вирусный гепатит: прошлое, настоящее и будущее / В.В. Нечаев [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2013. — № 3. — С. 4–8.

## THE CHANGE IN THE STRUCTURE OF PATIENTS WITH HBV INFECTION BEING UNDER REGULAR MEDICAL CHECK-UP

*Krasavtsev E.L., Booth-Gusaim L.A., Gulko V.A.*

*Educational Establishment "Gomel State Medical University", Gomel, Republic of Belarus*

Among the patients with chronic virus liver damages and persons with detected markers of parenteral viral hepatitis being under regular medical check-up at infectious diseases rooms of Gomel policlinics, the number of HBsAg carriers and people with chronic viral hepatitis *B* decreased in 2015 as against the year of 2002. Among the HBsAg carriers the number of young people (16–29 years) reduced while the number of persons 50–59 years old increased. Among patients with chronic viral hepatitis *B* the number of patients older than 60 reduced. Of special interest is the increase in the number of detected at donorship carriers of HBsAg from 30.9% in 2002 to 42.6% in 2015; and the decrease in the number of medical workers among patients with CVHB from 5.7% in 2002 to 1.3% in 2015.

**Keywords:** HBV infection, chronic viral hepatitis *B*, HBsAg carrier, infectious diseases rooms.

Поступила 19.09.2015

## РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В МОГИЛЕВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2009–2014 гг.

*Булай А.А.[1], Омельянович О.Г.[1], Чайка А.В.[1], Войтенко Н.Т.[1], Счесленок Е.П.[2], Семижон П.А.[2], Школина Т.В.[2], Владыко А.С.[2]*

*[1]Учреждение здравоохранения «Могилевский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Могилев, Республика Беларусь;*

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

**Реферат.** Данная работа является актуальной для здравоохранения, т. к. в ней приводится анализ впервые регистрируемой в Могилевской области геморрагической лихорадки с почечным синдромом. В приведенном ретроспективном анализе выявлена взаимосвязь между уровнем заболеваемости и активностью природных очагов. Свыше 70% пациентов связывают свое заболевание с обитанием грызунов в жилище, по месту работы, даче и др. Профилактические мероприятия должны быть направлены на снижение численности грызунов, ограничение их доступа в места проживания, отдыха, работы людей. На работах, связанных с пылеобразованием (сельское, лесное, коммунальное хозяйство), необходимо предусматривать защиту органов дыхания.

**Ключевые слова:** геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), заболеваемость ГЛПС, эпидемический процесс, эпизоотический процесс, индекс эпизоотической активности очагов (ЭПО).

**Введение.** Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — острая вирусная природно-очаговая зоонозная инфекция человека, характеризующаяся интоксикацией, лихорадкой, почечными и геморрагическими проявлениями [1].

ГЛПС занимает ведущее место в Европе и Азии по числу регистрируемых случаев среди природно-очаговых инфекций. Ежегодно в мире отмечается до 150000 случаев заболевания ГЛПС.

В различных регионах мира в настоящее время циркулирует 8 серотипов хантавирусов: 1) Hantaan; 2) Seoul; 3) Puumala; 4) Prospect Hill; 5) Leaky; 6) Thottapalayam; 7) Dobrava-Belgrade;

8) Maaji (Рекомендации Совещания рабочей группы экспертов Всемирной организации здравоохранения, Сеул, 1991). Наиболее значимыми в этиологии заболеваний человека являются четыре основных ГЛПС-ассоциированных хантавируса, вызывающих у человека заболевание различной тяжести: вирусы Хантаан и Добрава/Белград, вызывающие тяжелую форму ГЛПС с летальностью 5–35%, вирус Сеул — заболевание средней тяжести с летальностью 2–5%, вирус Пуумала, являющийся этиологическим агентом эпидемической нефропатии и вызывающий легкую форму ГЛПС с летальностью 0,3–1,0% [2].

В России в настоящее время ГЛПС занимает первое место среди природно-очаговых инфекций. Заболеваемость различна: в среднем по России заболеваемость ГЛПС довольно сильно колеблется по годам — от 1,9 до 14,1 на 100 тыс. населения. Природными очагами ГЛПС являются Башкирия, Татарстан, Удмуртия, Самарская, Ульяновская области [1].

Проблеме профилактики ГЛПС должно быть уделено особое внимание, прежде всего, из-за тяжелого течения с возможностью развития инфекционно-токсического шока, острой почечной недостаточности с летальным исходом. В Республике Беларусь случаи ГЛПС регистрируются с 1991 г. [3].

ГЛПС занимает ведущую роль среди природно-очаговых инфекций и на территории Могилевской области. Активность природных очагов этой инфекции, регистрация в последние годы заболеваемости определяют актуальность многоплановых исследований этого зооноза, оценки эпидемической и эпизоотической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в области, определение мер по ее профилактике.

**Цель** исследования — оценка эпидемической и эпизоотической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в Могилевской области; определение источников инфекции; выяснение зависимости эпидемических проявлений ГЛПС от эпизоотического потенциала очагов этой инфекции; определение мер по совершенствованию эпиднадзора за ГЛПС.

**Материалы и методы.** Для серологического подтверждения диагноза исследовали парные сыворотки крови от пациентов с помощью непрямого метода иммунофлюоресценции (МФА), применяя коммерческий «Культуральный поливалентный диагностикум ГЛПС для непрямого МФА» производства Федерального государственного унитарного предприятия «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» Российской академии медицинских наук. Тест-система диагностическая рекомбинантная для выявления антител к вирусу геморрагической лихорадки с почечным синдромом методом иммуноферментного анализа «Белар-ГЛПС-АТ» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (РБ) использовалась для анализа сывороток крови методом ИФА.

Метод иммунного блоттинга использовали для подтверждения результатов серологического исследования проб сывороток от пациентов с подозрением ГЛПС, полученных методом МФА и ИФА. Для постановки иммуноблоттинга электроперенос белков (рекомбинантный антиген вируса ГЛПС), разделенных в 15% полиакриламидном геле, на нитроцеллюлозную мембрану (фирма Sigma, размер пор 0,2 мкм) осуществляли полусухим способом в течение 1 ч при силе тока 150 мА. Полоски нитроцеллюлозной мембраны с иммобилизованными белками (стрипы) выдерживали 2 ч в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ), pH 7,4, содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), для блокирования неспецифических мест связывания. Затем инкубировали с первичными и специфическими антителами, разведенными в 100 раз ФСБ, содержащем 0,05% твин 20 и 1% БСА (ФСБ-Т-БСА) в течение 2 ч при постоянном покачивании. После чего отмывали стрипы буфером ФСБ, содержащим 0,05% твин 20 (ФСБ-Т), 3 раза по 5 мин и погружали в раствор антивидового пероксидазного конъюгата, приготовленного на ФСБ-Т-БСА, на 1 ч. После отмывки 2 раза раствором ФСБ-Т и один раз ФСБ стрипы помещали в раствор субстрата, в качестве которого использовали диаминобензидин, растворенный в ФСБ, pH 7,4, содержащем 0,3% перекись водорода. После развития окраски реакцию останавливали, отмывая стрипы трижды дистиллированной водой.

Для выявления антигена вируса ГЛПС в органах грызунов использовали тест-систему диагностическую рекомбинантную иммуноферментную для выявления антигена вируса геморрагической лихорадки с почечным синдромом «Белар-ГЛПС-АГ» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (РБ).

**Результаты и их обсуждение.** По результатам ретроспективного анализа заболеваемости ГЛПС установлено: в Могилевской области циркуляция возбудителя ГЛПС во внешней среде реги-

стрируется с 1987 г. с разной интенсивностью (поражение грызунов возбудителем ГЛПС составляла от 0,7 до 12%), однако до 2009 г. случаев заболеваний у людей не наблюдалось. На сопредельных территориях Российской Федерации заболеваемость данной инфекцией регистрируется ежегодно. Так, в Брянской области заболеваемость в 2013–2014 гг. составила 2,56 и 7,5 на 100 тыс. человек, в Смоленской области соответственно 6,3 и 3,59 на 100 тыс. населения [4].

На территории 19 районов Могилевской области (кроме Круглянского и Хотимского) зарегистрировано 90 природных очагов ГЛПС. Природный очаг — территория, на которой происходит непрерывная циркуляция возбудителя ГЛПС среди основных источников (носителей) [5]. По данным эпизоотологических обследований, поражение грызунов вирусом ГЛПС составляла: в 2010 г. — 2,4%, в 2011 г. — 4,7%, в 2012 г. — 2,7%, в 2013 г. — 5,6%, в 2014 г. — 0,9%.

В связи с повышением настороженности врачей организаций здравоохранения и проведением в больших объемах дифференциальной диагностики заболеваний с клиникой, схожей с ГЛПС, а также в связи с совершенствованием лабораторной диагностики с конца 2009 г. в области начали регистрироваться заболевания ГЛПС у людей. На сегодняшний день Могилевская область вносит основной вклад в формирование среднереспубликанского показателя заболеваемости ГЛПС (таблица 1). Так, наблюдалось превышение республиканского уровня заболеваемости в 5,3 раза в 2014 г. и в 8 раз — в 2010 г. [5].

Таблица 1. — Заболеваемость ГЛПС в Республике Беларусь и Могилевской области в 2009–2014 гг.

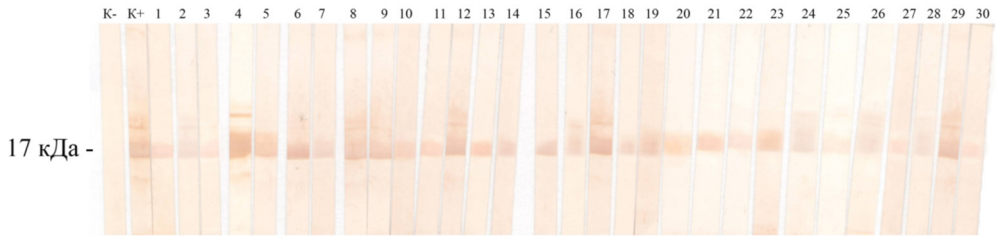
| Годы | Кол-во случаев заболевания ГЛПС в Могилевской области | Показатель заболеваемости на 100 тыс. населения | Кол-во случаев заболевания ГЛПС в Республике Беларусь | Показатель заболеваемости на 100 тыс. населения |
|---|---|---|---|---|
| 2009 | 2 | 0,2 | 2 | 0,021 |
| 2010 | 18 | 1,7 | 20 | 0,21 |
| 2011 | 0 | 0 | 10 | 0,1 |
| 2012 | 38 | 3,5 | 59 | 0,62 |
| 2013 | 126 | 11,6 | 151 | 1,59 |
| 2014 | 52 | 4,8 | 86 | 0,91 |
| Всего | 236 | | 328 | |

По результатам ретроспективного анализа установлено: за 2009–2014 гг. в области зарегистрировано 236 случаев ГЛПС. В разрезе административных территорий наибольшее число случаев заболеваний зарегистрировано в г. Могилеве и Могилевском районе — 131 (55%), а также в районах Мстиславском — 34 (14,4%), Чаусском — 20 (8,4%), Климовичском — 12 (5,8%). Доля остальных административных территорий в общем уровне заболеваемости составила от 1 до 3%. Один случай ГЛПС закончился летальным исходом.

Все случаи заболеваний подтверждены лабораторно: исследования проводились методом РНИФ с использованием диагностикума геморрагической лихорадки с почечным синдромом культурального, поливалентного и методом ИФА с использованием диагностикума «Белар-ГЛПС-АТ».

При исследовании парных сывороток диагностическим считалось нарастание титра антител в повторной пробе крови в 4 раза и более, в случае однократного взятия пробы крови с учетом клинической симптоматики серологическим подтверждением являлось наличие высокого титра антител (1:128 и выше) в исследуемой сыворотке крови [6].

Отдельные пробы (30 штук) были переданы в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии для исследований методом иммуноблоттинга. В результате во всех пробах подтверждено наличие специфических антител к вирусу ГЛПС (рисунок 1).




$K^-$ — антиген ГЛПС, обработанный сывороткой крови, не содержащей антитела к вирусу ГЛПС;
$K^+$ — антиген ГЛПС, обработанный референс-сывороткой, содержащей антитела к вирусу ГЛПС; дорожки 1–30 — антиген ГЛПС, обработанный сыворотками крови от пациентов №№ 1–30 соответственно

**Рисунок 1. — Анализ сывороток крови пациентов методом иммуноблоттинга**

Оперативный анализ заболеваемости ГЛПС установил: заболеваемость спорадическая, групповых случаев заболеваний, связанных с общим местом жительства, работой, совместным отдыхом и т.д., не выявлено. Прослеживается сезонность: основной пик заболевания пришелся на ноябрь–декабрь. В 55,2% случаев заболели городские жители, из них в 31,6% заражение произошло при выезде на дачные участки и в 23,6% — при проживании в частном домовладении. В 65,7% случаев заболеваемость регистрировалась среди мужчин.Наибольшая заболеваемость регистрировалась у пациентов в возрасте от 20 до 40 лет (таблица 2).

Таблица 2. — Распределение заболеваемости ГЛПС по возрасту пациентов

| Возрастной ценз | Заболеваемость ГЛПС, % |
|---|---|
| 10–20 лет | 7,9 |
| 20–30 лет | 23,6 |
| 30–40 лет | 28,9 |
| 40–50 лет | 10,5 |
| 50–60 лет | 21,0 |
| 60 лет и старше | 7,8 |

По роду занятий: 21,3% приходится на работников промышленных и строительных предприятий; 23,6% заболевших ГЛПС заняты в агропромышленном комплексе (животноводы, ветеринарные врачи, механизаторы); 9,2% — работники коммунальных предприятий (дворники, кочегары, сторож); 6,5% — работники и учащиеся учреждений образования; 30,6% — пенсионеры и неработающие; 8,8% — прочие (рисунок 2).

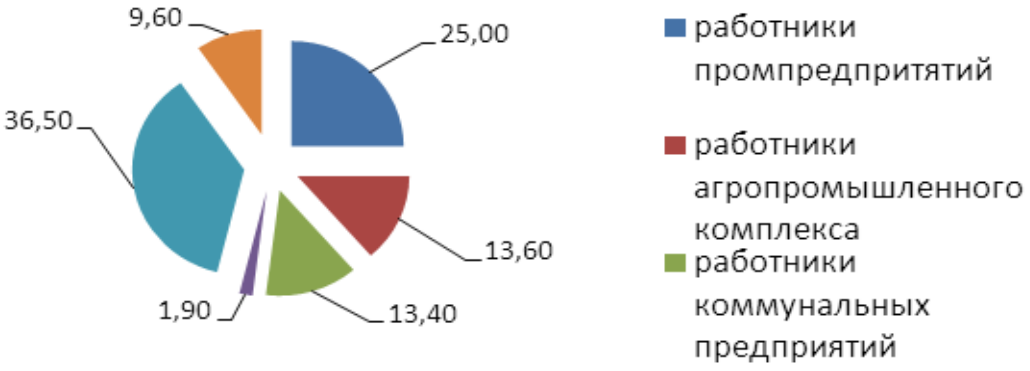



**Рисунок 2. — Структура заболевших ГЛПС жителей Могилевской области в процентном соотношении**

Заражение произошло:

- в 42,1% случаев при проживании в частном домовладении, где имелись мышевидные грызуны;
- в 28,9% — на даче, где также имелись мышевидные грызуны;
- в 15,8% — на работах в сельском хозяйстве;
- в 7,9% случаев заболевшие находились на заработках в России и предположительно там заразились;
- в 5,3% случаев заболевшие проживали в городских квартирах, отрицают наличие мышевидных грызунов по месту жительства и работы и даже предположительно источник заражения не установлен.

Пути передачи возбудителя ГЛПС: воздушно-пылевой (основной — до 90%) и контактный.

В целях совершенствования эпиднадзора за ГЛПС разработан и утвержден в Могилевском облисполкоме на 2011–2015 гг. план мероприятий по профилактике ГЛПС, включающий организационно-методические, санитарно-гигиенические, противоэпидемические, лечебно-профилактические, информационно-образовательные мероприятия.

Планом предусмотрены требования к руководителям организаций и индивидуальным предпринимателям по обеспечению на находящихся в их ведении объектах и прилегающей территории работ по защите зданий и сооружений от грызунов; регулярных дератизационных мероприятий; работ по благоустройству территории [7].

Постоянный мониторинг очагов ГЛПС на территории Могилевской области проводится с 1987 г. Наиболее интенсивные исследования начались после первых эпидемических проявлений ГЛПС в 2009 г. Проведена инвентаризация, картографирование природных очагов ГЛПС. Паспортизация эпидемически значимых объектов (форма паспорта разработана специалистами УЗ «Могилевский облЦГЭиОЗ»), расположенных на территории этих очагов, позволяет отслеживать динамику санитарно-технического состояния объекта.

Проводится систематическое наблюдение за динамикой численности, генеративным состоянием и уровнем инфицированности возбудителем ГЛПС мышевидных грызунов [7].

Учеты численности носителей инфекции проводили в объеме 8–9 тыс. ловушко-суток ежегодно во все сезоны в пунктах стационарных наблюдений и на территориях вновь регистрируемых эпидемических очагов [8].

Наиболее стойкие и активные очаги ГЛПС на территории Могилевской области расположены в широколиственных и хвойно-широколиственных лесах. По результатам анализа зоологической работы установлено: основным носителем вируса ГЛПС является рыжая полевка (до 85%), оставшиеся 15% приходятся примерно в равных долях на мышь домовую, мышь лесную и мышь желтогорлую.

Рассчитывается индекс эпизоотической активности для каждого выявленного очага на основании численности и инфицированности каждого вида носителя вируса ГЛПС за определенный период [8]. Индекс колеблется в разные годы, сезоны и на различных территориях области.

При обобщении данных последних лет выяснилось, что отмечается зависимость заболеваемости населения ГЛПС от эпизоотической активности очагов (ЭПО), численности грызунов и их инфицированности на данной территории (рисунок 3).

В связи с этим в целях своевременной диагностики и профилактики ГЛПС проводились лабораторные обследования в очагах лиц с симптомами, не исключающими ГЛПС (острый нефрит, лептоспироз, гломерулонефрит, грипп, брюшной и сыпной тиф, энцефалит), и лиц, находившихся в одинаковых условиях заражения с лицом, заболевшим ГЛПС [7].

Проводилось эпизоотологическое обследование природных очагов ГЛПС силами зоогруппы Могилевского облЦГЭиОЗ или отделов (отделений) профилактической дезинфекции территориальных ЦГЭ с отловом грызунов для учета их численности и лабораторного исследования на наличие у них хантавирусного антигена. По результатам эпизоотологических обследований установлено:

- в 21% очагов грызуны не обнаружены (по данным контрольно-следовых площадок, отсутствие погрызов, помета);
- в 50% очагов грызуны не отловлены, несмотря на наличие следов их обитания и показания жильцов;
- в 29% очагов грызуны отловлены. По результатам их лабораторного исследования в 15% случаев выявлено носительство возбудителя ГЛПС.

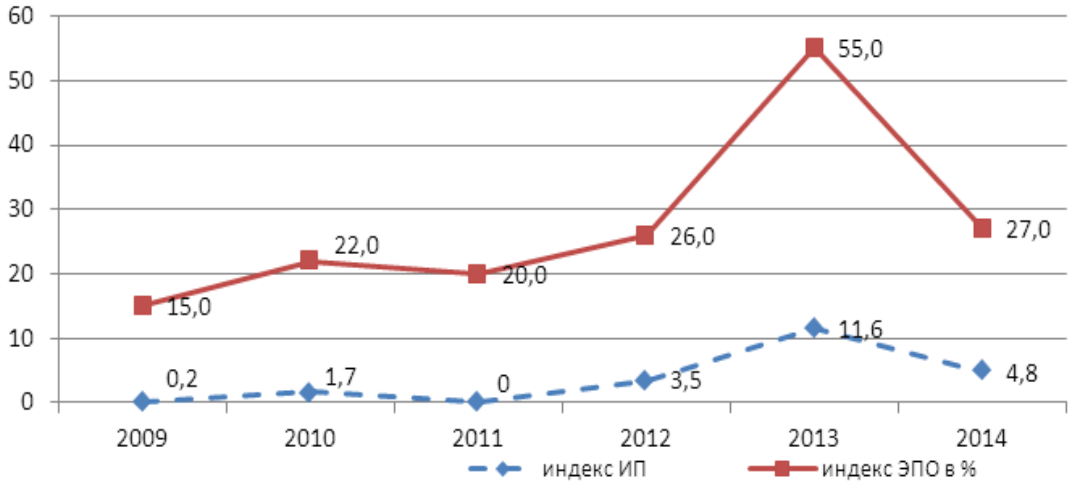



**Рисунок 3. — Динамика интенсивного показателя (ИП) заболеваемости населения (на 100 тыс. населения) и эпизоотической активности очагов (ЭПО) ГЛПС на территории Могилевской области**

В 2013 г. проведены лабораторные исследования 102 проб органов грызунов, отловленных в природных очагах Могилевской области: пробы №№ 1–35 — легкие грызунов, отловленных в Чаусском районе, пробы №№ 1–25 — легкие грызунов, отловленных в Шкловском районе, пробы №№ 1–42 — легкие грызунов, отловленных в Могилевском районе.

Пробы легочной ткани грызунов проанализированы на наличие антигена вируса геморрагической лихорадки с почечным синдромом методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-системы «Белар-ГЛПС-АГ» (таблица 3).

Таблица 3. — Анализ проб легких грызунов на наличие антигена вируса ГЛПС

| Район отлова грызунов в природных очагах ГЛПС | Кол-во анализируемых проб | Кол-во проб, содержащих антиген вируса ГЛПС | Процент случаев носительства возбудителя ГЛПС |
|---|---|---|---|
| Чаусский | 35 | 8 | 22,8 |
| Шкловский | 25 | 4 | 16,0 |
| Могилевский | 42 | 12 | 28,6 |

Из таблицы 3 видно, что наиболее высокий уровень носительства возбудителя ГЛПС выявлен в природных очагах Могилевского района, на административных территориях которого за 2009–2014 гг. зарегистрировано наибольшее число случаев заболеваний ГЛПС — 131 (55%).

Высокий уровень инфицированности возбудителем ГЛПС грызунов, отловленных в природных очагах Могилевской областив 2013 г., вероятно, обусловил подъем заболеваемости ГЛПС (126 случаев) по сравнению с предыдущими годами: 2012 г. — 38, 2011 г. — 0, 2010 г. — 18.

В настоящее время по большинству эпидзначимых объектов обеспечивается проведение дератизационных мероприятий на систематической основе по договорам [9]. Имеет место тенденция к росту объемов дератизационных работ в среднем около 3% в год. В 2014 г. дератизация осуществлялась на 10233 объектах с физической площадью 8081,53 тыс. м$^2$.

**Заключение.** Таким образом, оценивая результаты ретроспективного и оперативного анализа эпидемической ситуации по ГЛПС, анализа многолетней динамики эпизоотологической обстановки в области (широкая циркуляция возбудителя во внешней среде, увеличение индекса эпидопасности очагов, рост пораженности вирусом ГЛПС основных резервуаров инфекции), можно сделать вывод, что в последние годы в области отмечается некоторая активизация эпизоотического процесса по данной инфекции, что закономерно привело к возникновению спорадических случаев заболеваний ГЛПС у населения.

Все зарегистрированные случаи заболевания подтверждены лабораторно.Эпидемические очаги не связаны между собой (по месту проживания, работы, временного пребывания заболевших). По данным медицинского наблюдения, все контактные, имевшие возможность заразиться в тех же условиях, не заболели.

Заражение произошло воздушно-пылевым (основной) или контактным путями по месту работы, жительства либо во время пребывания в сельской местности при сельскохозяйственных, строительных работах. Группы риска: работники промышленных и строительных предприятий, а также занятые в агропромышленном комплексе (животноводы, ветеринарные работники, механизаторы).

Отмечается положительная корреляционная связь между эпизоотической активностью очагов и уровнем заболеваемости населения ГЛПС, что свидетельствует о том, что мышевидные грызуны являются основным источником инфекции при ГЛПС.

Требуется дальнейшая целенаправленная работа по реализации директивных документов по вопросам профилактики ГЛПС с акцентом на обеспечение организации плановых систематических профдезработ как одного из ведущих мероприятий в комплексе задач по профилактике ГЛПС.

**Литература**

1. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в Саратовской области / В.Б. Коротков [и др.]; Рос. науч.-исслед. противочумный ин-т «Микроб». — Саратов, 1996. — 126 с.

2. Суздальцев, А.А. Трудности в диагностике стертых и атипичных форм геморрагической лихорадки с почечным синдромом / А.А. Суздальцев, В.Г. Морозов, В.И. Рощупкин // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2003. — № 4. — С. 52–54.

3. Государственный санитарный надзор в области общей инфекционной и паразитарной заболеваемости [Электронный ресурс] // Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Беларусь в 2014 году». — Минск: РЦГЭиОЗ, 2015. — Раздел III. — С. 44–45. — Режим доступа: http://www.rcheph.by/upload/iblock/9af/gosudarstvennyy-doklad.zip. — Дата доступа: 17.09.2015.

4. Обзорная информация об инфекционной заболеваемости в Брянской области [Электронный ресурс] / Упр. Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Брянской обл. — Режим доступа: http://32.rospotrebnadzor.ru.— Дата доступа: 18.04.2015.

5. Ежемесячные и годовые отчеты УЗ «Могилевский облЦГЭиОЗ» (форма 6).

6. Лабораторная диагностика геморрагической лихорадки с почечным синдромом [Электронный ресурс]: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 24.12.2010 № 116-1210. — Режим доступа: http://med.by/methods/pdf/116-1210.pdf. — Дата доступа: 01.09.2015.

7. Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение заноса, возникновения и распространения геморрагической лихорадки с почечным синдромом [Электронный ресурс]: санитарные нормы и правила: утв. постановлением М-ва здравоохр. Респ. Беларусь 26.12.2013 № 131. — Режим доступа: http://minzdrav.gov.by/dadvfiles/000393_951204_PostMZ_N131_2013_Sanpin.doc. — Дата доступа: 01.09.2015.

8. Инструкция3.6.11-17-16-2003 «Организация зоолого-паразитологической работы при эпизоотологическом обследовании территорий, энзоотичных по природно-очаговым инфекциям»:утв. постановлением Гл. гос. сан. врача Респ. Беларусь 11.08.2003 № 86.

9. Инструкция 3.5.3.10-22-95-2005 «Методы борьбы с синантропными грызунами»: утв. постановлением Гл. гос. сан. врача Респ. Беларусь 28.12.2005 № 267.

## RETROSPECTIVE ANALYSIS OF THE HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME MORBIDITY IN MOGILEV REGION, 2009–2014

*Bulai A.A.[1], Omelyanovich O.G.[1], Chaika A.V.[1], Voitenko N.T.[1], Scheslenok E.P.[2], Semizhon P.A.[2], Shkolina T.V.[2], Vladyko A.S.[2]*

*[1]Healthcare Institution "Mogilev Region Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health", Mogilev, Republic of Belarus;*

*[2]State Institution "Republican Research & Practical Centre for Epidemiology and Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

This work is relevant to public health, as it provides an analysis of the first recorded in the Mogilev region the Hantavirus hemorrhagic fever with renal syndrome. In this retrospective analysis is revealed the

relationship between the incidence and activity of natural foci. More than 70% of people associate their disease with rodents that live in their home, the workplace, the village or other. Preventive measures should be focused on reducingthe number of rodents, limiting their access to places of living, leisure or workplace. In jobs related to dusting (agriculture, forestry, public utilities) to provide respiratory protection.

**Keywords:** hantavirus hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), HFRS morbidity, epidemic process, epizootic process, natural foci epizootic activityindex.

Поступила 19.09.2015

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИЕРСИНИОЗОВ В ОЧАГАХ РАСПРОСТРАНЕНИЯ

*Счесленок Е.П.[1], Касницкая Т.Н.[1], Семижон П.А.[1], Сержант Е.А.[2], Дубков Н.А.[1], Владыко А.С.[1], Федорович Е.В.[2]*

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

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

**Реферат.** Проведен скрининг на наличие возбудителей иерсиниозов проб, полученных из объектов окружающей среды (смывы с оборудования (весы) и тары для хранения овощей), и образцов органов мелких грызунов (суспензия кишечника) с использованием высокочувствительного метода ПЦР в режиме «реального времени» с универсальными праймерами. Показано, что использование метода ПЦР для анализа проб материала, прошедшего «холодовое» обогащение (выявляемость 22%), по сравнению с бактериологическими методами (выявляемость 0%) позволило значительно повысить эффективность обнаружения возбудителей иерсиниозов в очагах распространения.

**Ключевые слова:** кишечный иерсиниоз, псевдотуберкулез, объекты окружающей среды, мелкие грызуны, полимеразная цепная реакция.

**Введение.** В течение последних 30 лет проблема заболеваний, вызываемых энтеропатогенными иерсиниями, остается в центре внимания не только микробиологов, но и врачей самых разных специальностей во всем мире и основные причины этому следующие:

- повсеместное распространение и растущая заболеваемость иерсиниозом и псевдотуберкулезом;
- выраженный полиморфизм клинических проявлений и частое развитие осложнений в ходе инфекционного процесса;
- своеобразный патогенез иерсиниозной инфекции;
- фенотипическая и генотипическая близость *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* к *Yersinia pestis* — возбудителю чумы.

В настоящее время род *Yersinia* включает 11 видов бактерий. Из них 3 вида — *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica* — являются хорошо изученными возбудителями инфекционных болезней человека [1].

Кишечный иерсиниоз и псевдотуберкулез — самостоятельные, острые инфекционные заболевания, относящиеся к зоонозам и характеризующиеся полиморфизмом клинических проявлений с поражением ЖКТ, кожи, опорно-двигательного аппарата и других органов [2]. Заболевания людей псевдотуберкулезом и кишечным иерсиниозом регистрируются на всей территории Республики Беларусь.

Несмотря на достигнутые успехи в изучении многих аспектов проблемы иерсиниозов, актуальность этих инфекций сохраняется. Важной особенностью возбудителей указанных заболеваний является изменение их биологических свойств, а также пейзажа циркулирующих *Yersinia*, снижение доли ранее доминирующих серотипов и выявление новых серо-биотипов, ранее считавшихся непатогенными [1].

Иерсиниозы составляют значительную долю т. н. кишечных инфекций невыясненной этиологии, и только качественные лабораторные исследования позволяют поставить достоверный диагноз,

оценить степень инфицированности природных хозяев и степень контаминирования объектов окружающей среды, без которых невозможны целенаправленные противоэпидемические мероприятия. Экологические и эпидемиологические особенности иерсиний обосновывают необходимость постоянного микробиологического мониторинга циркуляции возбудителей в очагах распространения с использованием современных знаний о биологических свойствах иерсиний и эффективных диагностических методов и средств в целях предупреждения инфицирования людей.

В связи с этим в настоящее время особое значение придается молекулярно-биологическим методам исследования: полимеразная цепная реакция (ПЦР), мультипраймеровая ПЦР, секвенирование, которые используются как для диагностики иерсиниозов, так и для изучения генетического разнообразия иерсиний, сходства и различий популяций, циркулирующих в разных странах мира [3].

**Цель** исследования — использование ПЦР для оценки инфицированности иерсиниями природных хозяев и обнаружения возбудителей в объектах окружающей среды.

**Материалы и методы.** Подготовку проб полевого материала (суспензия кишечника грызунов) и проб смывов с объектов окружающей среды проводили согласно приложению 1 к Санитарным правилам и Ветеринарным правилам [4].

В качестве референс-штаммов использовали чистые бактериальные культуры *Yersinia pseudotuberculosis*, серотип 0:1b, «Могилев», и *Yersinia enterocolitica* 345, зарегистрированные в Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека (№ В-2/15 и № В-1/15 от 04.06.2015 соответственно). Бактерии культивировали при 26°С на питательных средах LB и MacConkey.

Для выделения ДНК из анализируемого материала и чистой бактериальной культуры использовали набор «ДНК-сорб-В» фирмы «АмплиСенс», Российская Федерация. Все манипуляции проводились согласно инструкции, прилагаемой к набору.

Обнаружение возбудителей иерсиниозов в анализируемом материале проводили методом ПЦР с универсальными праймерами для выявления ДНК иерсиний в режиме «реального времени»: UF2 — 5’-GGCGGCAGGCCTAAC-3’; UR2 — 5’-CAGGCAGTTTCCCAGACATTACT-3’; YE3-FAM — 5’-FAM-GTAAACTACTTCCCGCTGCCGCTCG- BHQ1-3’.

Режим амплификации:

I. 95ºС — 10 мин
II. 95°С — 15 с
60°С — 45 с
72°С — 1 мин
} 45 циклов

Коммерческая диагностическая тест-система «АмплиСенс *Yersinia enterocolitica*/ *pseudotuberculosis*-FL» (РФ) была использована для выявления ДНК возбудителей иерсиниозов методом ПЦР в режиме «реального времени» с целью их дифференциации. Все манипуляции проводились согласно инструкции, прилагаемой к набору.

**Результаты и их обсуждение.** Использование метода ПЦР в диагностике инфекционных заболеваний имеет ряд преимуществ: быстрота выполнения анализа (до 6 ч), информативность, высокая чувствительность и специфичность. Исследованию методом ПЦР может быть подвергнут практически любой материал, как клинический (испражнения, кровь, смыв из зева и т. д.), так и материал из очагов (тонкий кишечник и помет грызунов, смывы с овощей и корнеплодов, инвентаря, тары и оборудования, пищевые продукты растительного и животного происхождения и готовые блюда из них, вода из емкостей для хранения и открытых водоемов, почва) [5].

Для первичного скрининга на наличие возбудителей иерсиниозов в пробах, полученных из объектов окружающей среды (мывы с оборудования (весы) и тары для хранения овощей), и образцов органов мелких грызунов (суспензия кишечника) методом ПЦР были подобраны универсальные праймеры и гибридизационная проба, специфичные к нуклеотидной последовательности консервативной области гена 16S rRNA *Enterobacteriaceae* [6]. Универсальная пара праймеров ограничивает фрагмент размером 101 п.о. (последовательность в геноме *Yersinia enterocolitica* 18–118 и геноме *Yersinia pseudotuberculosis* 3–103). Позиции меченной флюорофором гибридизационной пробы в геноме *Yersinia enterocolitica* 43–67 и *Yersinia pseudotuberculosis* 28–52 (рисунок 1).

Z49830 А

```
  1  GGCTCAGATT GAACGCTGGC GGCAGGCCTA ACACATGCAA GTCGAGCGGC AGCGGGAAGT AGTTTACTAC TTTGCCGGCG AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA
     CCGAGTCTAA CTTGCGACCG CCGTCCGGAT TGTGTACGTT CAGCTCGCCG TCGCCCTTCA TCAAATGATG AAACGGCCGC TCGCCGCCTG CCCACTCATT

101  TGTCTGGGAA ACTGCCTGAT GGAGGGGGAT AACTACTGGA AACGGTAGCT AATACCGCAT AACGTCTTCG GACCAAAGTG GGGGACCTTC GGGCCTCACG
     ACAGACCCTT TGACGGACTA CCTCCCCCTA TTGATGACCT TTGCCATCGA TTATGGCGTA TTGCAGAAGC CTGGTTTCAC CCCCTGGAAG CCCGGAGTGC
```

- красный шрифт — последовательность праймеров;
- зеленый шрифт — последовательность гибридизационной пробы

HG326185.1 Б

```
  1  CTGGCGGCAG GCCTAACACA TGCAAGTCGA GCGGCAGCGG GAAGTAGTTT ACTACTTTGC CGGCGAGCGG CGGACGGGTG AGTAATGTCT GGGGATCTGC
     GACCGCCGTC CGGATTGTGT ACGTTCAGCT CGCCGTCGCC CTTCATCAAA TGATGAAACG GCCGCTCGCC GCCTGCCCAC TCATTACAGA CCCCTAGACG

101  CTGATGGAGG GGGATAACTA CTGGAAACGG TAGCTAATAC CGCATGACCT CGCAAGAGCA AAGTGGGGGA CCTTAGGGCC TCACGCCATC GGATGAACCC
     GACTACCTCC CCCTATTGAT GACCTTTGCC ATCGATTATG GCGTACTGGA GCGTTCTCGT TTCACCCCCT GGAATCCCGG AGTGCGGTAG CCTACTTGGG
```

- зеленый шрифт — последовательность праймеров;
- красный шрифт — последовательность гибридизационной пробы

**Рисунок 1. — Последовательность гена 16S rRNA: А — *Yersinia enterocolitica* (GenBank, Z49830); Б — *Yersinia pseudotuberculosis* (GenBank,HG326185.1)**

Специфичность праймеров и гибридизационной пробы была показана постановкой ПЦР в режиме «реального времени» на матрицах ДНК референс-штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* (2 пробы) и *Yersinia enterocolitica* (2 пробы). В результате проведения ПЦР с универсальными праймерами UF2, UR2 и зондом YE-3 FAM на матрицах ДНК возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза амплифицировались специфические продукты реакции, о чем свидетельствовало наличие флуоресценции, регистрируемой по каналу FAM (рисунок 2).

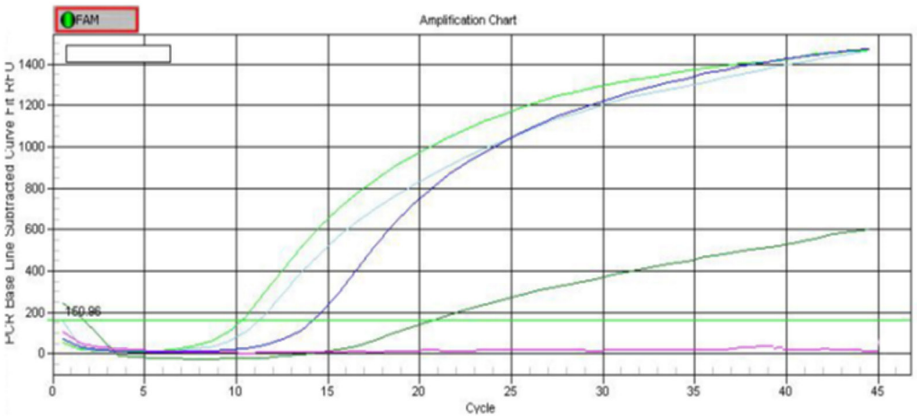



**Рисунок 2. — Анализ ДНК-матриц возбудителей иерсиниозов ПЦР в режиме «реального времени» с использованием универсальных праймеров**

В результате исследований показана высокая чувствительность метода ПЦР в режиме «реального времени» с универсальными праймерами. Оценку чувствительности проводили с использованием ДНК *Yersinia enterocolitica* (24 нг/мкл), которая была разведена десятикратно, и препараты ДНК в разведении от $10^{-1}$ до $10^{-6}$ были использованы в качестве матрицы для постановки ПЦР. В результате наличие специфической флуоресценции наблюдалось во всех анализируемых пробах ДНК и минимальное количество ДНК, выявляемое в пробе, составило 0,24 пикограмма, что соответствует $1 \times 10^3$ ГЭ/мл (рисунок 3).

Первоначально проводили исследования на наличие возбудителей иерсиниозов в полевом материале (тонкий кишечник мелких грызунов) и пробах, полученных из объектов окружающей среды: смывы с оборудования (весы, подтоварники) и тары для хранения овощей, с использованием стандартных бактериологических методов [8]. Анализируемый материал помещали в среду накопления (фосфатно-буферный раствор) и инкубировали при температуре +4°С – +8°С, используя метод «холодового» обогащения для повышения концентрации иерсиний в исследуемом материале. На 2–3,

5–7, 10 и 14-е сут осуществляли высев со среды обогащения на дифференциально-диагностические среды (иерсиния-агар). Однако при данных манипуляциях ни в одной из анализируемых проб возбудители иерсиниозов выявлены не были.

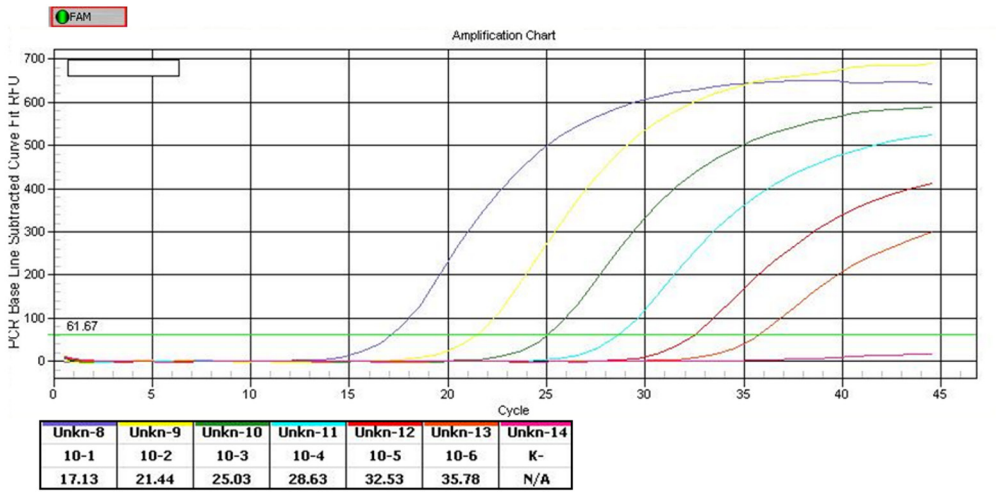


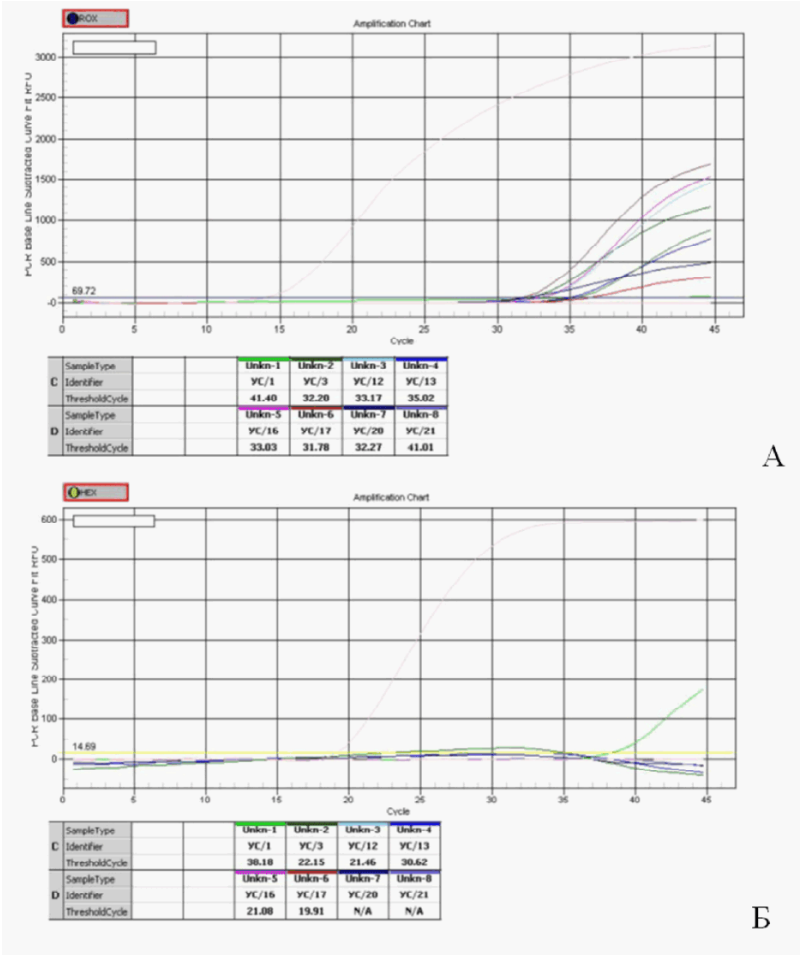

**Рисунок 3. — Оценка чувствительности ПЦР с универсальными праймерами**

Основываясь на данных российских исследователей, которые предложили схему бактериологической диагностики иерсиниоза с одновременным использованием экспресс-методов [7], нами в качестве экспресс-метода была использована подобранная и оптимизированная ПЦР в режиме «реального времени» с универсальными праймерами. Для исследований методом ПЦР из всех проб, прошедших 14-суточное обогащение, была выделена ДНК. Пробы ДНК использовали для постановки реакции с целью выявления ДНК иерсиний. В результате из 77 анализируемых проб ДНК иерсиний была выявлена в 17 пробах. Коммерческую диагностическую тест-систему «АмплиСенс *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*-FL» использовали для подтверждения полученных результатов и дифференциации иерсиний. В результате исследований в 16 пробах была выявлена ДНК *Yersinia enterocolitica* и в одной пробе — ДНК *Yersinia pseudotuberculosis*. На рисунке 4 представлены результаты анализа 9 проб смывов с оборудования, в которых была выявлена ДНК иерсиний, с использованием тест-системы «АмплиСенс *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*-FL».

Из рисунка видно, что в 8 исследуемых пробах идентифицирована ДНК *Yersinia enterocolitica* и в одной пробе — ДНК *Yersinia pseudotuberculosis*, о чем свидетельствует наличие продуктов специфической амплификации, регистрируемых в виде кривых флюоресценции по каналам ROX и HEX, соответственно.

Анализ полученных результатов показал, что применение только бактериологических методов не позволило обнаружить возбудителей иерсиниозов в исследуемом материала, в то же время выявляемость иерсиний в пробах, прошедших «холодовое» обогащение с использованием более чувствительного метода ПЦР, составила 22% (таблица). Данные, полученные в результате исследований, согласуются с результатами российских ученых, которые показали, что использование ПЦР для обнаружения иерсиний в объектах окружающей среды значительно повышает процент выявляемости возбудителей (10,7%) по сравнению с выделением чистой бактериальной культуры (0,28%) [9].

**Заключение.** Показано, что использование метода ПЦР в режиме «реального времени» с универсальными праймерами для анализа собранного материала (органы грызунов, смывы с оборудования и тары для овощей) позволило значительно повысить эффективность выявления возбудителей иерсиниозов в очагах их распространения.




Продукты специфической амплификации, регистрируемые по каналу ROX (А) и по каналу HEX (Б)

**Рисунок 4. — Результат идентификации возбудителей иерсиниозов с использованием коммерческой тест-системы «АмплиСенс *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*-FL»**

Таблица — Результат анализа проб на наличие возбудителей иерсиниозов

| Исследуемые образцы | Кол-во проб | Результат бактериологического исследования | Результат исследования ПЦР с универсальными праймерами | Результат дифференциации *Yersinia* |
|---|---|---|---|---|
| Смывы с оборудования, отобранные специалистами УЗ «Мозырский зональный центр гигиены и эпидемиологии» | 39 | *Yersinia* не обнаружены | В 9 пробах выявлена ДНК *Yersinia* | ДНК *Yersinia enterocolitica* — 8 проб<br>ДНК *Yersinia pseudotuberculosis* — 1 проба |
| Грызуны, отловленные на территории Ивановского района | 11 | *Yersinia* не обнаружены | В 3 пробах выявлена ДНК *Yersinia* | ДНК *Yersinia enterocolitica* — 3 пробы |
| Грызуны, отловленные на территории Пинского района | 15 | *Yersinia* не обнаружены | В пробах ДНК *Yersinia* не выявлена | – |
| Грызуны, отловленные на территории Дрогичинского района | 12 | *Yersinia* не обнаружены | В 5 пробах выявлена ДНК *Yersinia* | ДНК *Yersinia enterocolitica* — 5 проб |
| Всего | 77 | 0 | 17 | 16 — ДНК *Yersinia enterocolitica*<br>1 — ДНК *Yersinia pseudotuberculosis* |

**Литература**

1. Ценева, Г.Я. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний / Г.Я. Ценева, Н.Ю. Солодовникова, Е.А. Воскресенская // Клинич. микробиол. антимикроб. химиотер. — 2002. — № 3. — С. 248–266.

2. Иерсинии и иерсиниозы / Под ред. Г.Я. Ценевой. — СПб., 2006. — С. 5, 6, 21, 28.

3. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections / M. Fredriksson-Ahomaa [et al.] // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 2006. — Vol. 47. — P. 315–329.

4. Состояние здоровья населения в связи с влиянием микробиологического фактора среды обитания человека. Иерсиниозы: санитарные правила и ветеринарные правила: утв. постановлением М-ва здравоохр. и М-ва сельск. хоз-ва и продовол. Респ. Беларусь 31.12.2002 № 150/35.

5. Совершенствование лабораторной диагностики псевдотуберкулеза с помощью ПЦР / В.Т. Климов [и др.] // Молекул. генетика. — 2002. — № 4. — С. 39–41.

6. Sen, K. Multiplex PCR for detection of Enterobacteriaceae in blood / K. Sen, D.M. Asher // Transfusion. — 2001. — Vol. 41. — P. 1356–1364.

7. Алгоритм лабораторной диагностики иерсиниозов / М.В. Чеснокова [и др.] // Дальневост. журн. инфекц. патол. — 2010. — № 17. — С. 188–192.

8. Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза : инструкция по применению: утв. Гл. гос. сан. врачом Респ. Беларусь 19.03.2010 № 076-0210.

9. Молекулярно-биологические методы идентификации иерсиний, циркулирующих на территории Якутии / О.Н. Софронова [и др.] // Дальневост. журн. инфекц. патол. — 2012. — № 20. — С. 77–83.

## POLYMERASE CHAIN REACTION FOR YERSINIOSIS DETECTION IN NATURAL FOCI

*Scheslenok E.P.[1], Kasnitskaya T.N.[1], Semizhon P.A.[1], Serzhant E.A.[2], Dubkov N.A.[1], Vladyko A.S.[1], Fedorovich E.V.[2]*

*[1]State Institution "Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;*

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

The screening for the presence of yersinia pathogens in samples obtained from environmental objects (swabs from equipment (scales) and containers for storing vegetables) and samples from small rodents organs (intestine suspension) using highly sensitive real-time polymerase chain reaction (PCR) with universal primers has been done. It was shown that PCR using for analysis of samples exposed to cold enrichment (22% revealed) in comparison to bacteriological methods (0% revealed) allows improve the efficiency of the pathogens detection in natural foci.

**Keywords:** intestinal yersiniosis, pseudotuberculosis, environmental objects, small rodents, polymerase chain reaction.

Поступила 11.09.2015

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗИСТЕНТНОСТИ К БЕТА-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ И СУЛЬФАНИЛАМИДАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

*Носова Е.С.[1], Титов Л.П.[1], Клюйко Н.Л.[2], Горбачева Е.С.[3], Евсеенко Е.О.[4], Кабышева И.М.[4], Мельникова М.О.[4]*

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

*2Учреждение здравоохранения «Городская детская инфекционная клиническая больница», Минск, Республика Беларусь;*

*[3]Государственное учреждение «Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь;*

*[4]Учреждение здравоохранения «Могилевский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Могилев, Республика Беларусь*

**Реферат.** Охарактеризованы молекулярно-генетические маркеры резистентности изолятов *H. influenzae*. Полученные данные о субстратном профиле устойчивых изолятов гемофил позволяют

оценить механизмы устойчивости к бета-лактамным антибиотикам. Проведен ПЦР-скрининг генов устойчивости к бета-лактамным антибиотикам и сульфаниламидам.

**Ключевые слова:** гемофильная палочка, резистентность, бета-лактамные антибиотики, сульфаниламиды.

**Введение.** Гемофильная палочка — второй по частоте бактериальный возбудитель острых респираторных заболеваний (синусита, отита, конъюнктивита, пневмонии) [1]. Наибольшее значение в патологии человека имеют капсульные *H. influenzae* серологического типа b (ХИБ). ХИБ является третьим возбудителем бактериальных менингитов, ведущим фактором обострения у взрослых, страдающих хроническими обструктивными заболеваниями легких и муковисцидозом [1, 2]. Основными препаратами для лечения острых гнойно-воспалительных заболеваний в амбулаторных условиях являются *β*-лактамные антибиотики. Данные об антибиотикорезистентности и контролируемых генах позволяют получить представление об эффективности антибиотикотерапии, учитывая механизм формирования устойчивости к антибактериальным средствам, и определить возможность коррекции лечения инфекций.

**Цель** исследования — изучение фенотипов и механизмов резистентности к антимикробным препаратам изолятов *H. influenzae*.

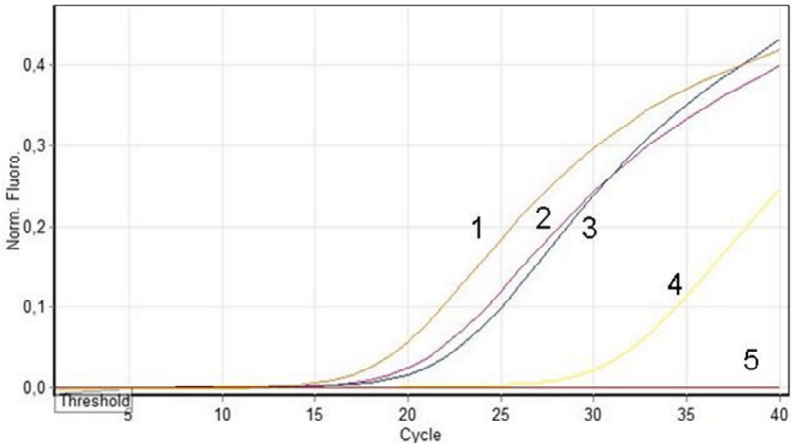
**Материалы и методы.** В работе использованы клинические изоляты *H. influenzae* ($n = 71$), в т. ч. *H. influenzae* серологического типа *b* ($n = 35$), референтный штамм *H. influenza*e ATCC 9795. Культуры выделены из клинического материала: мазки из зева, миндалин, со слизистой носа и уха, гноя верхнечелюстной пазухи, крови, ликвора пациентов с диагнозами лакунарная ангина, гнойный отит, верхнечелюстной синусит, острый гнойный менингит, хронический тонзиллит, а также при диагностическом обследовании. Клинический материал получен от пациентов, госпитализированных в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница», при обращениях в УЗ «Могилевская центральная поликлиника», УЗ «Могилевский областной ЦГЭиОЗ», Минского областного ЦГЭиОЗ. Для культивирования *H. influenzae* использовали шоколадный агар. Питательную среду готовили с добавлением 2%-го раствора гемоглобина (BBL), в качестве основы использовали колумбийский агар (BBL). Для улучшения ростовых свойств в охлажденный до температуры 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%. Чувствительность гемофил к антимикробным препаратам проводили диско-диффузионным методом на среде для тестирования чувствительности к антибиотикам НТМ (Oxoid). Определяли зоны подавления роста ампициллина, ампициллин-сульбактама, амоксициллин/клавулановой кислоты, цефалотина, цефуроксима, цефаклора, цефтазидима, цефепима, тетрациклина, офлоксацина, ко-тримаксозола, рифампицина, хлорамфеникола.

Для анализа генетических детерминант устойчивости к β-лактамным препаратам был выбран клинически значимый ген *TEM β*-лактамаз молекулярного класса А. Детекцию гена *TEM* проводили методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Для анализа генетических детерминант устойчивости к сульфаниламидам использовали праймеры к генам (*folP*, *sul1*, *sul2*, *strA* и *strB*).

**Результаты и их обсуждение.** Этиотропное лечение инфекций, вызываемых *H. influenzae*, невозможно без учета эпидемиологических данных определения чувствительности к антибиотикам. Определение резистентности *H. influenzae* является методом типирования, позволяет подобрать антибактериальное средство для терапии [3, 4]. Исследована чувствительность 71-й клинической культуры *H. influenzae* к 12 антибактериальным препаратам. Наибольшей активностью в отношении изучаемых клинических штаммов *H. influenzae* обладали ингибиторозащищенный амоксициллин-сульбактам, цефалоспорины II–IV поколений, тетрациклин. При оценке фенотипов резистентности гемофил было выявлено, что 76,6% изолятов проявили чувствительность ко всем исследуемым антибактериальным препаратам. Наименьшей активностью обладал ампициллин и ко-тримаксозол (сульфаметоксозол триметоприм); к ним проявили резистентность 22 и 21,1% соответственно изолятов. Культуры обладали ко-резистетностью к ко-тримаксозолу и ампициллину. При анализе результатов определения чувствительности к антибиотикам изолятов ХИБ ($n = 36$) отмечена низкая активность ампициллина. К нему устойчивы были 11% ($n = 4$) исследованных штаммов; из них 3 культуры проявили резистентность к трем или четырем препаратам разных групп — *β*-лактамным (ампициллин, цефалотин), фторхинолону и сульфаниламиду.

В оториноларингологической практике основными препаратами для лечения острых гнойно-воспалительных заболеваний в амбулаторных условиях являются *β*-лактамные антибиотики. Бета-лактамные антибиотики применяют для эмпирической терапии, в связи с этим особое внимание в системе эпидемиологического мониторинга антибиотикорезистентности микроорганизмов уделяется определению устойчивости и выявлению механизмов к этому классу препаратов [4–6]. Частота резистентных штаммов к ампициллину составила 22%, ампициллин-сульбактаму — 4,2%, цефалоспорину I поколения (цефалотину) — 19,7%. Резистентность к бета-лактамам у штаммов гемофил является результатом продукции *β*-лактамаз или снижением аффинности пенициллинсвязывающих белков [6–8]. Изоляты, резистентные к ампициллину и чувствительные к действию ингибитора (сульбактама) ($n$ = 14), рассматривались подозрительными на продукцию бета-лактамаз. Изоляты с повышенной резистентностью к ампициллину, ампициллин-сульбактаму, цефалотину ($n$ = 3), что составило 4,2%, относили к категории ампициллинрезистентных бета-лактамаза не продуцирующих (БЛНАР). Появление изолятов БЛНАР является свидетельством селективного давления широкого применения бета-лактамов [6, 9, 10]. Предполагается, что штаммы, для которых МИК ампициллина ≥1 мкг/мл имеют предрасположенность для устойчивости к *β*-лактамным антибиотикам [4, 11].

Повышение уровня МИК ампициллина и чувствительность к действию ингибиторов является маркером продукции *β*-лактамаз молекулярного класса А *TEM*-типа . При ПЦР-скрининге специфичный фрагмент гена *TEM* был выявлен у 15 изолятов. ПЦР-амплификация фрагмента гена *TEM* с ДНК *H. influenzae* представлена на рисунке.




Линии 1–4 — ДНК *H. Influenza*; 5 — «–» отрицательный контроль

**Рисунок — Результат амплификации с праймерами для гена *TEM***

Изоляты *H. influenzae* сохраняют чувствительность к бета-лактамным антибиотикам (77–100%), а доля бета-лактамаза продуцирующих ампициллинорезистентных (18%) и БЛНАР (4,2%) штаммов не высока и сопоставима с международными исследованиями [6, 9, 10].

В последние несколько десятилетий ко-тримоксазол (антибактериальная комбинация триметоприма и сульфаметоксазола, «Бисептол») широко использовали для лечения инфекций верхних дыхательных путей и кишечных, септического артрита, вызванного безкапсульными гемофилами; препарат является также альтернативным для лечения пациентов с аллергией к бета-лактамам. Устойчивость к ко-тримоксазолу связана с гиперпродукцией дигидрофолатредуктазы, нарушением проницаемости клеточной стенки, плазмидной устойчивостью вследствие выработки триметоприм-резистентных вариантов дигидрофолатредуктазы [12]. Повышенные уровни резистентности к ко-тримаксозолу проявили 21% ($n$ = 15) культур гемофил. Для анализа генетических детерминант устойчивости к сульфаниламидам были амплифицированы участки генов (*folP*, *sul1*, *sul2*, *strA* и *strB*), отвечающие за развитие резистентности, кодирующие ферменты дегидрофолатредуктазу и дегидроптероатсинтетазу. При ПЦР-скрининге специфичный фрагмент гена *folP* размером 500 п.о. гена дегидрофолатсинтетазы был выявлен у всех 15 изолятов. Специфичные фрагменты генов *sul2* и *strA* размерами 280 и 400 п.о. были выявлен у 9 (60%) штаммов. Гены *sul1* и *strB* не были выявлены. Присутствие гена *folP* является главным фактором, определяющим резистентность к сульфаниламидам [12]. Исследуемые гены не были выявлены у изолятов, относившихся к категории чувствительных.

**Заключение.** Наибольшей активностью в отношении изучаемых клинических штаммов *H. influenzae* обладали ингибиторозащищенный амоксициллин-сульбактам, цефалоспорины II–IV поколений, тетрациклин. При выборе препарата необходимо знать региональную ситуацию с антибиотикорезистентностью *H. influenzae*. Учитывая результаты выявления чувствительности, в наборы для тестирования клинических изолятов *H. influenzae* необходимо включать ампициллин, ингибиторзащищенные препараты, цефалоспорины I и II поколения, препараты, которые предполагается использовать для терапии. Повышенные уровни резистентности к бета-лактамным антибиотикам (ампициллину и цефалоспорину I поколения) определяются наличием генов бета-лактамаз *TEM*-типа. Обнаружение генов резистентности требует корректировки схем лечения. Распространенность изолятов гемофил с повышенным профилем резистентности недооценивается из-за целого ряда методологических проблем.

**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. Glob. Health. — 2013. — Vol. 3. — P. 1–14.

2.Worldwide Haemophilus influenza type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates / H. Peltola [et al.] // Clin. Microb. Rev. — 2000. — Vol. 13. — P. 302–317.

3.Molecular typing methods for outbreak detection and surveillance of invasive disease caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenza* and *Streptococcus pneumoniae*, a review / O. B. Harrison [et al.] // Microbiol. — 2011. — Vol. 157. — P. 2181-2195.

4.Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae* decreased, except for b-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.

5.Characterization of extended-spectrum b-lactamase-producing isolates of *Haemophilus parainfluenzae* / S. Tristram [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. — 2008. — Vol. 61. — P. 509–514.

6.*Haemophilus influenzae* and *β*-lactam resistance: description of bla *TEM* gene deletion / J. Molina [et al.] // Rev. Esp. Quimioter. — 2003. — Vol. 16. — P. 195–203.

7.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.

8.Fitness trade-offs in bla *TEM* evolution / J. Mroczkowska [et al.] // Antimicrob. Chemother. — 2008. — Vol. 52 — P. 2340–2345.

9.Evaluation of disk diffusion methods to detect low-level beta-lactamase negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* / N. Norskov-Lauritsen [et al.] // APMIS — 2011. — Vol. 119. — P. 385–392.

10. Global distribution of T*EM-1* and *ROB-1* β-lactamases in *Haemophilus influenza* / D.J. Farrell [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. — 2005. — Vol. 56. — P. 773–776.

11. Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to *β*-lactam susceptibility, of *Haemophilus influenzae* isolates exhibiting decreased susceptibility to *β-lactam* resistance markers / D. Sevillano [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. — 2009. — Vol. 53. — P. 267–270.

12. Molecular insights of co-trimoxazole resistance genes in *Haemophilus influenza*e isolated in Malaysia / Z. Mohd-Zain [et al.] // Trop. Biomed. — 2013. — Vol. 30. — P. 584–590.


## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF RESISTANCE OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* CLINICAL ISOLATES TO BETA-LACTAM ANTIBIOTICS AND SULFONAMIDES


*Nosova E.S.[1], Titov L.P.[1], Kluiko N.L.[2], Gorbacheva E.S.[3], Evseenko E.O.[4], Kabysheva I.M.[4], Melnikova M.O.[4]*

*[1]State Institution "Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;*

*[2]Healthcare Institution "Municipal Children Infectious Hospital", Minsk, Republic of Belarus;*

*[3]State Institution "Minsk Region Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health", Minsk, Republic of Belarus;*

*[4]Healthcare Institution "Mogilev Region Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health", Mogilev, Republic of Belarus*



The molecular genetic resistance markers of *H. influenzae* isolates have been characterized. The data obtained on the substrate profile of resistant *H. influenzae* isolates allow to evaluate the mechanisms of

resistance to beta-lactam antibiotics. PCR screening of genes for resistance to beta-lactam antibiotics and sulfonamides have been done.

**Keywords:** *Haemophilus influenzae*, resistance, beta-lactam antibiotics, sulfonamides.

Поступила 21.09.2015

## ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ТЯЖЕЛЫХ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

*Грибкова Н.В., Ермакова Т.С., Титов Л.П.*

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

**Реферат.** Проведен отбор и анализ клинического материала, выделенного от пациентов с тяжелыми острыми респираторными инфекциями (ТОРИ), зарегистрированными в эпидемический сезон по гриппу 2014/15 гг., выявлено преобладание в этиологической структуре смешанной вирусно-бактериальной инфекции. Выявленные вирусы гриппа соответствовали доминирующему вирусу гриппа на определенном этапе развития эпидемического процесса. Установлена чувствительность выявленных вирусов гриппа к противогриппозному препарату — озелтамивиру. Оценена роль и удельный вес возбудителей бактериальной природы в развитии ТОРИ. Выявлена устойчивость к антимикробным препаратам основных возбудителей, наиболее часто выделяемых из клинического материала. Предложен комплекс мероприятий для снижения уровня резистентности микроорганизмов к химиопрепаратам.

**Ключевые слова:** грипп, тяжелые острые респираторные инфекции, вирусные и бактериальные инфекции, резистентность к химиопрепаратам.

**Введение.** Грипп является одной из важнейших соцально-экономических проблем здравоохранения. Заболевания, обусловленные вирусом гриппа с незнакомыми человеческому организму поверхностными антигенами, часто протекают в тяжелой клинической форме, сопровождаются развитием постгриппозных осложнений и нередко требуют госпитализации пациента в отделение интенсивной терапии. В тяжелой форме грипп и постгриппозные осложнения могут развиваться и в период ежегодных эпидемий гриппа, особенно среди лиц, относящихся к группам риска. В группу риска входят пациенты с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, органов выделения, дыхательного тракта, иммунодефицитными состояниями, лица с избыточным весом и беременные. В период пандемии или в эпидемические сезоны, ассоциированные с циркуляцией нового для человека штамма вируса гриппа, инфекция, как правило, относится к моноинфекциям. Однако во время ежегодных эпидемических сезонов по гриппу этиологическая структура возбудителей респираторных заболеваний носит смешанный вирусный, вирусно-бактериальный или смешанный бактериальный характер [1].

Тяжелые острые респираторные инфекции находятся в зоне пристального внимания специалистов, поскольку существенно увеличивают нагрузку на систему здравоохранения в осенне-весенний период [2]. В связи с широким бесконтрольным применением антибиотиков большое значение в настоящее время приобретает лабораторная диагностика этиологического агента ТОРИ с определением его чувствительности к химико-биологическим препаратам.

**Цель** исследования — изучение этиологической структуры пейзажа, а также характеристика резистентности и вирулентности бактериальных возбудителей ТОРИ в эпидемический сезон по гриппу 2014/15 гг.

**Материалы и методы.** Материалом для выявления респираторных вирусов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени служили назофарингеальные мазки, полученные от пациентов с ТОРИ, госпитализированных в дозорные учреждения страны. При исследованиях руководствовались следующим определением тяжелой острой респираторной инфекции: ТОРИ — острое респираторное заболевание, начавшееся в течение предыдущих 7 календарных дней, требующее госпитализации и сопровождающееся повышением температуры тела в анамнезе или при измерении до 38°С и более, кашлем и одышкой или затрудненным дыханием [3].

Вирусы гриппа, несущие мутации резистентности к озелтамивиру, определяли методом ПЦР [4].

Идентификацию изолятов бактерий проводили на основании морфологических, культуральных и биохимических свойств, отбирались штаммы [5].

Определение антибиотикочувствительности идентифицированных микроорганизмов проводили диско-диффузионным методом и методом серийных разведений на среде Мюллер–Хинтон агар в соответствии с инструкцией «Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [6, 7]. Для исследований использовали химически чистые субстанции антибиотиков.

Верификацию видовой принадлежности выделенных микроорганизмов и подтверждение антибиотикочувствительности проводили на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact (Biomerieux).

Результаты обрабатывали статистически с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0.

**Результаты и их обсуждение.** Эпидемический сезон по гриппу в стране начинается с 40-й календарной недели (к.н.) текущего года и завершается на 20-й неделе последующего. Эпидемический рост респираторной заболеваемости в стране в анализируемый сезон отмечен с 50-й к.н. 2014 г. по 2-ю к.н. 2015 г., когда среди дозорных образцов стали выявлять спорадические случаи, ассоциированные с гриппом. Увеличение удельного веса вирусов гриппа в дозорных образцах последующих недель сопровождалось эпидемическим подъемом респираторной заболеваемости, и на 4-й к.н. был превышен эпидемический порог. Частота выявления вирусов гриппа в дозорных образцах достигла максимальных значений к 6-й к.н. В период с 6 по 11-ю к.н. уровень респираторной заболеваемости медленно снижался и к 12-й неделе достиг неэпидемических значений.

Так, вирусы гриппа типа А доминировали со 2 по 9-ю неделю 2015 г., причем при субтипировании вирусов было показано выраженное преобладание вирусов гриппа A/H3N2. Вирусы гриппа типа В стали регистрироваться в единичных дозорных образцах с 4-й недели. Однако уже на 9-й к.н. вирусы гриппа A/H3N2 и В с одинаковой частотой выявлялись в дозорных образцах. Начиная с 10-й к.н. среди выявленных вирусов гриппа доминировали вирусы гриппа В, частота выявления которых с 12 по 16-ю неделю достигла 100%. Вирусы гриппа A(H1N1)pdm09 определялись в единичных случаях на первых неделях эпидемического периода.

По тяжести клинической симптоматики обследованные случаи респираторных инфекций подразделялись на следующие категории: острые респираторные инфекции — 54,45%, гриппоподобные заболевания — 19–25% и ТОРИ — 16,1%. Частота выявления вирусов гриппа среди дозорных образцов варьировала в зависимости от категории респираторного заболевания и времени забора образца. Так, в категории ОРИ удельный вес положительных образцов составил 26%, в категории ГПЗ — 45,3%, а в категории ТОРИ — 17,7%. Анализ случаев ТОРИ, исследованных на протяжении эпидемического сезона, показал, что основная масса случаев ТОРИ, ассоциированных с вирусами гриппа А и В (16,5%), выявлена с 4 по 12-ю к.н. Вместе с тем остальные случаи ТОРИ (83,5%) были ассоциированы с негриппозными вирусами, бактериальными возбудителями или носили смешанный вирусно-бактериальный характер. Среди негриппозных респираторных вирусов, в качестве этиологических агентов заболевания были выявлены парамиксовирусы, аденовирусы, респираторно-синцитиальный вирус и бокавирусы. Вместе с тем доминировали в этой группе этиологических агентов риновирусы. Изучение биологических свойств циркулировавших в стране на протяжении эпидемического сезона вирусов гриппа показало отсутствие устойчивых к озелтамивиру штаммов. В случае вирусно-бактериальных и бактериальных инфекций круг выявляемых бактериальных возбудителей был довольно разнообразным.

Проведен бактериологический анализ 40 образцов клинического материала, выделенного от пациентов с подтвержденным диагнозом «грипп». В результате исследований в 30 клинических образцах были выделены и идентифицированы этиологически значимые бактериальные агенты (в 10 образцах бактерии не были обнаружены). В 40% исследованных проб были выделены бактерии в виде монокультуры (в 12 из 30 образцов), а в 60% случаев были установлены микробные ассоциации (18 из 30 образцов клинического материала). В эпидемический сезон по гриппу 2014–2015 гг. были выделены и идентифицированы 50 штаммов этиологически значимых бактерий. Данные бактериологического исследования, характеризующие спектр патогенов микробной популяции ТОРИ, представлены в таблице.

Таблица — Этиологическая структура и удельный вес бактериальных возбудителей ТОРИ

| Возбудитель | Кол-во штаммов | Удельный вес, % |
|---|---|---|
| Семейство *Staphylococcaceae* | | *36* |
| *Staphylococcus aureus* | 12 | 24 |
| *Staphylococcus haemolyticus* | 5 | 10 |
| *Staphylococcus lentus* | 1 | 2 |
| Семейство *Enterococcaceae* | | *32* |
| *Enterococcus faecium* | 15 | 30 |
| *Enterococcus gallinarum* | 1 | 2 |
| Семейство *Enterobacteriaceae* | | *14* |
| *Escherichia coli* | 1 | 2 |
| *Klebsiella pneumoniae* | 6 | 12 |
| Семейство *Streptococcaceae* | | *10* |
| *Streptococcus pneumoniae* | 5 | 10 |
| Неферментирующие грамотрицательные бактерии | | *8* |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 3 | 6 |
| *Sphingomonas paucimobilis* | 1 | 2 |
| Итого | 50 | 100 |

Как следует из представленных данных, преобладающими возбудителями ТОРИ по структуре и удельному весу были представители семейства *Staphylococcaceae* и семейства *Enterococcaceae*, которые составили 36,0 и 32% соответственно от всех выделенных бактериальных возбудителей. При этом полученные данные показали неожиданно высокий процент *E. faecium* (30%) в структуре бактериальных возбудителей ТОРИ. Далее в убывающей последовательности были выявлены: семейство *Enterobacteriaceae* — 14,0%, семейство *Streptococcaceae* — 10,0%, неферментирующие грамотрицательные бактерии — 8,0%.

Заслуживают внимания результаты изучения устойчивости к антимикробным препаратам у наиболее значимых представителей этих возбудителей *in vitro*.

Среди исследованных изолятов *E. faecium* к ампициллину были устойчивы 77%, к гентамицину — 69,9%, к стрептомицину — 59%, амикацину — 41,0%, к хлорамфениколу — 65%, к тетрациклину — 80,9%. Перечисленные препараты не могут применяться при эмпирический терапии энтерококковых инфекций. При оценке активности фторхинолонов было установлено, что к ципрофлоксацину проявили устойчивисть 70,3% изолятов, к офлоксацину — 68,1%, к левофлоксацину — 28,7%. Появление в этой группе новых препаратов с улучшенной активностью в отношении грамположительных микроорганизмов позволяет использовать фторхинолоны для терапии энтерококковых инфекций. В результате наших исследований не было обнаружено энтерококков, резистентных к гликопептидам, — ванкомицину и тейкопланину, которые следует рекомендовать для эмпирической терапии энтерококковых инфекций.

Устойчивость стафилококков к пенициллинам приближалась к 90–100%, к эритромицину, гентамицину она составляла 40–50%, к тетрациклину и клиндамицину — 28%, хлорамфениколу — 22%, к амикацину — 11%. Среди фторхинолонов самой высокой антистафилококковой активностью обладает моксифлоксацин — только 5% изолятов проявили к нему устойчивость. Устойчивость к ципрофлоксацину проявили 38% изолятов, к левофлоксацину — 12%. К ванкомицину, тейкопланину, линезолиду были чувствительны все протестированные изоляты.

Пневмококки, выделенные в рамках данного исследования, проявили пониженную чувствительность к препаратам группы пенициллинов (до 40% устойчивых штаммов), к эритромицину (до 34,7% устойчивых штаммов), тетрациклину (до 25,6% устойчивых штаммов). Однако к аминопенициллинам (амоксициллин) и ингибиторозащищенным пенициллинам (ампициллин/сульбактам, амоксициллин/клавуланат) устойчивых штаммов было выявлено только от 1 до 4%. Низкий уровень резистентности пневмококков был в отношении цефалоспоринов. Цефотаксим и цефепим (III–IV

поколение цефалоспоринов) проявили высокую эффективность (0–0,6% резистентных штаммов). Выявленная устойчивость к эритромицину дает основание предположить, что эффективность и других макролидных антибиотиков заметно снижена. В отношении ранних фторхинолонов (ципрофлоксацин, офлоксацин) частота резистентных штаммов стрептококков составляет 1,5%. Левофлоксацин и моксифлоксацин проявили высокую активностью в отношении стрептококковой микрофлоры (резистентность в настоящее время не установлена).

Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae*, которые были выделены в 14% случаев ТОРИ, доминировали изоляты *K. pneumoniae* проявившие устойчивость практически ко всем представителям группы пенициллинов, в т. ч. и защищенных пенициллинов (87–96%). Из исследованных изолятов *K. pneumoniae* к амикацину были чувствительны 45,2%, к цефтриаксону — 53,7%, к цефтазидиму — 66,9%, к цефепиму — 88,2%. Фторхинолоны проявили неравнозначную активность в отношении клебсиелл: к ципрофлоксацину были устойчивы 60,0% изолятов, к левофлоксацину — 44%. Изолятов, устойчивых к моксифлоксацину, выявлено не было. Карбапенемы были высоко активны в отношении тестированных энтеробактерий: к имипенему проявили чувствительность 97% изолятов, к меропенему — 85,5%.

Неферментирующие грамотрицательные бактерии по сравнению с другими исследованными видами бактерий характеризовались самыми высокими уровнями и частотой резистентности к большинству антимикробных препаратов. Преобладающий вид — *Pseudomonas aeruginosa* проявил устойчивость к цефотаксиму в 73% случаев, цефтазидиму — 56%, цефепиму — 41,3%, имипенему — 55%, азтреонаму — 83%, гентамицину — 93%, нетилмицину — 36,5%, амикацину — 23%, ципрофлоксацину — 83%.

Учитывая высокий удельный вес резистентных форм синегнойной палочки, выбор антибиотиков для антибактериальной терапии заболеваний должен осуществляться на основе результатов антибиотикограммы выделенного штамма, а не эмпирическая терапия на основе результатов мониторинга антибиотикорезистентности изолятов синегнойной палочки по данному отделению конкретного лечебного учреждения, иначе она не будет давать ожидаемого клинического эффекта.

**Заключение.** Исследования случаев ТОРИ, зарегистрированных в эпидемический сезон по гриппу 2014/15 гг., выявили преобладание в этиологической структуре смешанной вирусно-бактериальной инфекции. Выявленные вирусы гриппа в случаях ТОРИ соответствовали доминирующему вирусу гриппа на определенном этапе развития эпидемического процесса. Следует отметить сохранение чувствительности выявленных вирусов гриппа к противогриппозному препарату — озелтамивир.

В рамках данного исследования оценена роль возбудителей бактериальной природы в развитии тяжелых острых респираторных инфекций в эпидемический сезон по гриппу 2014/15 гг. Показано, что наиболее значимыми этиологическими агентами ТОРИ бактериальной природы были представители семейств *Staphylococcaceae* и *Enterococcaceae*, которые составили 68% (36,0 и 32% соответственно) от всех выделенных изолятов. *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* составили 12,0 и 6,0% соответственно. Возможно эти возбудители госпитального происхождения.

Выявлена устойчивость данных микроорганизмов к антимикробным препаратам. Для снижения уровня резистентности микроорганизмов к химиопрепаратам необходимо проводить комплекс мероприятий. Во-первых, отказ от использования малоэффективных антибиотиков. Во-вторых, назначение антимикробных препаратов с учетом результатов исследования чувствительности микрофлоры. В-третьих, проведение мониторинга клинически значимых микроорганизмов и контроль за резистентными штаммами, определение резерва антимикробных препаратов.

Полученные данные важны для понимания эпидемиологии ТОРИ и разработки мер по их терапии и предупреждению.

**Литература**

1.Структура и антибиотикорезистентность основных возбудителей постгриппозных пневмоний у взрослых в 2009–2011 гг. / Л.П. Титов [и др.] // Здравоохранение. — 2011. — № 11. — С. 4–10.

2.Surveillance for severe acute respiratory infections (SARI) in hospitals in the WHO European region — an exploratory analysis of risk factors for a severe outcome in influenza-positive SARI cases / T.J. Meerhoff [et al.] // BMC Infect. Dis. — 2015. — Vol. 15. — P. 1. — doi: 10.1186/s12879-014-0722-x.

3.Требования к проведению эпидемиологического надзора за острыми респираторными инфекциями в Республике Беларусь: санитарные нормы и правила и гигиенические нормативы: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 12.10.2010 № 132.

4.Oseltamivir susceptibility in south-western France during the 2007-8 and 2008-9 influenza epidemics and the ongoing influenza pandemic 2009 [Electronic resource] / S. Burrel [et al.] // Euro Surveill. — 2009. — Vol. 14, № 38. — pii: 19334. — Mode of access: http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V14N38/art19334.pdf. — Date of access: 26.10.2015.

5.Микробиологические методы исследования биологического материала: инструкция по применению : утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 19.03.2010 № 075-0210 / Н.Д. Коломиец [и др.]. — Минск, 2010. — 123 с.

6.Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 13.11.2008 № 226-1200 / А.М. Марейко [и др.]. — Минск, 2008. — 83 с.

7.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.

## THE ETIOLOGICAL STRUCTURE OF SEVERE ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE PATHOGENS

*Gribkova N.V., Ermakova T.S., Titov L.P.*

*State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

Sampling and analysis of clinical material isolated from patients with severe acute respiratory infections (SARI), registered in the influenza epidemic season 2014/15, have been conducted and the prevalence of mixed viral and bacterial infections in etiological structure was revealed. Influenza A viruses conformed to the dominant at a certain stage of the epidemic process development. The sensitivity of identified influenza viruses to the anti-influenza drug oseltamivir was set. The bacterial pathogens role and share in SARI development was estimated. Resistance of the main pathogens most frequently isolated from clinical specimens to antimicrobial agents was revealed. The complex of measures to reduce the level of microbial resistance to chemotherapeutic drugs was proposed.

**Keywords:** influenza, severe acute respiratory infections, viral and bacterial infections, drugs resistance.

Поступила 28.10.2015

## ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* МЕТОДОМ MIRU-VNTR

*Слизень В.В.[1], Суркова Л.К.[2], Залуцкая О.М.[2]*

*[1]Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;*

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

**Реферат.** Высокие уровни широко и множественно лекарственно устойчивого туберкулеза могут быть связаны с эпидемическим распространением высоко вирулентных, высоко трансмиссивных генетических вариантов *Mycobacterium tuberculosis*. С целью выявления причин роста лекарственно устойчивого туберкулеза исследованы 69 культур *M. tuberculosi*s, выделенных от пациентов и проявлявших фенотипическую устойчивость к офлоксацину (МИК ≥2 мкг/мл). Использован метод MIRU-VNTR типирования по 15 VNTR-локусам. В процессе генотипирования *M. tuberculosis* было установлено, что 58% (n = 40) штаммов относились к генотипу Beijing. К генотипу TUR принадлежали 16% (n = 11) изолятов МБТ, к Harlem — 23% (n = 16). Таким образом, популяция устойчивых *M. tuberculosis* относительно однородна.

**Ключевые слова:** *Mycobacterium tuberculosis,* генотипы Beijing, Haarlem, устойчивость.

**Введение.** Проблема туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью в настоящее время переросла в проблему трансконтинентального масштаба: устойчивые *Mycobacterium tuberculosis* проявили потенциал быстрого распространения невзирая на административные границы между государствами [1, 2]. Высокие показатели широко и множественно лекарственно устойчивого туберкулеза в некоторых странах могут быть связаны с распространением определенных высоко вирулентных генетических вариантов *M. tuberculosis*. На основании сполиготипирования в настоящее время в мире выделено 7 генетических семейств *M. tuberculosis*: восточно-африканский-индийский (EAI), пекинский (Beijing); центрально-азиатский (CAS), Гана и Харлем (H/T), Латиноамериканский-Средиземноморский (LAM) и штаммы X; типы 5 и 6 связаны с *M. africanum*, седьмой генотип выявлен на мысе Горн в Африке. Наиболее распространенным генотипом в Китае, Японии, Юго-Восточной Азии, на постсоветском пространстве являются штаммы генетического семейства Beijing, на долю которого может приходиться от 30 до 70% всех изолятов. Предполагают, что штаммы семейства Beijing распространяются быстрее, чем штаммы других генотипов. В составе генотипа Beijing выделяют семейство W с множественной лекарственной устойчивостью, способные вызывать внутрибольничные вспышки туберкулеза. Высказывается гипотеза о большей вирулентности *M. tuberculosis* семейства Beijing, о их способности более быстрого распространения и ускользания от иммунологической защиты макроорганизма, сформированной вакциной БЦЖ [1–3].

Молекулярно-генетические методы зарекомендовали себя как перспективные методы, позволяющие выявлять генетические различия между штаммами *M. tuberculosis*, циркулирующими как в пределах одного региона, так и в разных странах. В настоящее время для генотипирования *M. tuberculosis* одновременно используют три метода: 1) MIRU-VNTR-анализ; 2) сполиготипирование; 3) RFLP-IS6110-анализ [3]. В последнее время широкое распространение для генотипирования *M. tuberculosis* приобретает метод MIRU-VNTR-анализа, основанный на идентификации рассеянных в хромосоме VNTR-локусов, содержащих разное число тандемных повторов [1, 3].

**Цель** исследования — изучение генетической структуры циркулирующих в Республике Беларусь *M. tuberculosis* для выявления причин роста лекарственно устойчивого туберкулеза среди пациентов.

**Материалы и методы.** Исследования проведены в рамках задания «Провести молекулярный мониторинг генотипов мультирезистентных *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Республики Беларусь» ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация» 2014–2015 гг.

Исследованы 69 культур *M. tuberculosis*, выделенные от пациентов и проявлявшие фенотипическую устойчивость к офлоксацину (МИК ≥2 мкг/мл). Использован метод MIRU-VNTR-типирования по 15 VNTR-локусам [3] с детекцией методом электрофореза в агарозном геле и секвенирующего капиллярного электрофореза.

Экстрагировали ДНК микобактерий путем нагревания суспензии *M. tuberculosis* при 98°C — 20 мин в 5%-м Chelex-100 и 1xTAE буфере с последующим центрифугированием 13000 g — 20 мин.

С целью генотипирования *M. tuberculosis* готовили пять реакционных смесей, содержащих праймеры и зонды [3] для детекции различий в следующих локусах: 1) MIRU26, MIRU40, MIRU 4; ETR D; 2) MIRU 10, MIRU 16, MIRU 31(ETR E); 3) Mtub04, ETR C , ETR A; 4) Mtub30, Mtub39, QUB-4156; 5) QUB-11b, Mtub21, QUB-26. Состав праймеров и зондов и их количество из расчета на одну реакцию приведен в таблице 1.

Реакционные ПЦР-смеси готовили объемом 50 мкл, в их состав входили: 1 x PCR буфер с $(NH_4)_2SO_4$, 3 мМ $MgCl_2$, 2 мМ каждого дНТФ, 1,25 ед. Taq-полимеразы (ОАО «Праймтех»), зонды и праймеры согласно таблице 1, бетаин 5 М — 5 мкл, трегалоза 2,5 М — 5 мкл, 6–10 мкл образца ДНК.

Реакционные смеси [4] амплифицировали используя следующий режим: 95°C — 15 мин, 40 циклов (1 мин 94°C, 1 мин — 59°C, и 1 мин 30 с — 72°C), 72°C — 10 мин, 4°C → ∞.

Результаты амплификации визуализировали обычным электрофорезом в 2,7% агарозном геле с бромидом этидия, используя режим электрофореза 50 мА — 1 ч и 70 мА — 2 ч.

Таблица 1. — Зонды и праймеры для MIRU-VNTR генотипирования *M. tuberculosis* [3]

| Название олигонуклеотида | Кол-во, пкмоль | Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3' | Метка, 5' |
|---|---|---|---|
| MIRU 4; ETR D | 10 | GCGCGAGAGCCCGAACTGC | (FAM) |
| MIRU 4; ETR D2 | 20 | GCGCAGCAGAAACGCCAGC | |
| MIRU 26 | 20 | TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC | |
| MIRU 26 -2 | 10 | CATAGGCGACCAGGCGAATAG | (HEX) |
| MIRU 40 | 10 | GGGTTGCTGGATGACAACGTGT | (R110) |
| MIRU 40 -2 | 20 | GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA | |
| MIRU 10 | 20 | GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC | |
| MIRU 10 -2 | 10 | GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT | (FAM) |
| MIRU 16 | 20 | TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA | |
| MIRU 16 -2 | 10 | CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC | (HEX) |
| MIRU 31; ETR E | 20 | ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA | |
| MIRU 31; ETRE2 | 10 | GTGCCGACGTGGTCTTGAT | (R110) |
| Mtub04 | 20 | CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT | |
| Mtub04-2 | 10 | GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC | (FAM) |
| ETR C | 10 | CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT | (HEX) |
| ETR C - | 20 | AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA | |
| ETR A | 10 | AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT | (R110) |
| ETR A -2 | 20 | CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT | |
| Mtub30 | 10 | CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT | (FAM) |
| Mtub30 – 2 | 20 | ACTTGAACCCCCACGCCCATTAGTA | |
| Mtub39 | 10 | CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC | (HEX) |
| Mtub39 -2 | 20 | TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG | |
| QUB-4156 | 20 | TGACCACGGATTGCTCTAGT | |
| QUB-4156 -2 | 10 | GCCGGCGTCCATGTT | (R110) |
| QUB-11b | 20 | CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG | |
| QUB-11b -2 | 10 | CGAAGTGAATGGTGGCAT | (FAM) |
| Mtub21 | 10 | AGATCCCAGTTGTCGTCGTC | (HEX) |
| Mtub21 -2 | 20 | CAACATCGCCTGGTTCTGTA | |
| QUB-26 | 10 | AACGCTCAGCTGTCGGAT | (R110) |
| QUB-26 -2 | 20 | CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT | |
| Mtub29 | 10 | GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT | (FAM) |
| Mtub29-2 | 20 | AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC | |

***Капиллярный электрофорез.*** В случае положительных результатов в стандартном электрофорезе проводили капиллярный электрофорез. Для этого вносили 2 мкл продуктов амплификации в 20 мкл формамида (Applied Biosystems). В смесь добавляли 0,8 мкл стандарта молекулярного веса 500 TAMRA™ (Applied Biosystems), содержащего ампликоны размером 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 и 500 п.о. Параметры капиллярного электрофореза были следующими: температура — 60°C; напряжение инъекции — 5 кВ; время инъекции — 22 с; напряжение электрофореза — 15 кВ; время электрофореза — 40 мин. Результаты капиллярного электрофореза учитывали с использованием программы PeakScanner 1.0, GenMarker 2.6.3.

***Биоинформатика.*** Результаты капиллярного электрофореза учитывали с использованием программы PeakScanner 1.0, GenMarker 2.6.3. Для анализа генотипов применяли программу MIRU-VNTRplus (http://www.miru-vntrplus.org) [4].

**Результаты и их обсуждение.** Изучение эпидемиологии туберкулеза до внедрения молекулярно-генетических методов было затруднено и несовершенно. В 1995 г. van Soolingen co-

общил, что 86% *M. tuberculosis*, выделяемых от пациентов с туберкулезом в Пекине, имеют схожие профили при проведении ПДРФ анализа и сполиготипирования [3]. Позднее стало очевидным, что схожие с пекинскими штаммы циркулируют повсеместно. Они проявляют высокую трансмиссивность и множественную лекарственную устойчивость к противотуберкулезным лекарственным средствам, более вирулентны для мышей, вакцинированных БЦЖ, быстрее размножаются в макрофагах, а некоторые из них характеризуются большими адаптационными возможностями в связи с наличием мутаций в гене mutT, обуславливающих более выраженную мутационную изменчивость [1, 3].

Анализ генотипов мультирезистентных *M. tuberculosis* (n = 69), проявлявших фенотипическую устойчивость к офлоксацину (МИК ≥2 мкг/мл) и выделенных от пациентов в Республике Беларусь, свидетельствует о доминировании генотипа Beijing. Среди исследованных *M. tuberculosis* 40 штаммов относились к генотипу Beiing (58%), к генотипу TUR принадлежали 16% (n = 11) изолятов МБТ, к Haarlem — 23% (n = 16). С помощью MIRU-VNTR у 3% (n = 2) изолятов МБТ генотипы не были идентифицированы.

На основании детекции генотипов 69 изолятов *M. tuberculosis* с помощью MIRU-VNTR-метода был отработан алгоритм их анализа. На первой стадии идентификации генотипов подтверждали образование ампликонов в пяти реакционных смесях методом электрофореза в агарозном геле (рисунок 1). После чего проводили капиллярный электрофорез для фрагментоного анализа, размеры фрагментов идентифицировали с помощью PeakScanner 1.0, GenMarker 2.6.3.

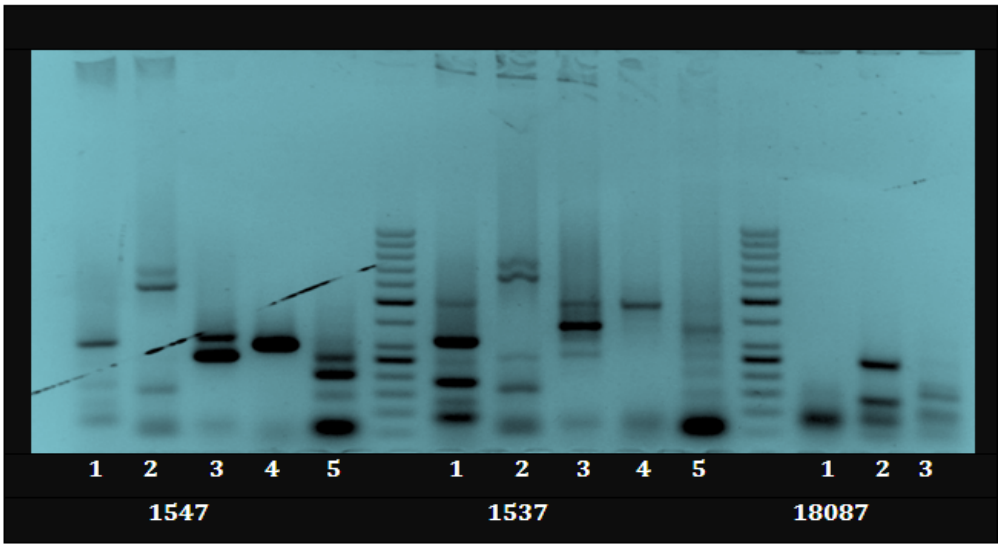



**Рисунок 1. — Профили фрагментов, образуемых при изучении количества тандемных повторов у штаммов 1547, 1537, 18087: в локусах MIRU4, MIRU26, MIRU40 (1 реакционная смесь); MIRU 10, MIRU 16, MIRU 31 (2), Mtub04, ETRC, ETRA (3), Mtub30, Mtub39, QUB4156 (4), QUB11b, QUB26, Mtub21 (5)**

По размеру образуемых ампликонов оценивали количество тандемных повторов для 15 VNTR-локусов. Для каждого штамма *M. tuberculosis* получали числовой код, состоящий из 15 цифр, отражающих количество тандемных повторов в 15 VNTR-локусах. Для идентификации генотипов с помощью MIRU-VNTR использовали программу, функционирующую в составе сайта http://www.miru-vntrplus.org [5]. Для анализа количество повторов в каждом локусе вводили в окно информации об идентифицируемом штамме, детекция генотипа осуществлялась по сходству числового кода идентифицируемого штамма с базой данных числовых кодов различных генотипов. Результаты идентификации VNTR-профилей с помощью базы данных MIRU-VNTR различных генотипов приведены на рисунок 2.

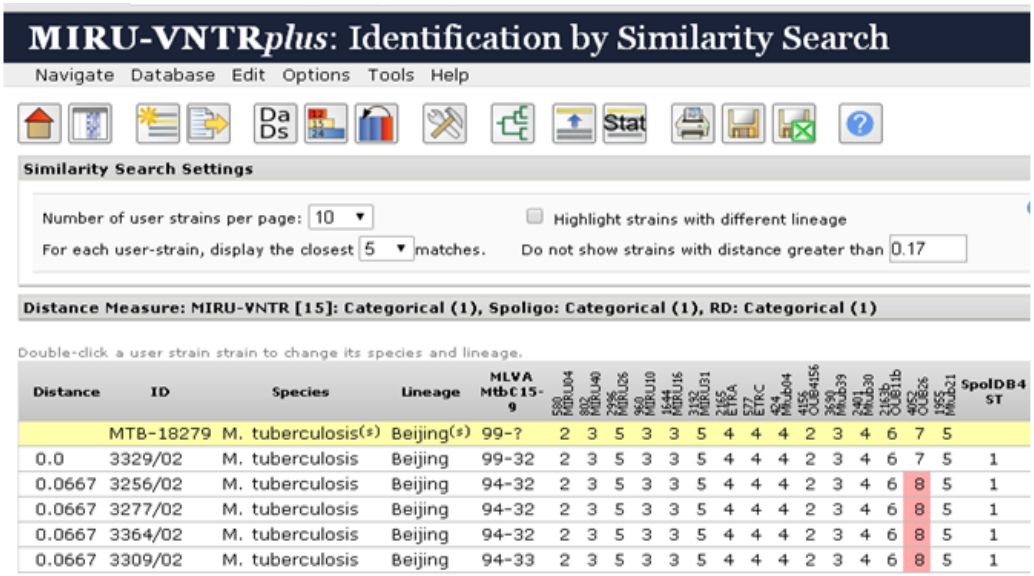



**Рисунок 2. — Результаты идентификации штамма *M. tuberculosis* 18279 с использованием метода MIRU-VNTR и online-программы MIRU-VNTR*plus* [4]**

В таблице 2 приведены примеры профилей VNTR-повторов в 15 локусах для наиболее часто встречающихся генотипов изученных *M. tuberculosis* (n = 69), которые соответствуют генотипам Beijing, Haarlem, TUR.

Таблица 2. — Число VNTR-повторов и идентифицированные генотипы МЛУ МБТ

| Признак | Штамм | MIRU04 | MIRU40 | MIRU26 | MIRU10 | MIRU16 | MIRU31 | ETRA | ETRC | Mtub04 | QUB4156 | MTUB39 | MTUB30 | QUB11b | QUB26 | MTUB21 | Генотип |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Количество VNTR | МТБ-1538 | 2 | 3 | 5 | 5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | Haarlem |
| Ампликоны (п.о.) | | 329 | 516 | 438 | 749 | 724 | 651 | 420 | 324 | 639 | 740 | 446 | 479 | 274 | 486 | 263 | |
| Количество VNTR | МТБ-1552 | 2 | 3 | 5 | 3 | 3 | 5 | 4 | 4 | 4 | 2 | 3 | 4 | 6 | 7 | 5 | Beijing |
| Ампликоны (п.о.) | | 329 | 516 | 540 | 643 | 724 | 757 | 495 | 382 | 741 | 681 | 446 | 479 | 481 | 930 | 377 | |
| Количество VNTR | МТБ-1537 | 1 | 2 | 1 | 5 | 1 | 3 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 6 | 2 | TUR |
| Ампликоны (п.о.) | | 252 | 462 | 336 | 749 | 618 | 651 | 420 | 382 | 741 | 740 | 446 | 479 | 205 | 819 | 206 | |

Идентификацию генотипов проводили также с использованием построения дендрограм, в результате чего штаммы кластрировались в определенную генетическую группу (рисунок 3). Построение дендрограмм позволяет идентифицировать штаммы, профили которых не полностью совпадают с профилями базы данных генотипов.

Актуальность исследования генотипов обусловлена отсутствием внедренных в практику отечественного здравоохранения методик генотипирования микобактерий туберкулеза, а также ограниченными данными о геномном полиморфизме штаммов *M. tuberculosis* в Республике Беларусь [2]. По данным исследования по надзору за лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза в Республике Беларусь (2010–2011 гг.), показатель множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) среди вновь выявленных пациентов составил 32,7%, а среди ранее леченых пациентов — 76,6%, показатель широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) — 1,7 и 16,5% соответственно,

при этом за 2014 г. выявлено 2057 пациентов с множественно лекарственно устойчивым туберкулезом [2]. Согласно полученным нами данным, популяция множественно лекарственно устойчивых M. tuberculosis была генетически относительно однородна, 58% исследованных *M. tuberculosis* относились к генотипу Beijing. Высокая частота выделения генетически однородных *M. tuberculosis* от пациентов свидетельствует об активном распространении *M. tuberculosis* генотипа Beijing.

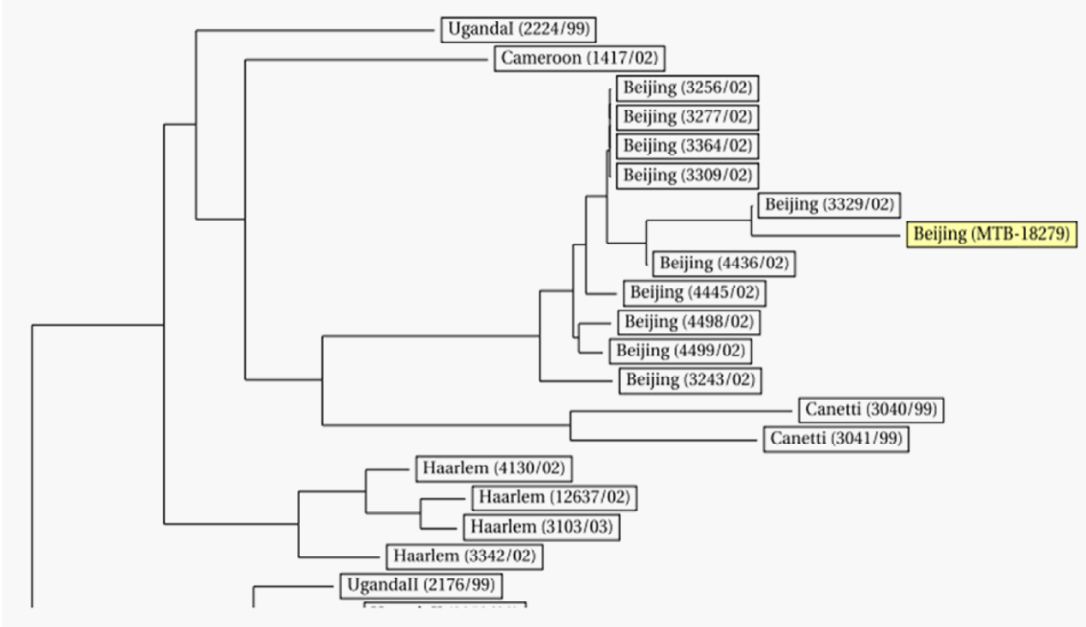



**Рисунок 3. — Результаты построения дендрограммы для идентификации генотипа *M. tuberculosis* 18279 с помощью online-программы MIRU-VNTR*plus* [4]**

В 2001–2008 гг. на базе российских учреждений были проведены небольшие по объему исследования по молекулярно-генетическому типированию штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих среди гражданского населения Республики Беларусь. Методом сполиготипирования показана генетическая разнородность штаммов *M. tuberculosis*: доля штаммов генотипа Beijing составляла 43,8%, T — 34,0%, LAM — 10.8%, U — 3%, X — 1% [6]. Таким образом, на протяжении 14 лет сохраняется доминирование генотипа Beijing среди циркулирующих в Республике Беларусь *M. tuberculosis*.

**Заключение.** По результатам исследований можно сделать следующие выводы:

1. Показано, что метод MIRU-VNTR позволяет генотипировать *M. tuberculosis* на основании различий в 15 локусах, что требует проведения пяти независимых мультиплексных ПЦР-реакций с тремя парами олигонуклеотидов, при этом генетический профиль МБТ определяется по массе и типу флюоресценции образуемого набора ампликонов, выявляемых при стандартном и капиллярном электрофорезе.

2. Популяция устойчивых к офлоксацину (МИК ≥2 мкг/мл) *M. tuberculosis* была генетически относительно однородна, в ней преобладали штаммы генотипа Beijing, на долю которых приходилось 58% изолятов. Были идентифицированы *M. tuberculosis*, относящиеся к генотипу TUR (16%) и Haarlem (23%).

**Литература**

1.Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis / J.R. Glynn [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2002. — Vol. 8, № 8. — P. 843–849.

2.Новикова, А.С. Туберкулез: структура заболеваемости и трудности диагностики / А.С. Новикова, М.В. Ленькова // Молодой ученый. — 2014. — № 4. — С. 372–376.

3.Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* / P. Supply [et al.] // Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44. — P. 4498–4510.

4.Use of random amplified polymorphic DNA PCR to examine epidemiology of Stenotrophomonas maltophilia and Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans from patients with cystic fibrosis / J. W. Krzewinski [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 39, № 10. — P. 3597–3602.

5.Evaluation and user-strategy of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates / C. Allix-Béguec [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2008. — Vol. 46, № 8. — P. 2692–2699.

6.Василенко, Н.В. Сполиготипирование лекарственно-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Беларуси / Н.В. Василенко, А.А. Вязовая, И.В. Мокроусов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2006. — № 4. — С. 70–74.

## GENOTYPING OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY MIRU-VNTR METHOD

*Slizen V.V.[1], Surkova L.K.[2], Zalutskaya O.M.[2]*

*[1]Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus;*
*[2]State Institution "Republican Research & Practical Center for Pulmonology and Tuberculosis", Minsk, Republic of Belarus*

High disease rate of extended and multi-drug resistant tuberculosis in some countries may be associated with the spread of highly virulent genetic variants, such as Beijing, which proportion in the TB-structure can vary from 30 to 70% depending on a geographical region. The objective was to identify the genotypes of multi-drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*, isolated from patients in Belarus. Sixty nine isolates of *M. tuberculosis*, exhibited phenotypic resistance to ofloxacin (MIC ≥2 mkg/ml), were under study, their genotypes were detected by MIRU-VNTR typing method basing on detection the difference in 15 VNTR-loci. It was shown the genotype Beijing to be the dominant, comprising 58% (n = 40) of all MDR-MTB. Haarlem and TUR genotypes were detected in 23 and 16% of isolates correspondingly.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, multi-drug resistance, Beijing, Haarlem genotypes.

Поступила 20.10.2015

## ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ЭНТЕРОБИОЗОМ НАСЕЛЕНИЯ ОКТЯБРЬСКОГО РАЙОНА Г. МИНСКА

*Маклюк М.А[1], Раевская И.А.[1], Семижон О.А.[2], Филипченкова М.А.[3], Чистенко Г.Н.[1]*

*[1]Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;*
*[2]Государственное учреждение «Минский городской центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь;*
*[3]Государственное учреждение «Центр гигиены и эпидемиологии Октябрьского района г. Минска», Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Среди жителей г. Минска, болевших энтеробиозом в течение 2005–2014 гг., доля проживавших в Октябрьском районе была относительно постоянна и находилась в пределах от 9,86% (2005 г.) до 13,24% (2011 г.). Динамика заболеваемости энтеробиозом населения Октябрьского района г. Минска характеризуется достоверно выраженной тенденцией к снижению. Заболевания возникали преимущественно (до 97,4%) под влиянием круглогодичных факторов. Годовая динамика связана с периодами обследования детского контингента и в силу этого не отражает истинного хода эпидемического процесса. Более высокий уровень заболеваемости в отдельные месяцы был связан с обследованием отдельных групп населения. Наиболее поражаемые группы населения — дети 3–6 лет, воспитывающиеся в основном в организованных коллективах, и школьники.

**Ключевые слова:** энтеробиоз, заболеваемость, многолетняя динамика, годовая динамика, группы риска.

**Введение.** Энтеробиоз является единственным гельминтозом, имеющим широкое распространение, т. е. заболеваемость населения данной инвазией находится в пределах от 100 до 1000 случаев на 100000 населения. Его основные проявления связаны с нарушениями со стороны кишечника, нервной системы, аллергическими проявлениями [1]. Половозрелые гельминты обитают в нижнем отделе тонкой кишки, в слепой кишке и в верхнем отделе толстой кишки.

Энтеробиоз относится к контактным гельминтозам. Яйца остриц передаются фекально-оральным механизмом. Ведущий путь передачи — контактно-бытовой, наиболее вероятными факторами передачи являются предметы обихода (игрушки, посуда, белье, парты, дверные ручки и т. д.), пищевые продукты, а также грязные руки.

В клинике данной инвазии наблюдаются малоспецифичные признаки (диарея, бессонница, нарушение аппетита, болевой абдоминальный синдром и аллергические реакции). Перианальный зуд, считающийся наиболее характерным признаком, встречается лишь у 1/4 части пациентов [2]. Эктопическая миграция остриц может являться причиной кишечных свищей, брыжеечных абсцессов, сальпингита, аппендицита, гранулемы, а также вульвита, вагинита и эндометрита у девочек [3]. Энтеробиоз может отягощать течение беременности, являясь причиной токсикоза, дерматитов, анемии, а также гипоксии и гипотрофии плода. Наиболее часто инвазия выявляется у детей дошкольного и младшего школьного возраста, посещающих организованные коллективы [4]. Существенное влияние на распространение энтеробиоза оказывают гигиенические навыки человека, а также условия его проживания и, в первую очередь, коммунальное благоустройство, площадь на одного проживающего и количество детей в семье. Немаловажное значение это имеет и в коллективах, где обучаются и воспитываются дети дошкольного и школьного возраста.

В силу изложенного полагаем, что в профилактике данного гельминтоза особое внимание следует уделять информационно-образовательной работе среди населения и привитию гигиенических навыков, в особенности детям дошкольного и младшего школьного возраста.

**Цель** исследования — изучение проявлений эпидемического процесса энтеробиоза в Октябрьском районе г. Минска для коррекции противоэпидемических мероприятий в целях улучшения эпидемической ситуации.

**Материалы и методы.** В работе использованы описательно-оценочные, аналитические, прогностические приемы. Статистическая обработка проводилась в Microsoft Excel. Данные о заболеваемости были получены из первичной документации и сведений о численном составе всего населения и возрастных групп г. Минска и Октябрьского района.

**Результаты и их обсуждение**. В изучаемый период (2005–2014 гг.) в Октябрьском районе г. Минска заболеваемость энтеробиозом колебалась от 69,5‰ в 2014 г. до 190,5‰ в 2005 г. Многолетняя эпидемическая тенденция была достоверно выраженной к снижению (Тпр.=-11,34%; p<0,05) (рисунок 1).

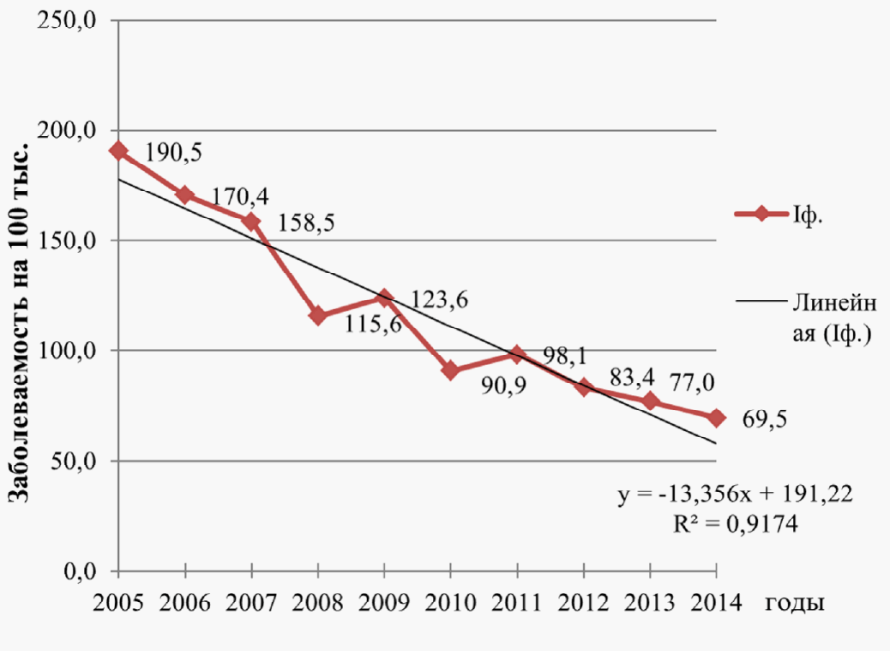



**Рисунок 1. — Многолетняя динамика заболеваемости населения Октябрьского района г. Минска, 2005–2014 гг.**

Согласно прогнозу, в 2015 г. уровень заболеваемости энтеробиозом населения Октябрьского района г. Минска ожидается в пределах от 33,6 до 55,0 случая на 100000 населения.

В этот же период времени снижение заболеваемости синхронно происходит на территории г. Минска со 162,4‰ (2005 г.) до 59,1‰ (2013 г.). С 2008 г. данный гельминтоз переходит в группу среднераспространенных, показатель заболеваемости в этот год составил 90,6‰. Снижение заболеваемости в 2005–2014 гг. имеет место и в Республике Беларусь с 499,2‰ (2005 г.) до 114,2‰ (2014 г.), но по-прежнему данный гельминтоз на территории республики остается в группе широкораспространенных.

Аналогичная ситуация наблюдается и в других странах. В России в структуре паразитарных заболеваний доля энтеробиоза составляет около 71,0%, а показатель заболеваемости по субъектам страны колеблется в пределах от 34,3 до 484,9‰ при среднем показателе 153,4‰ [5]. В последнее десятилетие динамика заболеваемости имеет устойчивую тенденцию к снижению. Авторы считают, что это происходит за счет сокращения числа обследованных [1, 5]. Методом случайной выборки в 2010 г. проводилось обследование населения, проживающего в 15 районах Таджикистана. Положительные результаты были получены в 29,25% [6].

Заболеваемость жителей г. Минска складывается из заболеваемости жителей 9 административных территорий. В отдельные годы до четверти заболевших выявлялось среди граждан, проживающих на территории Заводского (26,9% в 2008 г.) и Фрунзенского (25,2% в 2013 г.) районов (рисунок 2). Доля болеющих жителей Октябрьского района в указанный период была относительно постоянна и находилась в пределах от 9,86% в 2005 г. до 13,24% в 2011 г.

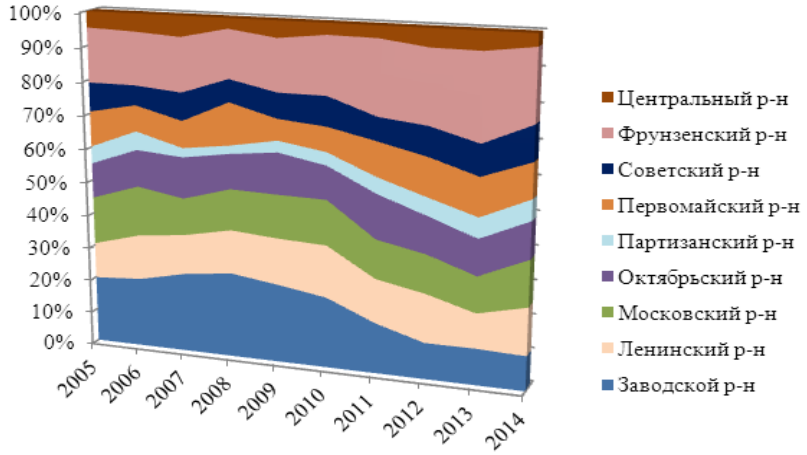



**Рисунок 2. — Структура лиц, заболевших энтеробиозом, по районам г. Минска**

На протяжении года заболеваемость в Октябрьском районе г. Минска распределялась неравномерно (рисунок 3).

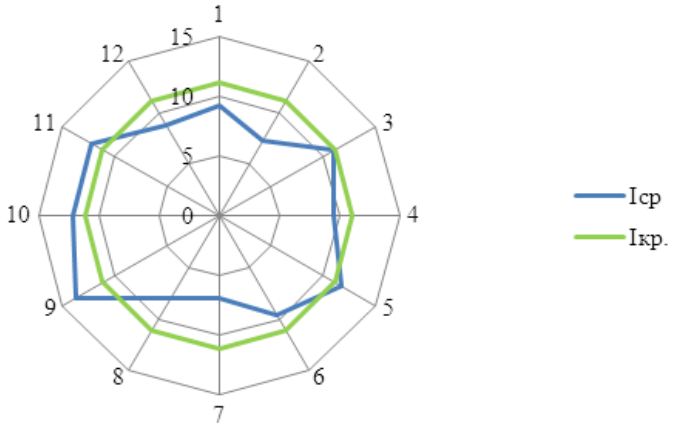



**Рисунок 3. — Помесячная динамика заболеваемости энтеробиозом населения Октябрьского района г. Минска**

Согласно типовой кривой (по средним данным) минимальная активность эпидемического процесса наблюдалась в июле (6,9 на 100000 населения), а максимальная была характерна для сентября (13,7‰). Существенное влияние на выявление инвазированных оказывает порядок обследования населения, который регламентирован действующими инструктивными документами, в соответствии с чем обследуют детей одного из детских садов района дважды в год в связи с формированием организованных коллективов, что обусловливает соответствующие подъемы заболеваемости. Результаты данных обследований считаются репрезентативными для всех детей соответствующего возраста в районе, однако это не отражает истинного хода эпидемического процесса.

Энтеробиоз относится к группе контактных гельминтозов, не имеет четкой сезонности, что подтверждается нашими исследованиями, поскольку в Октябрьском районе г. Минска заболевания возникали преимущественно под влиянием круглогодичных факторов и колебались в пределах от 52,9% в 2006 г. до 97,4% в 2012 г. (рисунок 4).

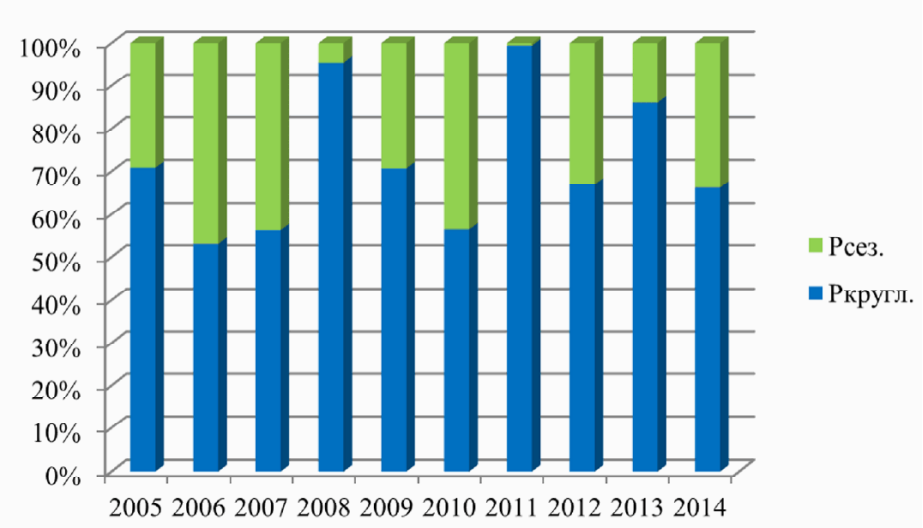



**Рисунок 4. — Структура круглогодичной и сезонной заболеваемости энтеробиозом населения Октябрьского района г. Минска, 2005–2014 гг.**

На территории Октябрьского района г. Минска наиболее высокие показатели заболеваемости энтеробиозом отмечались среди детей 3–6 лет (1196,07‰) с колебаниями в широком диапазоне: от 492,46‰ в 2013 г. до 2112,23‰ в 2006 г. (рисунок 5). В структуре болеющих доля детей 3–6 лет составила 34,01% при доле в структуре населения 3,5%. Также высокий уровень заболеваемости наблюдался и среди школьников (475,65‰). Удельный вес этой группы в структуре болеющих составил 41,44%, а в структуре населения — 10,03%. Аналогичные результаты получены и другими авторами [1, 2, 4].

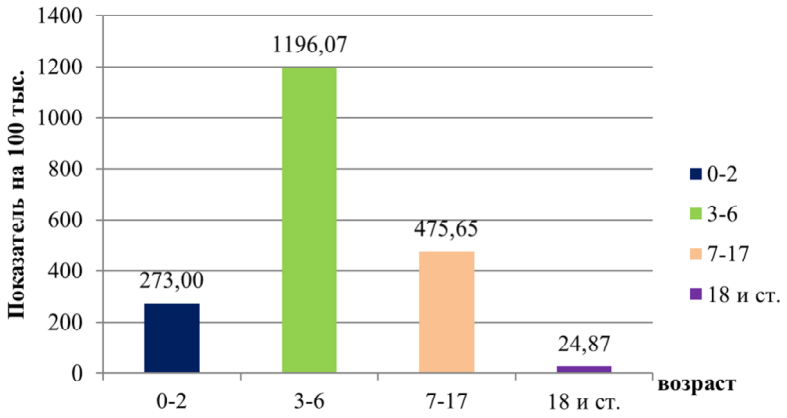



**Рисунок 5. — Среднемноголетние уровни заболеваемости энтеробиозом в возрастных группах за 2005–2014 гг. в Октябрьском районе г. Минска**

Энтеробиоз является уникальной инвазией в силу того, что выздороветь пациенту можно не только в результате применения лекарственных препаратов, как при других заболеваниях, но и без их использования, только неукоснительно соблюдая правила личной гигиены каждым человеком как в семье, так и в коллективе. Перенесенное заболевание не оставляет иммунитета. В связи с этим на протяжении короткого времени возможны повторные заражения как от других инвазированных, так и в результате самоинвазии. В силу изложенного особую актуальность имеет обучение населения, особенно детей дошкольного и школьного возраста, а также их родителей, гигиеническим навыкам. Немаловажная роль при этом отводится медицинским работникам и педагогам. Существенное внимание этому вопросу уделяется и в Октябрьском ЦГЭ, специалисты которого систематически проводят информационно-образовательную работу среди населения, в т. ч. и на объектах надзора.

**Заключение.** На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. В течение 2005–2014 гг. отмечается достоверно выраженное снижение заболеваемости энтеробиозом в Октябрьском районе г. Минска (Тпр = -11,34%; $p<0,05$).

2. В 2015 г. в соответствии с прогнозом заболеваемость энтеробиозом в Октябрьском районе г. Минска предполагается в пределах 33,6–55,0 на 100000 населения.

3. На протяжении года заболевания в Октябрьском районе г. Минска возникали преимущественно (до 97,4%) под влиянием круглогодичных факторов.

4. Группами риска явились дети 3–6 лет (заболеваемость 1196,07 на 100000 населения этой группы, доля в структуре болеющего населения — 34,01%) и школьники ($475,65^{o}/_{oooo}$ и 41,44% соответственно).

5. В профилактике контактных гельминтозов принципиальное значение имеет информационно-образовательная работа среди населения и неукоснительное выполнение правил личной гигиены.

**Литература**

1. Елисеева, Н.В. Эпидемиологическая ситуация по энтеробиозу среди организованных детских коллективов / Н.В. Елисеева [и др.] // Дальневосточ. журн. инфекц. патологии. — 2012. — № 21. — С. 168–172.

2. Бутенкова, Е.М. Клинические проявления энтеробиоза при различной интенсивности инвазии у детей Гомельского региона в современных условиях / Е.М. Бутенкова, С.В. Жаворонок, Н.Н. Острейко // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2006. — № 1. — С. 54–58.

3. Enterobius granuloma: an unusual cause of omental mass in an 11-year-old girl / S. Kılıç [et al.] // The Turkish J. Pediatr. — 2014. — Vol. 56, № 2. — P. 189–191.

4. Parasitic infections of the appendix as a cause of appendectomy in adult patients / H. Yabanoğlu [et al.] // TurkiyeParazitolDerg. — 2014. — Vol. 38, № 6 — P. 12–16.

5. Асланова, М.М. Паразитологический мониторинг как составная часть эпидемиологического надзора за гельминтозами в Российской Федерации / М.М. Асланова, Е.А. Черникова, Т.Г. Сыскова // Мед. паразитол. паразитар. болезни. — 2014. — № 1. — С. 13–16.

6. Каримов, С.С. Оценка распространенности гельминтозов среди населения Республики Таджикистан / С.С. Каримов, Т.А. Шерхонов, Д.С. Сайбурхонов // Мед. паразитол. паразитар. болезни. — 2012. — № 1. — С. 28–31.

## ENTEROBIASIS MORBIDITY IN OKTYABRSKI DISTRICT OF MINSK CITY

*Makliuk M.A.1, Rayeuskaya I.A.[1], Semizhon O.N.[2], Filipchenkova M.A.[3], Chistenko G.N.[1]*

*[1]Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus;*
*[2]State Institution "Minsk Municipal Centre for Hygiene, Epidemiology & Public Health", Minsk, Republic of Belarus;*
*[3]State Institution "Center for Hygiene & Epidemiology of Oktyabrski District in Minsk", Minsk, Republic of Belarus*

Among the Minsk residents with enterobiasis in 2005–2014, the proportion of the Oktyabrski district was relatively constant and ranged from 9.86% (2005) to 13.24 per cent (2011). The incidence of enterobiasis of the population of the Oktyabrski district of Minsk is characterized by a significantly pronounced downward trend. The disease occurred predominantly (up to 97.4%) under the influence of year-roundfactors. Annual dynamics is associated with periods of survey of children contingent and therefore do not reflect the true progress of the epidemic process. Higher incidence in some months was associated with the survey of selected population groups. The most affected population group was children from 3 to 6 years old, who live mainly in organized groups, and schoolchildren.

**Keywords:** enterobiasis, incidence, long-term dynamics, annual dynamics, risk groups.

Поступила 24.09.2015

# РОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК В РАЗВИТИИ ЦИСТИТА (ОБЗОР)

*Лагун Л.В.*

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

**Реферат.** В развитии и персистенции циститов важным фактором является образование бактериальных биопленок, структура и физиологические свойства которых обеспечивают повышение устойчивости к антибиотикам, антисептикам и влиянию со стороны иммунной системы макроорганизма.

**Ключевые слова:** биопленки, инфекции мочевыделительной системы, цистит, мочевые катетеры, резистентность к антибиотикам.

Открытие и изучение биопленок является одним из наиболее важных достижений медицинской и клинической микробиологии последних 25 лет. Все представители нормальной микрофлоры в организме человека существуют в составе биопленок. С их образования также начинается развитие любой инфекции, в т. ч. и инфекции мочевыделительной системы, в частности цистита [1–4]. Свойством микроорганизмов-возбудителей цистита является способность к формированию биопленки, структура и физиологические свойства которой обеспечивают повышение устойчивости к антибиотикам, антисептикам и влиянию со стороны иммунной системы макроорганизма [2, 3, 5]. Способность к формированию биопленки определяется не только видом возбудителя, но также и характером инфекционного процесса, в котором участвует данный микроорганизм [6].

Наиболее частыми возбудителями цистита являются энтеробактерии, главным образом *E. coli*, а также *Proteus spp.* и *K. pneumoniae*. Большой удельный вес в структуре уропатогенов занимает *P. aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* [7–9].

Планктонные бактерии способны прикрепляться к уроэпителию. Бактериальная адгезия является основным моментом в колонизации тканевых поверхностей организма-хозяина. Неспецифическая адгезия происходит за счет способности микроорганизмов фиксироваться к поверхностям за счет гидрофобных и гидрофильных взаимодействий и/или электростатических сил. Бактериальная поверхность заряжена отрицательно, причем у грамположительных микроорганизмов это обусловлено наличием в клеточной стенке тейхоевых и липотейхоевых кислот, а у грамотрицательных — присутствием кислых липополисахаридов и белков. Неспецифическое прикрепление микроорганизмов к уроэпителию в большей степени обратимо. Специфическая адгезия осуществляется после молекулярных взаимодействий между адгезинами микроорганизмов и рецепторами клеток хозяина. Адгезины — это специфические макромолекулярные комплексы микробных клеток, входящие в состав бактериальных фимбрий или поверхностных структур клеточной стенки, с помощью которых происходит фиксация возбудителя на поверхности слизистой.

Способностью к адгезии *E. coli* обязана фимбриям (гликопротеидным ворсинам). Комплементарностью к рецепторам клеток мочевого пузыря обладают фимбрии I типа, к рецепторам клеток мочеточников — P-фимбрии. Особой адгезивностью отличаются бактерии, несущие на себе т. н. маннозорезистентные P-фимбрии. Бактерии, обладающие маннозочувствительными P-фимбриями, в большей степени оказываются доступными фагоцитозу благодаря способности D-маннозы блокировать их адгезивные свойства. У *E. coli* оба типа фимбрий (I типа и P) запускают воспалительный ответ организма-хозяина, который включает продукцию цитокинов, воспалительную реакцию и отшелушивание инфицированных клеток уротелия [2, 10].

Вирулентность протея, как и кишечной палочки, проявляется в его способности прилипать к уроэпителию и продвигаться по нему против тока мочи, противодействовать опсонизации и фагоцитозу и давать эндотоксический эффект. Способностью к адгезии *Proteus spp.* обязан фимбриям. Подвижные («роящиеся») H-формы протея — основные морфологические формы, способные прикрепляться к эпителию мочевого пузыря, что обусловлено интенсивным образованием протеаз, уреазы и гемолизинов [10, 11].

К факторам адгезии *P. aeruginosa* относят фимбрии, или пили, и экстрацеллюлярную слизь, которая усиливает адгезивные свойства мукоидных штаммов синегнойной палочки. Даже если у

бактерий на поверхности нет фимбрий (что подтверждается электронной микроскопией), они не теряют способности к прилипанию к клеткам мочевого пузыря. По-видимому, у синегнойной палочки существует и другие механизмы адгезии, не зависимые от образования фимбрий. Изучение его представляет большой интерес, т. к. уропатология, обусловленная синегнойной инфекцией, встречается достаточно часто [12].

При изучении процесса биопленкообразования *in vitro* было показано, что важную роль в образовании биопленок бактериями, в частности, такими как *E. coli*, *P. aeruginosa* играют жгутики: неподвижные мутанты этих бактерий обладают значительно пониженной способностью к образованию биопленок. Кроме того, жгутики при образовании биопленок служат не только для обеспечения подвижности бактерий и хемотаксиса, но и играют решающую роль в архитектуре биопленок [13].

Адгезия во многом определяет характер и течение инфекции, является основной причиной инфекционных осложнений. Мочевые пути человека подчиняются силам гидродинамики, и адгезия микроорганизмов к уроэпителию дает им возможность противостоять удалению потоком мочи. Бактериальная адгезия не только способствует колонизации и образованию микроколоний, но также благоприятствует инвазии микроорганизмов, формированию биопленок на уроэпителиальной поверхности и повреждению клеток хозяина с развитием цистита. Периодическое высвобождение планктонных форм бактерий путем открепления и отшелушивания фрагментов микроколоний из биопленки в поток мочи до новой локализации и начала формирования новой биопленки служит источником поддержания хронического инфекционного и воспалительного процесса в почках и мочевом пузыре [2, 14, 15].

Биопленки на поверхности уроэпителия легче поддаются эрадикации антимикробными агентами по сравнению с биопленками, которые образуются на чужеродных объектах, находящихся в мочевыделительной системе. Инородные тела в мочевых путях (камни, катетеры, дренажи, стенты) подвергаются быстрой (в течение 24–72 ч) колонизации своих поверхностей микроорганизмами с формированием биопленок, становятся дополнительными очагами инфекции для организма, что приводит к развитию осложненных инфекций мочевыделительной системы, например, «катетер-ассоциированной ИМП», «инфекции инородного тела» [2, 5, 16–18]. Мочевые катетеры обладают превосходной поверхностью для роста и развития микробных биопленок. Как правило, растут на катетерах такие бактерии, как *S. aureus*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Хотя антибиотикотерапия с использованием катетера предотвращает самые ранние биопленочные образования, длительный срок использования катетера и/или несоблюдение правил асептики и антисептики при эндоуретральных и эндовезикальных манипуляциях в большинстве случаев приводит к инфицированию и осложнению заболеваний мочевыделительного тракта. На скорость и обширность формирования биопленок на мочевых катетерах влияет ряд факторов. Среди них можно отметить количество контаминирующих микробных клеток, скорость потока жидкости через катетер, физико-химические характеристики поверхности (материал изготовления) и температуру окружающей среды. При этом компоненты жидкости могут менять свойства поверхности и скорость прикрепления к ней микробных клеток. Формирование биопленки начинается сразу после прикрепления клеток к поверхности катетера [2, 3, 17]. Таким образом, мочевой катетер как инородное тело становится очагом инфекции для организма, и бактериурия в таких случаях становится неизбежной. Чаще всего после удаления инородных тел из мочевых путей бактериурия исчезает.

Однако наибольшие трудности представляет персистенция микроорганизмов в слизистой оболочке мочевых путей без наличия или после удаления катетеров, инородных тел. Так называемый рецидивирующий, или персистирующий, бактериальный цистит (свыше 3 обострений в год) наблюдается у 25–40% женщин после однократного эпизода острого цистита. Многие виды бактерий способны паразитировать внутриклеточно, проявляя тропность к различным клеткам хозяина — факультативный паразитизм. Кишечная палочка, например, может паразитировать в клетках эпителия и макрофагов. Наличие фимбрий и ферментативная активность микроорганизмов обеспечивает им проникновение в клетку или межклеточное пространство. Так, уропатогенные кишечные палочки проникают в эпителиальные клетки стенки мочевого пузыря и внутри них формируют внутриклеточные бактериальные сообщества. Растущие колонии бактерий, окруженные матриксом биопленки, формируют в стенке мочевого пузыря скопления в виде «коконов», выпячивающихся в его просвет. Время от времени «коконы» разрываются и бактерии, попадая в мочу, вызывают повторные ин-

фекции мочевыводящих путей [19]. Необходимым условием персистенции являются определенные биологические свойства микроорганизма и дефектность защиты хозяина, что обусловливает бактерионосительство (персистенция возбудителей) и хронизацию воспалительного процесса (частые рецидивы заболевания). Снижая вирулентность или изолируясь в очагах локального иммунодефицита, бактерии могут уклоняться от факторов защиты человека. Подавление же факторов защиты хозяина идет за счет повышения вирулентных свойств бактерий или в результате диссеминации в иммунокомпрометированном организме [20]. Высокая приспосабливаемость микроорганизмов к постоянно меняющимся условиям существования особенно проявляется при антибиотикотерапии — обесцениваются целые классы антибиотиков за счет селекции резистентных штаммов микроорганизмов. Лечение персистирующего или хронического цистита и эффективная санация от бактерионосительства представляют большую проблему. Во внутриклеточных бактериальных сообществах резистентность к антибиотикам обусловлена: ограниченным проникновением антимикробных веществ в биопленки; различием в метаболической активности и скорости роста отдельных клеток бактерий, т. к. многие антибиотики не действуют на клетки, находящиеся в покое; уменьшением диффузии антибактериального препарата внутрь; инактивацией антибиотика внутри матрикса [20].

Таким образом, образование микробных биопленок является важным фактором персистенции микроорганизмов и требует пересмотра принципов терапии хронических инфекций мочевыделительной системы с внедрением методов, направленных на предотвращение формирования или разрушение уже сформированной биопленки.

**Литература**


1. Романова, Ю.М. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и в организме хозяина / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Журн. микробиол. — 2011. — № 3. — С. 99–109.
2. Update on biofilm infections in the urinary tract / P. Tenke [et al.] // World J. Urol. — 2012. — Vol. 30. — P. 51–57.
3. The role of biofilm infection in urology / P. Tenke [et al.] // World J. Urol. — 2006. — Vol. 24. — P. 13–20.
4. Wathick, P. Biofilm, city of microbes / P. Wathick, R. Kolter // J. Bacteriol. — 2000. — Vol. 182. — P. 2675–2679.
5. Choong, S. Biofilms and their role in infections in urology / S. Choong, H. Whitfield // BJU Int. — 2000. — Vol. 86. — P. 935–941.
6. Donlan, R.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R.M. Donlan, J.W. Costerson // Clin. Microbiol. Rev. — 2002. — Vol. 15. — P. 167–193.
7. Резистентность возбудителей амбулаторных инфекций мочевыводящих путей по данным многоцентровых микробиологических исследований UTIAP-I и UTIAP-II / В.В. Рафальский [и др.] // Урология. — 2004. — № 2. — С. 13–17.
8. Bishop, M.C. Uncomplicated urinary tract infection / M.C. Bishop // EAU Updated Series. — 2004. — № 2. — P. 143–150.
9. Ronald, A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens / A. Ronald // Dis. Mon. — 2003. — Vol. 49. — P. 71–82.
10. Oelschlaeger, T.A. Virulence factors of uropathogens / T.A. Oelschlaeger, U. Dobrindt, J. Hacker // Curr. Opin. Urol. — 2002. — Vol. 12. — P. 33–38.
11. Роль инфекционного фактора в патогенезе уролитиаза / С.И. Сулейманов [и др.] // Клинич. лаборатор. диагностика. — 2010. — № 7. — С. 18–23.
12. Мороз, А.Ф. Синегнойная инфекция / А.Ф. Мороз. — М.: Медицина, 1988. — 256 с.
13. O'Toole, G.A. Biofilm formation as microbial development / G.A. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // Ann. Rev. Microbiol. — 2000. — Vol. 54. — P. 49–79.
14. Biofilms in nephrology / R.J. Marcus [et al.] // Expert. Opin. Biol. Ther. — 2008. — Vol. 8, № 8. — P. 1159–1166.
15. Микрофлора почечных камней при мочекаменной болезни и поиск средств борьбы с биопленками уропатогенных бактерий / Э.Р. Толордава [и др.] // Журн. микробиол. — 2012. — № 4. — С. 56–62.
16. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to Escherichia coli and Proteus mirabilis / S.M. Jacobsen [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. — 2008. — Vol. 21. — P. 26–59.
17. Trautner, B.W. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection / B.W. Trautner, R.O. Darouiche // Am. J. Infect. Contr. — 2004. — Vol. 32. — P. 177-183.
18. Anderson, G.G. Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract / G.G. Anderson, S.M. Martin, S.J. Hultgren // Microb. Infect. — 2004. — Vol. 6, № 12. — P. 1094–1101.
19. Costerton, J.W. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections / J.W. Costerton, P.S. Stewant, E.P. Greenberg // Sci. — 1999. — Vol. 284. — P. 1318–1322.
20. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий / И.В. Чеботарь [и др.] // Клинич. микробиол. антимикроб. химиотер. — 2012. — Т. 14, № 1. — С. 51–58.

## THE ROLE OF BACTERIAL BIOFILMS IN CYSTITIS

*Lagun L.V.*

*Educational Establishment "Gomel State Medical University", Gomel, Republic of Belarus*

Biofilm formation is a factor in the development and persistence of infectious diseases. The characteristics of etiologic agents of urinary tract infections are ability to form biofilm, the structure and physiological nature of which provide decreased susceptibility to antibiotics, antiseptics, and to immune system. In clinical urology and nephrology biofilms influence the development of recurrent cystitis, pyelonephritises and affect urinary catheters.

**Keywords:** biofilms, urinary tract infections, cystitis, urinary catheters, resistance to antibiotics.

Поступила 10.09.2015

## МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ БАКТЕРИЯМИ ПЕРИОДОНТАЛЬНОГО КАРМАНА И ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ РАЗРУШАЮЩИХ БИОПЛЕНКУ

*Колчанова Н.Э., Окулич В.К., Шилин В.Е.*

*Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Статья отражает актуальность проблемы диагностики и лечения воспалительных заболеваний периодонта. Исследована способность микрофлоры периодонтального кармана к образованию биопленки. Разработаны методы визуального и количественного определения биопленок. Также изучено влияние ферментов и антисептиков на микробную биопленку *in vitro*.

**Ключевые слова:** биопленка ротовой полости, периодонтит, микрофлора, ферменты, антисептики.

**Введение.** Воспалительные заболевания периодонта являются одной из актуальных проблем стоматологии. По данным ВОЗ, основанным на статистике 53 стран мира, в различных возрастных группах заболеваемость гингивитом и периодонтитом достигает 80–100% [1].

К настоящему времени не вызывает сомнений, что в развитии заболеваний маргинального периодонта важнейшую роль играют воспалительные реакции, спровоцированные микроорганизмами ротовой полости [2]. Однако на смену концепции единственного микробного возбудителя заболеваний периодонта пришли теории ассоциации микробных сообществ — биопленок.

Биопленка — микробное сообщество, характеризующееся клетками, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ и демонстрируют изменение фенотипа, выражающееся в изменении параметров роста и экспрессии специфичных генов [3, 4]. В химическом отношении матрикс биопленки неоднороден и различается у разных микроорганизмов. Экстрацеллюлярный слой содержит до 40–95% полисахаридов. Концентрация других химических компонентов очень сильно варьирует. Доля белков может составлять до 60%, липидов — до 40% и нуклеиновых кислот — 1–20%. Данные соединения находятся в гидратированном состоянии, т. к. 80–90% объема биопленки занимает вода [5].

Применение конфокальной сканирующей лазерной микроскопии для исследования биопленок радикально изменило восприятие их структурных и функциональных особенностей. Этот метод дал возможность исследовать биопленки *in situ* без ограничений, с которыми сталкивается электронная микроскопия, хотя и при более низких увеличениях. С помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии установлено, что структура биопленок не является гомогенным монослоем микробных клеток, а представляет сложную трехмерную биологическую структуру высшей организации жизнедеятельности микробов, в чем-то напоминающей многоклеточный организм, обладающий очень важной особенностью — успешно противостоять внешним факторам агрессии, в т. ч. ультрафиолетовому излучению, дегидратации, антибиотикам, дезинфектантам и факторам иммунной защиты человека [6]. Многие аспекты функционирования данной многоуровневой системы

до сих пор остаются не изученными. Не полностью определены также факторы, способствующие разрушению биопленок.

На сегодняшний день существует ряд методов, позволяющих выращивать и изучать биопленки. Однако зачастую данные методы требуют дорогостоящей техники и реактивов, в связи с чем разработка доступных и в то же время информативных способов изучения микробных сообществ является перспективной и актуальной задачей [7].

**Цель** исследования — определение спектра микроорганизмов периодонтального кармана, способных образовывать микробные сообщества, изучение наиболее активных ферментов и антисептиков, способных разрушать матрикс микробной биопленки *in vitro*.

**Материалы и методы.** С целью изучения периодонтальной микрофлоры нами было обследовано 72 пациента на кафедре терапевтической стоматологии УО ВГМУ с хроническим периодонтитом. При постановке диагноза пациентам использована классификация заболеваний периодонта Американской академии периодонтологии (1999).

Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью тест-систем на автоматизированном биохимическом анализаторе MINI API (Биомерье). Для идентификации использовались системы для экспресс-идентификации микроорганизмов: rapid ID 32 STREP — для стрептококков, ID 32 E — для энтеробактерий. Культивирование стрептококков осуществлялось в капнофильных условиях ( 5–10% $CO_2$) в течение 24 ч с использованием анаэростатов.

Микроскопические исследования, нацеленные на визуализацию трехмерной структуры биопленок, проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SPE с программным обеспечением LAS AF. Анализ полученных изображений проводился на компьютере с помощью программы LAS F 3.6.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программ Statistica 10, Excel. Так как изучаемые показатели имели нормальное распределение во всех группах исследования (p для критерия Шапиро–Уилка во всех группах >0,05), результаты представлены в виде M±σ (M — среднее значение, σ — стандартное отклонение).

**Результаты и их обсуждение.** Микробиологические исследования содержимого периодонтальных карманов позволили выделить и идентифицировать 13 видов микроорганизмов, из них 25% составил *Streptococcus oralis*; *S. mitis* — 7,5%, *Gemella heamolysans*, *G. morbillorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. mutans*, *S. sanquinis* — 5%; *Candida spp.* — 10%; *Staphylococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* — 12,5%; *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc spp.*, *Lc. lactis lactis* — 2,5%.

Для определения способности полученного штамма к образованию биопленки был использован модифицированный нами метод с применением 96-луночного пластикового планшета [8]. В дополнение к предшествующей методике $E_{оп}$ переводили в вес микробной биопленки из расчета на одну лунку 96-луночного планшета для ИФА. Для вычислений использовалась формула: $X = 25{,}75 \times 0{,}2 \times E_{оп} 1{,}275/26{,}0$.

Масса биопленки 10 штаммов *S. oralis*, выделенных от разных пациентов, была в пределах 0,012–0,030 мкг на лунку. После анализа полученных данных для дальнейшего исследования был выбран штамм с наиболее высокой способностью к образованию биопленки.

Визуализация биопленки с помощью конфокальной микроскопии и программного обеспечения LAS AF с использованием флюоресцентного красителя DAPI выявила характерную для биопленок трехмерную организацию. Толщина двухсуточной биопленки *S. oralis* колебалась от 50 до 60 мкм. Для подтверждения способности ферментов разрушать микробную биопленку она была обработана гиалуронидазой I (бычья) в течение 20 с, ее толщина после обработки уменьшилась и составила от 30 до 40 мкм, а также заметно снизилась интенсивность окраски.

Для оценки способности антисептиков и ферментов расщеплять экзополимерный матрикс биопленки применяли разработанный нами метод. В стерильную чашку Петри с агаром Мюллера–Хинтона помещали стерильную инертную полимерную мембрану, прижимали стеклянным грузом и вносили 0,5 мл взвеси *S. oralis* или в концентрации $1{,}5 \times 10^8$ КОЕ/мл и 5 мл 0,9% NaCl. Чашку Петри инкубировали в течение 3 сут при температуре 37°C. Мембрану извлекали из чашки Петри, биопленку с мембраны смывали стерильным физиологическим раствором. К полученной суспензии добавляли в избытке 0,5%-й раствор Конго-красного. Суспензию дважды отмывали 0,9% NaCl для удаления несвязавшегося Конго-красного с осаждением матрикса центрифугированием при 1000 об./мин

(200 g) в течение 75 мин после каждой отмывки. Суспензию замораживали и хранили при -25°С до использования.

Для приготовления рабочей суспензии матрикса биопленки разводили размороженную суспензию матрикса раствором 0,9% NaCl до оптической плотности 2,5 $Е_{оп}$ на многоканальном спектрофотометре при длине волны 492 нм и 0,15 мл суспензии матрикса в лунке 96-луночного планшета для ИФА. Далее 0,1 М раствором фосфатного буфера с pH 7,4 доводили оптическую плотность суспензии до 2 $Е_{оп}$. В 1 мл рабочей суспензии содержалось 12,2 мг сухого матрикса и 0,1 мг Конго-красного. В качестве консерванта в суспензию добавляли азид натрия в концентрации 2 мг/мл.

Реакцию ставили в пробирках типа эппендорф. Реакционная смесь состояла из 0,1 мл исследуемого агента и 0,3 мл рабочей суспензии экзополимерного матрикса биопленки. Препараты ферментов — лизоцим (Sigma), протеиназа К (Sigma), гиалуронидаза бычья и стрептококковая, трипсин, пепсин, альфа-амилаза, ДНК-аза, рибонуклеаза, пероксидаза — все в концентрации 1 мг/мл. Препараты антисептиков использовались в рабочей концентрации. После инкубации в течение 24 ч при 37°С реакционную смесь центрифугировали 10 мин при 10 тыс. об./мин (7930 g) на центрифуге MIKRO 120 (Hettich) для осаждения не разрушенных компонентов матрикса и переносили по 0,15 мл надосадка в лунки планшета для иммуноферментного анализа. Далее производили учет результатов реакции по увеличению оптической плотности надосадка на многоканальном спектрофотометре Ф300 ТП при длине волны 492 нм в сравнении с отрицательными контрольными пробами, где вместо раствора исследуемого препарата использовали 0,9% NaCl. Результат рассчитывался как разница оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных.

Для пересчета итогового результата в пикокаталы была использована формула, полученная после корреляционно-регрессионного анализа и 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.

Нами было исследовано пять видов функций, характеризующих зависимость величины X от величины Y: экспоненциальная, линейная, логарифмическая, полиномиальная и степенная.

В результате анализа индексов детерминации каждой функции было установлено, что наилучшим образом тенденцию зависимости активности фермента от оптической плотности раствора описывает степенная функция, т. к. в данном случае индекс детерминации R2 наибольший — 0,986, т. е. 98,6% исходных данных подчиняются выбранной тенденции.

Степенную зависимость X от Y характеризует парабола (представлена на рисунке), уравнение которой имеет следующий вид:

$$X = (0{,}0027 + 1{,}7 \times Е_{оп})^2,$$

где X — искомый результат в мг освобожденного Конго-красного;

$Е_{оп}$ — оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

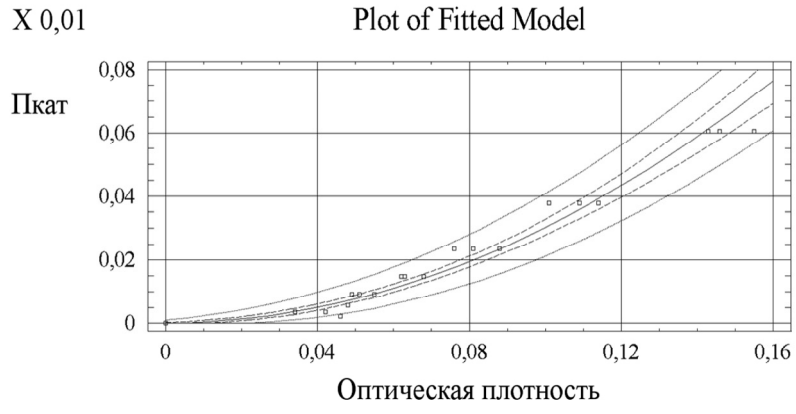



**Рисунок — Зависимость активности фермента от оптической плотности раствора**

Результаты определения способности ферментов разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. oralis* представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Способность ферментов к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки *S. oralis*

| | |
|---|---|
| Папаин (Carica papaya) | 0 |
| Пепсин (human) | 0,0073±0,001 |
| Пероксидаза (horseradish) | 0,008±0,001 |
| Протеиназа К (tritrachium album) | 0,092±0,009 |
| Рибонуклеаза (bovine pancreas) | 0,0017±0,0002 |
| Трипсин (bovine pancreas) | 0,00003±0,00001 |

Из ферментов наибольшая активность наблюдалась у гиалуронидазы I типа (бычья) 0,2±0,004 мг. В тоже время папаин подобной активностью не обладал.

Ферменты, которые показали наибольшие значения при расщеплении биопленки, были исследованы в комбинации для выявления их возможного сочетанного взаимодействия. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. — Влияние комбинации ферментов на способность расщеплять экзополимерный матрикс биопленки *S. oralis*

| Фермент | Активность, (M± σ), мг |
|---|---|
| ДНКаза + Гиалуронидаза I (бычья) | 0,008±0,0001 |
| Протеиназа + Гиалуронидаза I (бычья) | 0,0054±0,000015 |
| Протеиназа + ДНКаза | 0,0017±0,00006 |
| Протеиназа + Гиалуронидаза I (бычья) + ДНКаза | 0,001±0,00007 |

Из полученных данных следует, что при комбинации ферментов происходит снижение их активности.

Результаты определения способности антисептиков разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. oralis* представлены в таблице 3.

Таблица 3. — Способность антисептиков к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки *S. oralis*

| Антисептик | Активность, (M± σ), мг |
|---|---|
| Диметилсульфоксид 30% | 1,33±0,03 |
| Перекиси водорода 3% | 0,0024±0,0002 |
| Цитилпиридиний хлорид | 0,0037±0,00006 |
| «Белсол» (2% хлоргексидин биглюконат) | 0,0005±0,00005 |
| «Белсол» + «Белодез» (3% гипохлорит натрия) | 0,0018+0,00008 |

Наиболее активным антисептиком на основании опытных данных является диметилсульфоксид 30% 1,33±0,03 мг. Антисептики, у которых не было выявлено активности (септомирин, стоматидин, 0,05% хлоргекседин биглюконат, 3% гипохлорит натрия, фурациллин и йодиксин), в таблицу не включены.

Также была исследована способность аскорбиновой кислоты разрушать матрикс биопленки, ее активность составила 0,0018±0,00007 мг.

Для определения времени экспозиции было изучено действие ферментов и антисептиков на протяжении 24 ч. На основании анализа графиков было установлено, что ДНКаза и гиалуронидаза I (бычья) обладают максимальной активность при экспозиции 20 с, в то же время активность диметилсульфоксида 30% не зависит от времени экспозиции.

**Заключение.** На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Разработан метод количественного определения массы биопленки *in vitro* с использованием 96-луночного пластикового планшета.

2. Разработан метод для количественной оценки способности ферментов и антисептиков разрушать экзополимерный матрикс биопленки, образованной *S. oralis*.

3. Наибольшая активность из исследованных ферментов наблюдалась у гиалуронидазы I типа, что, вероятно, связано с расщеплением полисахаридов матрикса, оптимальное время экспозиции 20 с.

4. Наибольшую активность из антисептиков по отношению к матриксу биопленки *S. oralis* показал препарат диметилсульфоксид 30%, активность не зависела от времени экспозиции.

5. С использованием лазерной конфокальной микроскопии построена 3D модель биопленки *S. oralis*, установлено, что она имеет сложную трехмерную структуру толщиной от 50 до 60 мкм.

**Литература**

1. Haffajee, A.D. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations / A.D. Haffajee, S.S. Socransky // Periodontol. — 2000. — Vol. 5, № 1. — P. 78–111.

2. Манак, Т.Н. Микрофлора полости рта и ее роль в развитии заболеваний периодонта / Т.Н. Манак // Стоматол. журн. — 2012. — № 3. — С. 178–181.

3. Мальцев, С.В. Что такое биопленка / С.В. Мальцев, Г.Ш. Мансурова // Природная медицина: клинические исследования. – 2013. – № 1. – С. 86-89.

4. Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition *in vitro*. Quorum sensing: methods and protocols / T.H. Jakobsen [et al.] // Meth. Mol. Biol. — 2011. — Vol. 692. — P. 253–263.

5. Bacterial interactions in biofilms / P. Moons [et. al.] // Crit. Rev. Microbiol. — 2009. — Vol. 35, № 3. — P. 157–168.

6. Антибиотикорезистентность биоплёночных бактерий / И.В. Чеботарь [и др.] // Клинич. микробиол. антимикроб. химиотер. — 2012. — Т. 14, № 1. — С. 51–58.

7. Действие антисептиков на бактериальные биопленки у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта / Д.С. Щербакова [и др.] // Пародонтология. — 2011. — № 4. — С. 65–69.

8. Плотников, Ф.В. Комплексное лечение гнойных ран с учетом способности возбудителей образовывать биопленки: автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.01.17; 03.02.03 / Ф.В. Плотников; Витебск. гос. мед. ун-т. — Минск, 2015. — 23 с.

## MICROBIC BIOFILM OF THE PERIODONTAL POCKET AND POSSIBILITY OF INFLUENCE ON ITS MATRIX ENZYMES AND ANTISEPTICS

*Kolchanova N.E., Okulich V.K., Shilin V.E.*

*Educational Establishment "Vitebsk State Medical University", Vitebsk, Republic of Belarus*

The article reflects the current problem of diagnosis and treatment of inflammatory periodontal diseases. Biofilm-producing bacterial flora localized in periodontal pocket is researched. Methods of visual and quantitative assessment of biofilms are developed. Influences of antiseptic agents and enzymes on a microbial biofilms are studied as well.

**Keywords:** oral cavity biofilm, parodontitis, bacterial flora, enzymes, antiseptic agents.

Поступила 16.09.2015

## ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ — НОВЫЙ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ НЕУДАЧИ ЭМПИРИЧЕСКОЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ

*Жильцов И.В., Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Торосян Т.А., Прудников А.Р.*

*Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Проанализированы показатели, отражающие неэффективность стартовой эмпирической антибактериальной терапии, и определен уровень бета-лактамазной активности, определяющий эту неэффективность, что необходимо учитывать в клинической практике при планировании и/или коррекции эмпирической антибиотикотерапии у таких пациентов.

**Ключевые слова:** бета-лактамазная активность, ротовая жидкость.

**Введение.** Основным этапом лечения гнойно-воспалительной патологии челюстно-лицевой области является антибактериальная терапия, которая назначается эмпирически, соблюдая клинические протоколы. Однако контроль качества лечения осуществляется только клинически путем отбора гнойного отделяемого на чувствительность к антибиотикам. Результаты этого исследования известны не ранее чем через 24 ч и не всегда являются объективными. Поэтому невозможно оперативно отреагировать на «скрытое» ухудшение самочувствия, которое не отражается в обычных лабораторных показателях и которое вовремя можно подавить небольшими дозами антибактериальных препаратов в более короткие сроки. Также необходимо выявить показатели, указывающие на необходимость смены антибактериальной терапии.

**Цель** исследования — оценка уровней бета-лактамазной активности ротовой жидкости, отражающих неудачу стартовой антибактериальной терапии и выработка стратегии по улучшению качества лечения пациентов.

**Материалы и методы.** В исследование было вовлечено 200 пациентов за период февраль 2013 г. — июнь 2015 г. в возрасте от 9 до 72 лет (средний возраст — 24,4±8,96 года) с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области (ГВЗ ЧЛО), госпитализированных в отделение челюстно-лицевой хирургии УЗ «ВОКБ» и в различные отделения УЗ «ВОКИБ». Материал для исследования представлял собой гнойное отделяемое, которое собирали из ротовой полости стерильным ватным тампоном. Для оценки бета-лактамазной активности слюны использовалась тест-система «Биолактам» (ООО «Сивитал», РБ).

**Результаты и их обсуждение.** В 97,4% (95% ДИ: 94,9…99,9) исследованных образцов ротовой жидкости пациентов с ГВЗ ЧЛО была выявлена собственная бета-лактамазная активность, равная или превышающая 1%. У лиц группы сравнения данный показатель составил 84,6% (95% ДИ: 74,8… 94,4).

Характеристики бета-лактамазной активности во всех группах сравнения, включенных в исследуемую выборку, приведена в таблице 1.

Важным этапом статистического анализа результатов клинических испытаний нового метода лабораторной диагностики является установление отсечного значения — бета-лактамазной активности ротовой жидкости, при превышении которого можно с определенной степенью достоверности констатировать наличие у пациента неэффективности антибиотиков бета-лактамного ряда.

Таблица 1. — Общая характеристика показателей бета-лактамазной активности проб ротовой жидкости во всех изученных группах сравнения

| Показатели | Все ГВЗ ЧЛО (n = 200) | Хирургические ГВЗ ЧЛО (n = 121) | Терапевтические ГВЗ ЧЛО (n = 79) | Группа сравнения (n = 45) |
|---|---|---|---|---|
| Средняя<br>95% ДИ | 39,6%<br>35,0…44,1 | 41,3%<br>35,9…46,8 | 36,3%<br>27,8…44,7 | 18,0%<br>13,2…22,7 |
| Медиана<br>95% ДИ<br>25‰;<br>75‰ | 32,6%<br>23,4…45,6<br>12,2;<br>68,3 | 41,2%<br>24,4…49,0<br>13,6;<br>69,0 | 24,5%<br>14,8…54,7<br>7,9;<br>61,8 | 17,8%<br>3,8…25,5<br>1,9;<br>27,4 |
| Min…max | 0…94,3% | 0…87,4% | 0,9…94,3 | 0…68,6 |

Как известно, не существует клинико-лабораторных признаков, прямо указывающих на неэффективность проводимой антибактериальной терапии, ввиду чего в настоящей работе использовались *косвенные признаки ее неэффективности* — факт смены антибиотика в ходе лечения, общее количество смен антибиотиков, факт назначения антибиотиков резерва (как из группы бета-лактамов, так и из других фармакологических групп), общая продолжительность антибактериальной терапии. Каждый из перечисленных признаков в отдельности мог быть обусловлен случайным сочетанием клинических и организационных факторов, но их совокупный анализ позволяет получить представление об эффективности либо неэффективности антибиотикотерапии, назначенной каждому из пациентов с ГВЗ ЧЛО, включенных в исследование.

Поэтому был произведен ROC-анализ соотношения чувствительности и специфичности для нахождения диапазона значений бета-лактамазной активности, отражающего совокупный анализ различных показателей, прямо или косвенно подтверждающих неэффективность антибиотикотерапии. Результаты анализа приведены в таблице 2 (в качестве наглядного примера приведена ROC-кривая эпизода смены антибактериальной терапии — ключевого элемента результатов исследования по нашему мнению). Для большей наглядности восприятия числовые данные таблицы 2 изображены в виде ящичных диаграмм на рисунке 2.

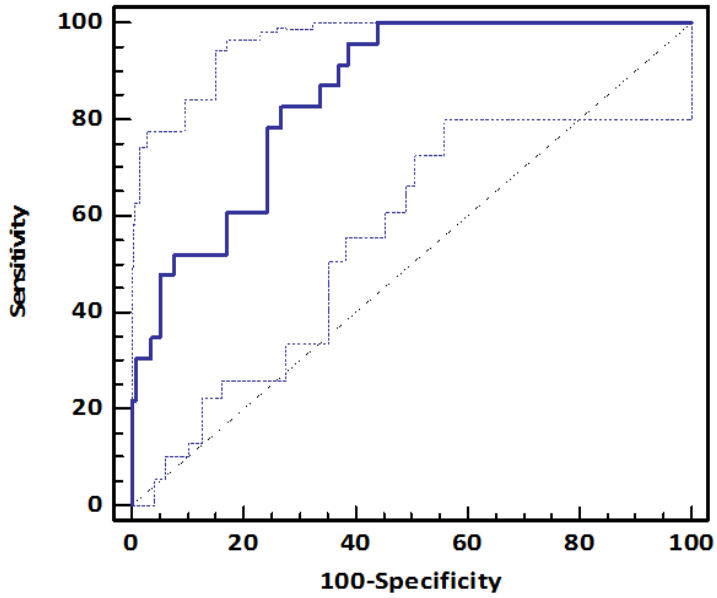
Таблица 2. — Пороговые уровни бета-лактамазной активности ротовой жидкости, указывающие на возможную неэффективность стартовой антибактериальной терапии у пациентов с ГВЗ ЧЛО (чувствительность всех показателей выше 45%)

| Суррогатный критерий неэффективности антибактериальной терапии | Пороговый уровень при специфичности ≥60% | Пороговый уровень при специфичности ≥70% | Пороговый уровень при специфичности ≥80% |
|---|---|---|---|
| Эпизод смены антибактериальной терапии (n = 28) | 35,0% | 47,0% | 67,7% |
| Две и более последовательные смены антибактериальной терапии (n = 11) | 43,9% | 54,4% | 80,6% |
| Назначение антибиотиков резерва (n = 35) | 41,3% | 49,0% | 67,2% |
| Назначение антибиотиков резерва бета-лактамного ряда (n = 37) | 45,6% | 60,6% | 73,6% |
| Назначение антибиотиков из других фармакологических групп (n = 14) | 35,0% | 45,7% | 66,7% |
| Назначение антибиотиков резерва, не относящихся к бета-лактамам (n = 34) | 43,0% | 53,2% | 70,7% |
| Общая продолжительность антибактериальной терапии ≥10 сут (n = 25) | 34,6% | 44,9% | 59,0% |
| Общая продолжительность антибактериальной терапии ≥11 сут (n = 18) | 41,3% | 49,0% | 67,1% |
| Общая продолжительность антибактериальной терапии ≥14 сут (n = 10) | 43,9% | 53,5% | 69,8% |
| **Среднее (95% ДИ)** | **40,4% (37,1…43,7)** | **50,8% (46,9…54,7)** | **69,2% (64,7…73,6)** |

Анализируя таблицу 2, хорошо видно, что при условии приоритета специфичности (желаемый уровень специфичности ≥60–80%) разброс полученных значений пороговых уровней бета-лактамазной активности относительно невелик, что может быть использовано для составления клинических рекомендаций.

В частности, коллектив авторов считает, что в данной ситуации имеет смысл ввести т. н. «серую зону»: интервал значений бета-лактамазной активности ротовой жидкости от 40 до 70% считать соответствующим возможному наличию устойчивости к бета-лактамным антибиотикам первой линии, а ≥70% — вероятному наличию устойчивости к данным антибактериальным препаратам.

Установленный для ROC-анализа минимальный достаточный уровень специфичности ≥80% означает, что при величине бета-лактамазной активности ротовой жидкости, равной или превышающей пороговый уровень, устойчивость ротовой микрофлоры к бета-лактамным антибиотикам первой линии гарантированно имеет место в 8 и более случаях из 10.




В данном случае площадь под ROC-кривой (AUC) = 0,852 (95% ДИ: 0,782…0,907), чувствительность 60,9% (95% ДИ: 38,6… 80,3) и специфичность 80,2% (95% ДИ: 71,7…87,0), p = 0,0001, т. е. результат является статистически значимым

**Рисунок 1. — ROC-кривая для ситуации, когда уровень бета-лактамазной активности ротовой жидкости используется для предсказания эпизода смены антибактериальной терапии**

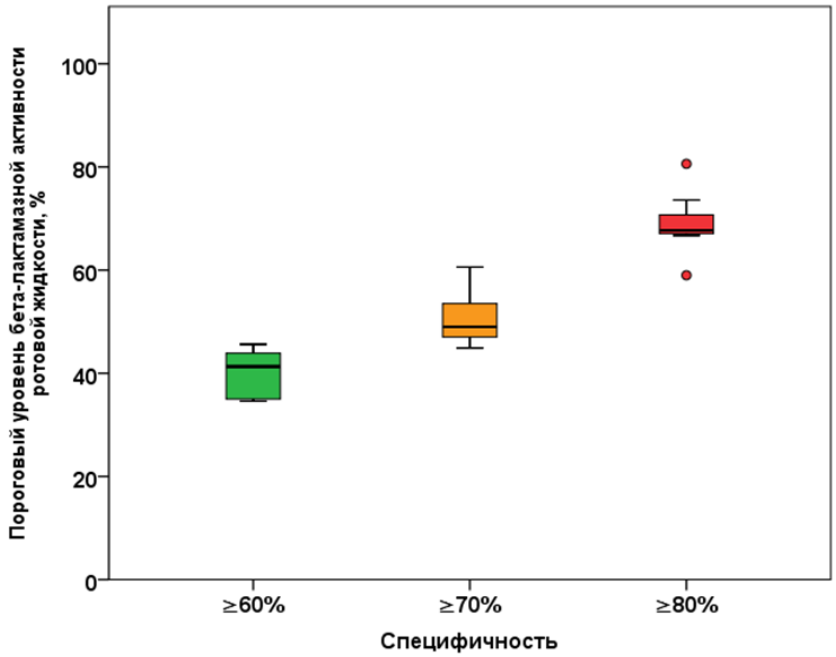



**Рисунок 2. — Пороговые уровни бета-лактамазной активности ротовой жидкости, указывающие на возможную неэффективность стартовой антибактериальной терапии**

**Заключение.** Из полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. У лиц из группы сравнения без визуальных признаков ГВЗ ЧЛО в ротовой полости обитает непатогенная или условно-патогенная микрофлора, продуцирующая бета-лактамазы.

2. Микрофлора ротовой полости пациентов с терапевтическими и хирургическими ГВЗ ЧЛО примерно в половине случаев характеризуется повышенной продукцией бета-лактамаз, что должно приводить к снижению эффективности антибиотикотерапии с использованием бета-лактамов.

3. Уровни бета-лактамазной активности ротовой жидкости в группах пациентов с терапевтическими и хирургическими ГВЗ ЧЛО значимо не различаются между собой, но достоверно выше, чем в группе сравнения. Соответственно, можно предполагать, что представители патогенной микрофлоры полости рта обладают повышенной способностью к продукции бета-лактамаз.

4. При уровне бета-лактамазной активности выше 69,2% устойчивость ротовой микрофлоры к бета-лактамным антибиотикам первой линии гарантированно имеет место у 8 и более пациентов из 10, ввиду чего возникает необходимость сменить антибактериальный препарат на ингибиторзащищенный бета-лактамный антибиотик или препарат из других фармакологических групп с аналогичным спектром активности.

**Литература**

1. Шаргородский, А.Г. Клиника, диагностика, лечение и профилактика воспалительных заболеваний лица и шеи: руководство для врачей / А.Г. Шаргородский. — М., 2002. — 515 с.

2. Current trends in endodontic treatment: report of a national survey / B. Whitten [et al.] // J. Am. Dent. Assoc. — 1996. — Vol. 127. — P. 1333.

3. Walton, R. Антибиотики в стоматологии: благо или зло? / R. Walton, M. Serr, D. Peterson // Новости МСРПА. — 2003. — № 3. — С. 1–5.

## HIGH LEVEL OF BETA-LACTAMASE ACTIVITY — THE NEW CLINICAL-LABORATORY INDICATOR OF FAILURE EMPIRICAL ANTIBACTERIAL THERAPY AT PATIENTS WITH DISEASES OF MAXILLOFACIAL AREA

*Zhyltsou I.V., Semenov V.M., Dmitrachenko T.I., Torosan T.A., Prudnikau A.R.*

*Educational Establishment "Vitebsk State Medical University", Vitebsk, Republic of Belarus*

The analysis of indicators reflecting the inefficiency of the starting empiric antibiotic therapy was carried out, as well as determined the level of beta-lactamase activity defining this inefficiency, which is to be considered in clinical practice when planning and/or correcting empirical antibiotic therapy in these patients.

**Keywords:** beta-lactamase activity, oral fluid.

Поступила 23.09.2015

## КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОБЩЕГО УРОВНЯ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ И МЕХАНИЗМОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ АССОЦИАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫЯВЛЯЕМОЙ В РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ПРИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ

*Жильцов И.В., Семтбнов В.М., Дмитраченко Т.И., Торосян Т.А., Прудников А.Р.*

*Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Общий уровень бета-лактамазной активности ротовой жидкости является определяющим фактором при назначении антибактериальной терапии у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области; выделяемая микрофлора из ротовой полости и очагов гнойного воспаления вносит незначительный вклад в уровень бета-лактамазной активности слюны и по большей части не является источником инфекции данной области. Успешная антибактериальная терапия не приводит к полной элиминации бета-лактамазо-продуцирующих штаммов микроорганизмов из ротовой полости пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области, несмотря на исчезновение клинических признаков соответствующих заболеваний.

**Ключевые слова:** ротовая жидкость, микрофлора, бета-лактамазная активность.

**Введение.** Наиболее сложной и актуальной проблемой стоматологии на протяжении многих лет остаются гнойно-воспалительные заболевания челюстно-лицевой области. Количество пациен-

тов с тяжелыми и распространенными процессами не имеет тенденции к снижению. Несмотря на значительный арсенал антимикробных препаратов, именно адекватная эмпирическая антибактериальная терапия остается важнейшим компонентом хирургического вмешательства.

При выделении микрофлоры из ротовой полости и очагов гнойного воспаления челюстно-лицевой области встречаются ассоциации 2–6 видов микроорганизмов: аэробов (стрептококков и стафилококков) и облигатных анаэробов (бактероидов, фузобактерий, пептострептококков) [1, 2]. Частота выделения анаэробов составляет до 52–68%, реже при неодонтогенных процессах ЧЛО — 20%, при одонтогенных заболеваниях — 67,7–96% [1, 2].

Находясь в симбиозе, бактерии при развитии инфекции поэтапно вступают в антагонистические и синергические отношения. Этим объясняется отрицательная динамика клинической картины заболевания при смешанных анаэробно-аэробных инфекциях.

Лечение лиц с ГВЗ ЧЛО является комплексным и включает оперативное вмешательство, местное лечение гнойной раны, системную АБТ, физиолечение, по показаниям — дезинтоксикационную терапию. Тактика хирургического лечения в настоящее время определена достаточно полно. Она включает вскрытие гнойно-воспалительного очага путем послойного рассечения тканей над ним, а также дренирование операционной раны с целью создания условий для эвакуации гнойного экссудата, содержащего возбудителей заболевания, продукты их жизнедеятельности и распада тканей [3].

По данным Medical Advertising News (США), врачи-стоматологи ежедневно назначают своим пациентам от 2 до 10 антибиотиков; особенно часто антибиотики назначаются пациентам с жалобами на боль и припухлость мягких тканей лица [3]. Практически отсутствуют данные, подтверждающие целесообразность системной АБТ при многих манипуляциях в стоматологии. Более того, результаты рандомизированных клинических исследований свидетельствуют о нежелательности системного использования антибиотиков в амбулаторной практике [4]. Полость рта, по образному выражению, является «колыбелью антибиотикорезистентности», т. к. изобилует микрофлорой, этиологическая значимость которой в развитии очага инфекции часто не выявляется, а неадекватное применение антимикробных препаратов изменяет качественный ответ не только клинически значимых возбудителей, но и представителей облигатной, а также факультативной флоры. АБТ в стационаре нередко осуществляется без бактериологического контроля, что способствует развитию резистентности микрофлоры, аллергизации организма, нарушению микробиоценоза кишечника [5, 6].

В связи с вышесказанным основными причинами неэффективности АБТ при лечении могут быть:

- недренированный очаг гнойного воспаления или наличие инородного тела в ране;
- небактериальный возбудитель инфекционного процесса (например, патогенные грибы);
- неадекватный выбор антибиотика (к которому имеется природная либо приобретенная устойчивость возбудителя либо с неоптимальной фармакокинетикой, например, с низкой биодоступностью при пероральном приёме);
- изменение уровня антибиотикочувствительности возбудителя ГВЗ в процессе антибактериальной терапии;
- применение субтерапевтических доз антибактериальных препаратов, нарушение методики их приема или техники введения;
- случаи, когда гнойно-воспалительные процессы ЧЛО являются осложнением основного заболевания, не являющегося инфекционным (врожденные кисты, новообразования и т. п.);
- суперинфекция высокорезистентной госпитальной микрофлорой.

И даже если лечение было проведено в соответствии со всеми рекомендациями и на основании клинического опыта, элиминируется ли возбудитель из организма полностью при отрицательных клинических и лабораторных показателях или остается какой-то микроорганизм, готовый в любой подходящий момент спровоцировать новое гнойно-воспалительное заболевание остается вопросом.

**Цель** исследования — установление взаимосвязи между резистентностью микрофлоры, выявляемой в ротовой полости при гнойно-воспалительных заболеваниях челюстно-лицевой области, и общим уровнем бета-лактамазной активности у данных пациентов, а также оценка влияния микрофлоры на уровень бета-лактамазной активности ротовой жидкости.

**Материалы и методы.** Опытная группа пациентов с ГВЗ ЧЛО (n = 158) была составлена из двух подгрупп: пациентов с терапевтическими (n = 57) и хирургическими (n = 101) ГВЗ ЧЛО.

Пациенты с хирургической гнойно-воспалительной патологией ЧЛО находились на лечении в отделении челюстно-лицевой хирургии УЗ «Витебская областная клиническая больница» (ВОКБ) в 2010–2014 гг. Пациенты с острыми гнойными тонзиллитами находились на лечении в УЗ «Витебская областная инфекционная клиническая больница» (ВОКИБ) с 2010 по 2014 гг.

Группа сравнения (n = 52) была составлена из практически здоровых студентов 4–5-го курсов УО «ВГМУ» и сотрудников отделения челюстно-лицевой хирургии УЗ «ВОКБ», а также кафедры хирургической стоматологии детского возраста, у которых в ходе визуального стоматологического обследования не было выявлено гнойно-воспалительной патологии ЧЛО.

Образцы ротовой жидкости пациентов и лиц из группы сравнения сохранялись при -20°С в пробирках Эппендорфа; непосредственно перед исследованием все пробы одновременно размораживались, после чего центрифугировались при 10000 об./мин в течение 5 мин с использованием центрифуги Centrifuge MPW-310. По окончании центрифугирования отделялся прозрачный надосадок, который использовался в дальнейших исследованиях, вязкая же нерастворимая часть слюны (осадок) аннулировалась. В случае, если общий объем надосадка оказывался менее 0,2 мл, он доводился до 0,2 мл стерильным физиологическим раствором хлорида натрия.

Непосредственно для измерения бета-лактамазной активности ротовой жидкости была использована тест-система «БиоЛактам», разработанная ранее коллективом кафедры инфекционных болезней УО «ВГМУ» и производимая ООО «СИВитал» (РБ). В качестве контрольных проб использовали:

1) контроль самораспада нитроцефина — вместо 100 мкл испытуемой пробы в ячейку вносилось 100 мкл 0,1 М ФБР, pH 7,4;

2) контроль фоновой окраски — вместо 100 мкл раствора нитроцефина в ячейку вносилось 100 мкл 0,1 М ФБР, pH 7,4;

3) контроль полного распада нитроцефина — вместо 100 мкл испытуемого образца в ячейку вносилось 20 мкл раствора бактериальной пенициллиназы в дистиллированной воде и 80 мкл 0,1 М ФБР, pH 7,4;

4) контроль оптической плотности пустой ячейки — соответствующие ячейки оставляли пустыми.

Все контрольные пробы инкубировались при 37°С в течение 120 мин вместе с испытуемыми образцами ротовой жидкости.

Итоговую бета-лактамазную активность рассчитывали по следующей формуле:

$$А = ((0 – К) – (РБ – ПЯ)) / (ПР – ПЯ) \times 100,$$

где А — искомая бета-лактамазная активность;
0 — оптическая плотность опытной пробы;
К — оптическая плотность контрольной пробы;
РБ — оптическая плотность нитроцефина;
ПР — оптическая плотность полного распада нитроцефина;
ПЯ — оптическая плотность пустой ячейки.

Бактериологический анализ ротовой жидкости выполнялся на базе бактериологической лаборатории УЗ «ВОКИБ» в соответствии с действующими в Республике Беларусь нормативными документами (приказ МЗ СССР № 535 от 22.04.1985 [7]). Следует подчеркнуть, что при существующей схеме бактериологического анализа, а также с учетом разнообразия видов ротовой микрофлоры, многие представители которой являются непатогенными, условно-патогенными, патогенными только при условии наличия определенных микроорганизмов-симбионтов, а также облигатными анаэробами, требующими особых условий культивирования, выделение истинного возбудителя конкретного ГВЗ ЧЛО представляется маловероятным, а анализ присутствия и свойств ко-патогенной микрофлоры — невозможным.

Все выделенные из ротовой жидкости изоляты патогенных микроорганизмов (*S. epidermidis*; БГСА, *Str. spp.*; *S. aureus*; *P. aeruginosa*; *E. coli*; *C. albicans* и др., n = 85) были протестированы на предмет устойчивости к ампициллину, оксациллину, цефотаксиму, амоксициллин/клавуланату, цефтазидиму, цефоперазону и цефепиму, цефуроксиму, меропенему, что должно было позволить зафик-

сировать продукцию бета-лактамаз вообще, и БЛРС в частности. При этом был использован дискодиффузионный метод в его классическом варианте [8].

Определение антибиотикоустойчивости проводилось в агаре Мюллер–Хинтон II с использованием дисков BBL фирмы Becton Dickinson (США). Результаты интерпретировали в соответствии со стандартами CLSI [9].

Далее для приготовления бактериальной взвеси использовали 18–20-часовую агаровую или 5–6-часовую бульонную культуру исследуемого микроорганизма. Суспензию из агаровой культуры или бульонную культуру доводили стерильным физиологическим раствором хлорида натрия до показателя мутности 0,1 Ед McFarland (конечная концентрация — $1–2\times10^7$ КОЕ/мл). Эппендорфы с бактериальными взвесями центрифугировались в течение 10 мин при 10000 об./мин с использованием центрифуги Centrifuge MPW-310, брали 100 мкл надосадочной жидкости и далее постановка опыта не отличалась от исследования бета-лактамазной активности ротовой жидкости (с помощью вышеупомянутой тест-системы «БиоЛактам»).

**Результаты и их обсуждение.** В 97,4% (95% ДИ: 94,9…99,9) исследованных образцов ротовой жидкости пациентов с ГВЗ ЧЛО была выявлена собственная бета-лактамазная активность, равная или превышающая 1%. У лиц группы сравнения данный показатель составил 84,6% (95% ДИ: 74,8… 94,4). Характеристики бета-лактамазной активности во всех группах сравнения, включенных в исследуемую выборку, приведены в таблице 1.

Таблица 1. — Общая характеристика показателей бета-лактамазной активности проб ротовой жидкости во всех изученных группах

| Показатели | Все ГВЗ ЧЛО (n = 158) | Хирургические ГВЗ ЧЛО (n = 101) | Терапевтические ГВЗ ЧЛО (n = 57) | Группа сравнения (n = 52) |
|---|---|---|---|---|
| Средняя<br>95% ДИ | 39,6%<br>35,0…44,1 | 41,3%<br>35,9…46,8 | 36,3%<br>27,8…44,7 | 18,0%<br>13,2…22,7 |
| Медиана<br>95% ДИ<br>25‰<br>75‰ | 32,6%<br>23,4…45,6<br>12,2;<br>68,3 | 41,2%<br>24,4…49,0<br>13,6;<br>69,0 | 24,5%<br>14,8…54,7<br>7,9;<br>61,8 | 17,8%<br>3,8…25,5<br>1,9;<br>27,4 |
| Min…max | 0…94,3% | 0…87,4% | 0,9…94,3 | 0…68,6 |

Из табличных данных хорошо заметно, что наибольшая бета-лактамазная активность ротовой жидкости ожидаемо наблюдается в группе пациентов с хирургическими ГВЗ ЧЛО, несколько меньшая — в группе пациентов с терапевтическими ГВЗ ЧЛО (т. е. с острыми гнойными тонзиллитами), а наиболее низкая — в группе сравнения практически здоровых лиц.

Различия средних уровней бета-лактамазной активности и их медианных показателей в сравниваемых группах являются статистически значимыми (непараметрический дисперсионный анализ Краскелла–Уоллиса, $p<0,0001$; медианный тест, $p = 0,01$). При этом различия между группами пациентов с терапевтическими и хирургическими ГВЗ ЧЛО статистически незначимы (U-тест Манна–Уитни, $p = 0,15$), в то время как средние уровни бета-лактамазной активности ротовой жидкости в обеих группах пациентов статистически значимо отличаются от соответствующих показателей группы сравнения (U-тест Манна–Уитни, $p = 0,0026$ для группы пациентов с острыми гнойными тонзиллитами и $p<0,000001$ для группы пациентов с хирургическими ГВЗ ЧЛО).

Также была проведена оценка динамических изменений уровня бета-лактамазной активности ротовой жидкости у пациентов с ГВЗ ЧЛО в ходе терапии. У 20 пациентов с хирургическими ГВЗ ЧЛО бета-лактамазная активность ротовой жидкости оценивалась дважды (при поступлении в стационар и перед выпиской) с целью изучения влияния антибактериальной терапии на наличие и уровень бета-лактамазной активности ротовой жидкости. Средняя продолжительность временного интервала между парными исследованиями бета-лактамазной активности ротовой жидкости составила 8 сут (95% ДИ: 6,8…9,2). Аналогичной была и средняя продолжительность антибактериальной терапии у пациентов из данной подгруппы.

Средний уровень бета-лактамазной активности ротовой жидкости у пациентов подгруппы составлял 37,1% (95% ДИ: 27,7…46,5) до начала антибактериальной терапии и 32,5% (95% ДИ: 18,1…46,9) — на момент ее окончания. Показатели уровня бета-лактамазной активности ротовой жидкости у 20 пациентов с ГВЗ ЧЛО в начале госпитализации и при выписке из стационара графически отображены на рисунке.

Медиана значений уровня бета-лактамазной активности ротовой жидкости в начале госпитализации составила 30,2% (95% ДИ: 15,9…48,0), а перед выпиской из стационара — 11,1% (95% ДИ: 5,8…64,6).

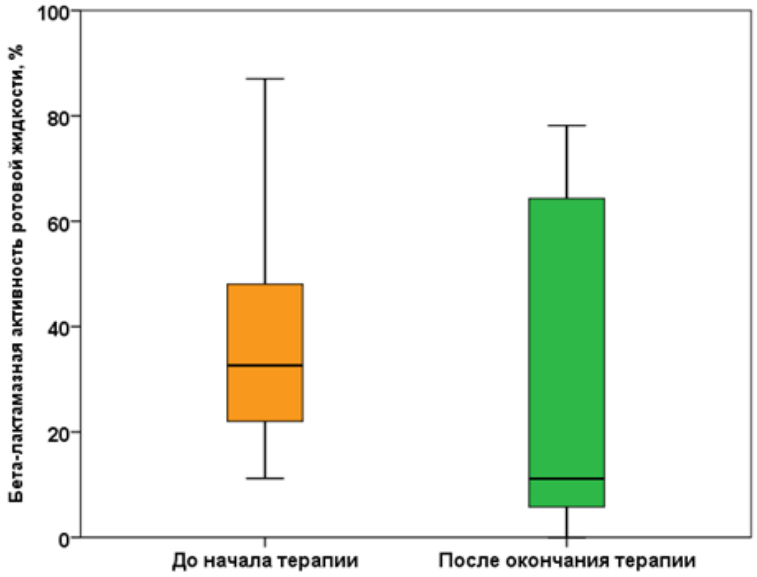



**Рисунок — Показатели уровня бета-лактамазной активности ротовой жидкости у 20 пациентов с ГВЗ ЧЛО в начале госпитализации и при выписке из стационара**

Видно, что имеется тенденция к снижению бета-лактамазной активности ротовой жидкости в результате антибактериальной терапии: ее средний уровень снизился с 37,1 до 32,5%, а медиана — с 30,2 до 11,1%, что говорит о резком увеличении количества проб ротовой жидкости с невысокой бета-лактамазной активностью. Тем не менее разница оказалась статистически незначима (sign rank test, $p = 0,58$) из-за небольшого размера изучаемой подгруппы ($n = 20$) и существенного разброса значений уровня бета-лактамазной активности ротовой жидкости, как в начале стационарного лечения, так и после окончания курса антибактериальной терапии.

Можно констатировать, что полный курс антибактериальной терапии (в т. ч. успешной) не приводит к полной элиминации бета-лактамазо-продуцирующих штаммов микроорганизмов из ротовой полости пациентов с ГВЗ ЧЛО, несмотря на исчезновение клинических признаков соответствующих заболеваний. Данный факт наводит на мысль, что бета-лактамазы класса А, обуславливающие ≥80% суммарной бета-лактамазной активности ротовой жидкости, продуцируются преимущественно представителями ко-патогенной микрофлоры, обладающими полирезистентностью к антибактериальным препаратам разных классов; в итоге успешной антибиотикотерапии патогенные микроорганизмы, которые и вызывают ГВЗ ЧЛО, гибнут, а непатогенные микроорганизмы-продуценты бета-лактамаз — выживают.

Бактериологическое исследование ротовой жидкости пациентов с ГВЗ ЧЛО показало следующие результаты:

1. Из образцов ротовой жидкости пациентов с ГВЗ ЧЛО было выделено всего 85 чистых культур различных патогенных микроорганизмов, при этом из ротовой жидкости 8 пациентов было выделено по 2 культуры различных бактерий. Из ротовой жидкости пациентов с терапевтическими ГВЗ ЧЛО было выделено 27 чистых культур (в 6 случаях по 2 культуры), с хирургическими — соответственно 58 (в 2 случаях по 2 культуры). Общий спектр выделяемой микрофлоры представлен в таблице 2. Средняя частота выделения патогенных микроорганизмов из ротовой жидкости паци-

ентов с ГВЗ ЧЛО составила 48,7%. При этом в группе пациентов с хирургическими ГВЗ ЧЛО патогенные микроорганизмы выделялись из ротовой жидкости значимо чаще, чем при терапевтической патологии.

Таблица 2. — Количество клинических изолятов микроорганизмов каждого вида, выделенных от пациентов с терапевтическими и хирургическими ГВЗ ЧЛО

| Вид патогенных микроорганизмов | Пациенты с хирургическими ГВЗ ЧЛО | Пациенты с терапевтическими ГВЗ ЧЛО | Достоверность различий p (критерий Chi square) |
|---|---|---|---|
| *S. epidermidis* | 34 | 0 | <0,0001 |
| БГСА, *Str. spp.* | 8 | 20 | 0,0002 |
| *S. aureus* | 7 | 3 | 0,57* |
| *P. aeruginosa* | 4 | 0 | 0,11* |
| *K. pneumoniae* | 3 | 0 | 0,18* |
| *E. coli* | 1 | 0 | 0,43* |
| Энтеробактерии | 8 | 0 | 0,022 |
| *C. albicans* | 1 | 4 | 0,053* |
| Примечание — * — различия не являются статистически значимыми. | | | |

2. В большинстве случаев (n = 72, или 84,7%) из ротовой жидкости пациентов с ГВЗ ЧЛО выявлялись грам(+) кокки — различные виды стрепто- и стафилококков. Энтеробактерии были выделены лишь у 8 пациентов (9,4%). При этом в ходе исследования не было выделено ни одного специфического возбудителя ГВЗ ЧЛО, характерного только для ротовой полости.

3. Из 28 клинических изолятов БГСА и недифференцированных стрептококков 1 штамм проявил устойчивость к цефазолину и ампициллину, еще 3 — только к ампициллину; все изученные изоляты оказались чувствительными к цефалоспоринам 2–4 поколений и карбапенемам. Большая часть изученных клинических изолятов стафилококков (n = 36, или 81,8%) оказалась чувствительна ко всем испытанным антибиотикам бета-лактамного ряда, 4 изолята (9,1%) являлись MRSA и только в 5 случаях (11,4%) можно было думать о продукции бета-лактамаз (в одном случае, вероятно, БЛРС). Из 8 выделенных изолятов энтеробактерий 4 (50%) обладали устойчивостью к антибиотикам цефалоспоринового ряда 2–4 поколений, что, вероятно, указывает на продукцию ими бета-лактамаз с соответствующей субстратной специфичностью.

4. Средний уровень бета-лактамазной активности клинических изолятов стафилококков составил 13,3%. При этом 57,1% изолятов стафилококков характеризовалось нулевой бета-лактамазной активностью, а еще у 19,1% изолятов указанная активность не превышала 14,2% и, соответственно, не имела клинического значения. Таким образом, подавляющее большинство (76,2%) клинических изолятов стафилококков либо не продуцирует бета-лактамазы, либо продуцирует минимальное их количество.

5. Средний уровень бета-лактамазной активности клинических изолятов энтеробактерий, выделенных в настоящем исследовании, составил 58,7%. Больший средний уровень бета-лактамазной активности чистых культур энтеробактерий соответствует более выраженной устойчивости данных микроорганизмов к антибиотикам бета-лактамного ряда.

6. Имеется соответствие (статистически значимые средней силы и сильные прямые корреляции, R = 0,508…0,801) между уровнями бета-лактамазной активности чистых культур клинических изолятов патогенных микроорганизмов и наличием у них устойчивости к бета-лактамным антибиотикам, выявленной диско-диффузионным методом, что подтверждает высокую достоверность данных, получаемых при помощи тест-системы «БиоЛактам».

7. Уровень бета-лактамазной активности ротовой жидкости пациентов с ГВЗ ЧЛО не коррелирует с уровнями бета-лактамазной активности суспензий чистых культур микроорганизмов, выделенных из соответствующих проб ротовой жидкости. При этом средний уровень бета-лактамазной активности ротовой жидкости (40,3%) значимо (p = 0,0035) выше, чем средний уровень бета-

лактамазной активности суспензий чистых культур микроорганизмов, выделенных из соответствующих проб ротовой жидкости (27,9%).

**Заключение.** Из полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Успешная антибактериальная терапия не приводит к полной элиминации бета-лактамазопродуцирующих штаммов микроорганизмов из ротовой полости пациентов с ГВЗ ЧЛО, несмотря на исчезновение клинических признаков соответствующих заболеваний.

2. Средняя частота выделения патогенных микроорганизмов из ротовой жидкости пациентов с ГВЗ ЧЛО составила 48,7%.

3. Клинически значимой бета-лактамазной активностью обладают лишь энтеробактерии (9,4% от выделенной микрофлоры) и 23,8% выделенных стафилококков, что приводит к заключению о незначительной доли выделенной микрофлоры к общей бета-лактамазной активности ротовой полости.

4. Бета-лактамазная активность ротовой жидкости определяется прежде всего свойствами копатогенной микрофлоры, способной продуцировать бета-лактамазы, но не обнаруживаемой при рутинном бактериологическом исследовании ротовой жидкости и/или отделяемого из очагов гнойного воспаления. Ввиду этого плановый микробиологический анализ ротовой жидкости пациентов с ГВЗ ЧЛО, выполняемый с целью возможной коррекции эмпирической антибактериальной терапии, практически не имеет клинической ценности.

**Литература**

1. Ушаков, Р.В. Комплексный подход к антимикробной терапии в лечении одонтогенных гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области / Р.В. Ушаков, В.Н. Царев // Рос. стоматол. журн. — 2003. — № 6. — С. 40–44.

2. Bauermeister, C.D. Mikrobiologische Diagnostik parodontaler infektionen / C.D. Bauermeister // ZMK. — 2003. — Vol. 1. — P. 2–12.

3. Тимофеев, А.А. Гнойная хирургия челюстнолицевой области и шеи: учеб. пособие / А.А. Тимофеев. — Киев, 1995. — 172 с.

4. Current trends in endodontic treatment: report of a national survey / B. Whitten [et al.] // J. Am. Dent. Assoc. — 1996. — Vol. 127. — P. 1333–1341.

5. Walton, R. Антибиотики в стоматологии: благо или зло? / R. Walton, M. Serr, D. Peterson // Новости МСРПА. — 2003. — № 3. — С. 1–5.

6. Новые подходы к дифференциальной диагностике и тактике лечения воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области / В.З. Вольфовский [и др.] // Новые методы диагностики, лечения заболеваний и управления в медицине: материалы науч.-практ. конф. ГОКБ. — Новосибирск, 2000. — С. 271–272.

7. Bennett's principles and practice of infectious diseases / L.A. Mandell [et al.]. — 5th ed. — Philadelphia: Churchill Livingston, 2000. — P. 306–307.

8. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 22.04.1985 № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://bestpravo.ru/fed1991/data03/ tex14204.htm. — Дата доступа: 14.08.2011.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. CLSI Document M100-S22. — 2012. — Vol. 32, № 1. — P. 188.

## CLINICAL SIGNIFICANCE OF TOTAL LEVEL OF ORAL FLUID BETA-LACTAMASE ACTIVITY AND MECHANISMS OF RESISTANCE OF MICROORGANISMS ASSOCIATION IDENTIFIED IN ORAL CAVITY WITH PURULENT-INFLAMMATORY DISEASES OF MAXILLOFACIAL AREA

*Zhyltsou I.V., Semenov V.M., Dmitrachenko T.I., Torosan T.A., Prudnikau A.R.*

*Educational Establishment "Vitebsk State Medical University", Vitebsk, Republic of Belarus*

The overall level of beta-lactamase activity of oral fluid is a determining factor in the appointment of antibacterial therapy in patients with purulent-inflammatory diseases of maxillofacial area. Oral microflora and purulent inflammation foci make a minor contribution to the levels of saliva beta-lactamase activity and mostly is not a source of infection in this area. Successful antibiotic therapy does not lead to complete

elimination of beta-lactamase-producing strains of microorganisms from the oral cavity of patients with purulent-inflammatory diseases of the maxillofacial area, despite the disappearance of the clinical disease symptoms.

**Keywords:** oral fluid, microflora, beta-lactamase activity.

Поступила 23.10.2015

## ОЦЕНКА ЭЛАСТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ С СИАЛОАДЕНИТАМИ

*Корнеева Д.Е., Гончарова А.И., Окулич В.К.*

*Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Статья отражает актуальность проблемы лечения и диагностики воспалительных заболеваний больших слюнных желез. Произведена оценка активности нейтрофильной эластазы ротовой жидкости у пациентов с сиалоденитами и здоровых лиц. Данный метод можно использовать в неивазивной диагностике воспалений больших слюнных желез. Исследована активность нейтрофильной эластазы в ротовой жидкости пациентов с воспалительными заболеваниями слюнных желез. Средний уровень эластазной активности ротовой жидкости у пациентов с сиалоаденитами оказался достоверно выше, чем данный показатель у группы сравнения — 0,0045; 0,0027–0,0099 пкат ($p<0,001$). Также проведена оценка уровня эластазной активности пациентов по завершению курса лечения. В день выписки из стационара уровень активности эластазы ротовой жидкости у пациентов с сиалоаденитом статистически достоверно не отличался от здоровых лиц.

**Ключевые слова:** ротовая жидкость, воспалительные заболевания больших слюнных желез, челюстно-лицевая область, эластаза, патогенез.

***Введение.*** Лечение пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области на современном этапе представляет собой сложную и далеко нерешенную проблему как в Республике Беларусь, так и во всем мире. Все чаще отмечается атипичное клиническое течение данных заболеваний [1]. Существует необходимость дальнейшего изучения этиологии и патогенеза воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области.

В последние десятилетия множество научных разработок посвящается изучению такого фермента, как эластаза. У человека вырабатывается 2 типа эластазы: панкреатическая (эластаза-1) с оптимумом pH 8,8, которая является абсолютно специфичным ферментом поджелудочной железы, и нейтрофильная — с оптимумом pH 7,4.

Второй тип — нейтрофильная эластаза. Она концентрируется в азурофильных цитоплазматических гранулах полиморфноядерных лейкоцитов. Синтез нейтрофильной эластазы происходит на стадии роста гранулоцита, а в кровоток поступают клетки с уже готовыми ферментами. Наибольшее количество нейтрофильной эластазы определяется в нейтрофилах. Незначительные концентрации определяются в моноцитах и Т-лимфоцитах .

Нейтрофильная эластаза участвует в естественной деградации матриксных белков — эластина, коллагена, фибронектина, ламинина, протеогликанов. Кроме того, нейтрофильная эластаза расщепляет многие растворимые протеины — иммуноглобулины, факторы коагуляции, компоненты комплемента и многие протеазные ингибиторы [2].

В последние годы в медицине актуальным направлением является изучение возможности использования альтернативных биологических жидкостей с целью диагностики ранних форм заболеваний. Ротовая жидкость является удобным объектом неинвазивных исследований.

Таким образом, изучение активности эластазы ротовой жидкости пациентов с гнойно-воспалительными процессами челюстно-лицевой области позволит выявить новые патогенетические механизмы развития заболевания.

**Цель** исследования — изучение активности эластазы ротовой жидкости пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез.

**Материалы и методы.** Обследовано 60 пациентов с сиалоаденитами, которые находились на стационарном лечении в отделении челюстно-лицевой хирургии УЗ «Витебская областная кли-

ническая больница», где проводилась хирургическая обработка гнойного очага по показаниям, назначался комплекс лечебных мероприятий. Группу сравнения составили 22 человека без гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области.

Перед проведением лечебных мероприятий проводился забор ротовой жидкости натощак в стерильные пробирки. У пациентов с сиалоаденитами два раза в течение срока госпитализации: 1-я проба — в день поступления в стационар до антибактериальной терапии, 2я- проба — в первый день клинического выздоровлении, совпадающий с выпиской пациента из стационара.

Для определения активности эластазы нами была модифицирована методика определения эластазной активности в биологических жидкостях [3].

Для определения эластазной активности пробы, содержащие ротовую жидкость, перед использованием осаждали центрифугированием в течение 10 мин (10000 об./мин; центрифуга MICRO 120). Для постановки метода использовали эластин-Конго красный (диаметр частиц — 37–75 микрон, производство Sigma) в концентрации 0,8 мг на 1 мл буфера как субстрат для фермента, ротовой жидкости и буферного раствора (0,2 М солянокислый трис-буфер) с pH 7,4, т. к. у нейтрофильной эластазы оптимум pH 7,4. Эластаза расщепляла эластин, и конго-красный переходил в раствор, изменяя его цвет с бесцветного на красный с максимальным спектром поглощения 495. Для удобства постановки вместо пробирок использовались эппендорфы. В один ряд эппендорфов вносили последовательно 400 мкл раствора эластин-Конго красного на трис-HCl буфере pH 7,4 и 100 мкл ротовой жидкости. Контролем служили пробы, содержащие буферный раствор с соответствующим pH в количестве 400 мкл и 100 мкл ротовой жидкости, чтобы исключить влияние оптической плотности ротовой жидкости на результаты определения активности фермента. Далее проводили инкубацию проб в термостате при 37°C в течение 24 ч. Затем пробы извлекали из термостата и центрифугировали в течение 10 мин (10000 об./мин; MICRO 120) для осаждения оставшегося эластина-Конго красного в виде неразрушенных частиц. Из надосадка брали в дублях по 150 мкл раствора и переносили в лунки 96-луночного полистиролового планшета. Планшет помещали в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 492 нм определяли оптическую плотность в лунках. Результат рассчитывали как разницу оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных.

Для пересчета итогового результата в пикокаталы была использована формула, полученная после корреляционно-регрессионного анализа и 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.

Нами было исследовано пять видов функций, характеризующих зависимость величины X от величины Y: экспоненциальная, линейная, логарифмическая, полиномиальная и степенная.

В результате анализа индексов детерминации каждой функции было установлено, что наилучшим образом тенденцию зависимости активности фермента от оптической плотности раствора описывает степенная функция, т. к. в данном случае индекс детерминации R2 наибольший — 0,986, т. е. 98,6% исходных данных подчиняются выбранной тенденции.

Степенную зависимость X от Y характеризует парабола, уравнение которой имеет следующий вид:

$$X\ (\text{пкат}) = (0{,}0027 + 1{,}7 \times \text{Еоп})^2,$$

где X — искомый результат;

Еоп — оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля (рисунок).

Результаты обрабатывались с помощью компьютерных программ Statistica 6.0, Excel, Statgrap. Показатели активности эластазы ротовой жидкости представлены в виде медианы (Me), нижнего 25-й (LQ) и верхнего 75-й квартилей (UQ). При сравнении групп использован критерий Колмогорова–Смирнова, различия признавались статистически значимыми при $p < 0{,}05$.

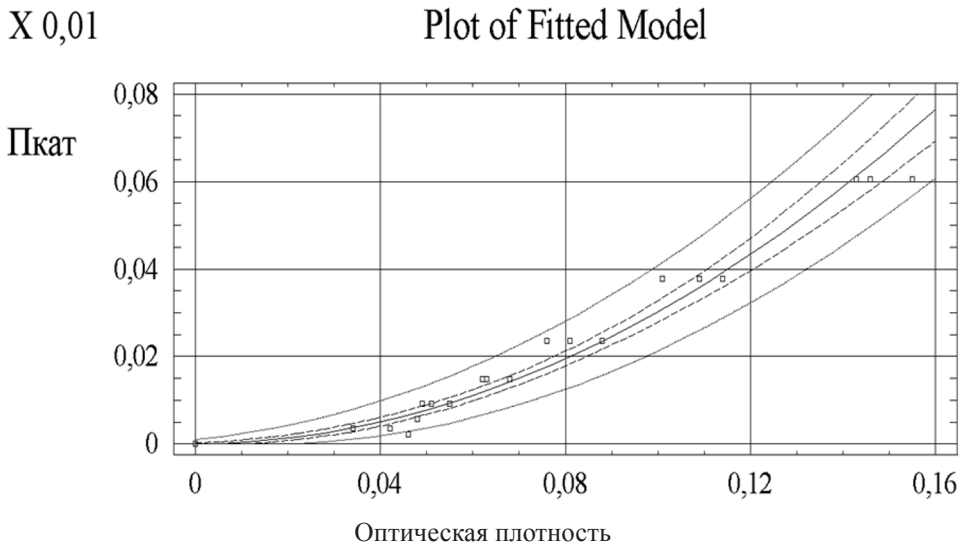



**Рисунок — Зависимость активности фермента от оптической плотности раствора**

**Результаты и их обсуждение.** Результаты определения активности эластазы ротовой жидкости представлены в таблице.

Таблица — Активность эластазы ротовой жидкости пациентов с сиалоденитами и группы сравнения

| Группа пациентов | N | Активность эластазы, пкат Me, LQ–UQ | |
|---|---|---|---|
| | | до лечения | после лечения |
| Группа сравнения | 22 | 0,0009; 0,0002–0,0013 | |
| Сиалоаденит | 60 | 0,0045, 0,0027–0,0099 | 0,0017, 0,0006–0,0026 |

У группы сравнения активность эластазы ротовой жидкости составила 0,0009; 0,0002–0,0013 пкат. При этом данный показатель у пациентов с сиалоаденитом при поступлении был равен 0,0045; 0,0027–0,0099 пкат, что статистически выше показателя доноров ($p<0,001$).

В ходе лечения активность эластазы ротовой жидкости статистически значимо уменьшалась относительно показателя первого дня стационарного лечения ($p<0,001$). После завершения курса лечения в активности эластазы ротовой жидкости у пациентов с сиалоаденитом статистически значимых различий с соответствующими показателями группы сравнения выявлено не было ($p>0,05$), что указывает на снижение и нормализацию изучаемого показателя при купировании воспалительных процессов челюстно-лицевой области.

На основании полученных данных установлено, что активность эластазы ротовой жидкости повышается при развитии заболеваний слюнных желез, т. к. возникает инфицированный очаг, в который преимущественно мигрируют нейтрофилы и за счет секреции ферментов и своей гибели повышают уровень эластазы в слюне. При купировании воспалительных процессов уровень нейтрофилов резко уменьшается и падает концентрация эластазы до показателей здоровых лиц. Тем самым определение ее активности позволяет оценить эффективность лечения.

**Заключение.** На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Активность эластазы ротовой жидкости повышается при развитии воспалительных заболеваний слюнных железы, что связано с увеличением ее продукции нейтрофилами на фоне инфекционно-воспалительного процесса.

2. При купировании острых воспалительных процессов активность данного фермента снижается до показателей здоровых лиц.

3. Дальнейшее изучение активности эластазы ротовой жидкости при развитии воспалительных процессов слюнных желез позволит разработать неинвазивные диагностические тесты для повышения качества оказания медицинской помощи данной категории пациентов.

**Литература**

1. Giamarellou, H. Epidemiology, diagnosis, and therapy of fungal infections in surgery / H. Giamarellou, A. Antoniadou // Infect. Control Hosp. Epidemiol. — 1996. — Vol. 17, № 8. — P. 558–564.

2. Аверьянов, А.В. Роль нейтрофильной эластазы в патогенезе хронической обструктивной болезни легких / А.В. Аверьянов // Цитокины и воспаление. — 2007. — Т. 6, № 4. — С. 3–8.

3. Бэйли, Дж. Методы химии белков / Дж. Бэйли; пер. с англ. — М.: Мир, 1965. — 127 с.

## EVALUATION OF ORAL FLUID ELASTASE ACTIVITY IN PATIENTS WITH ORAL LIQUID SIALOADENITIS

*Korneeva D.E., Goncharova A.I., Okulich V.K.*

*Educational Establishment "Vitebsk State Medical University", Vitebsk, Republic of Belarus*

The paper reflects the current problem of diagnosis and treatment of inflammatory diseases of the major salivary glands. The estimation of neutrophil elastase activity of oral fluid in patients with sialodenitis and healthy individuals has been done. This method could be used as a noninvasive diagnosis of inflammation of the large salivary glands

**Keywords:** oral fluid, inflammatory diseases of the major salivary glands, maxillofacial area, elastase, pathogenesis.

Поступила 23.10.2015

## УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ НЕТИФОИДНЫХ САЛЬМОНЕЛЛ

*Слизень В.В.[1], Циркунова Ж.Ф.[1], Гудкова Е.И.[1], Скороход Г.А.[1], Филипенок С.С.[2]*

*[1]Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;*

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

**Реферат.** Выраженную активность в отношении сальмонелл проявляли цефалоспорины третьего и четвертого поколений, фторхинолоны, левомицетин. Удельный вес устойчивых к ампициллину, амоксициллину/клавулановой кислоте, тетрациклину, налидиксовой кислоте сальмонелл составил 62,3±4,0; 54,8±4,1; 39,0±4,0; 36,3±3,97% соответственно. Устойчивость к пенициллинам обусловлена в большинстве случаев присутствием гена TEM, реже — гена blaACC. Устойчивость к тетрациклинам ассоциирована с присутствием преимущественно гена tetB.

**Ключевые слова:** сальмонеллы, устойчивость к антибиотикам, blaTEM, blaACC, blaOXA, tetB, tetG.

***Введение.*** Обеспечение микробиологической безопасности пищевых продуктов — одна из приоритетных задач, решение которой направлено на охрану здоровья населения. Во всем мире эта проблема приобретает особую актуальность в связи с увеличением числа заболеваний, передающихся через пищевые продукты и вызываемых такими возбудителями как *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, энтерогеморрагическими *E. coli* (EHEC), *Campylobacter jejuni*, *Enterobacter sakazakii* и др. Правительства большинства государств финансируют ветеринарно-санитарные, диагностические, лечебно-профилактические процедуры, направленные на выявление возбудителей острых кишечных инфекций и ограничение их распространения [1].

Птицеводство — является одной из самых интенсивных отраслей в Республике Беларусь. За 2014 г. произведено 554,1 тыс. тонн птицы. В промышленном птицеводстве в республике на душу населения производится примерно 29 килограммов мяса птицы и 396 яиц в год, которые могут быть

резервуаром нетифоидных сальмонелл. Глобализация торговли сельскохозяйственными животными и продуктами питания, освоение новых территорий для аграрно-промышленного комплекса, рост трансрегиональных и трансконтинентальных перемещений животных и продуктов питания, интенсификация туризма обосновывают необходимость слежения за глобальными эпидемиологическими изменениями в заболеваемости сальмонеллезами и структурой циркулирующих сальмонелл [1, 2].

Пищевые бактериальные патогены претерпевают эволюционные изменения в условиях антропогенной трансформации внешней среды, которые влияют на вирулентность и устойчивость возбудителей, пути передачи инфекции и восприимчивость к ним человеческой популяции. Современная эпидемиологическая ситуация характеризуется учащением инфекций, вызываемых устойчивыми к антибиотикам бактериями. Ежегодно в мире обнаруживают среди нетифоидных штаммов сальмонелл устойчивые варианты к цефтриаксону (3%), ципрофлоксацину (3%). Среди госпитальных штаммов сальмонелл можно выявить устойчивость к 5–10 химиотерапевтическим препаратам различных групп. С января 2000 г. в ВОЗ действует международная программа по надзору за сальмонеллезами (WHO Global Salm-Serv, WHO GSS), а на ее базе функционирует глобальная система контроля чувствительности сальмонелл к противомикробным препаратам (External Quality Assuarance System, EQAS) [3, 4].

**Цель** исследования — динамическое наблюдение за циркулирующими сероварианта сальмонелл с целью ограничения распространения устойчивых к антибиотикам вариантов и обеспечения микробиологической безопасности продуктов питания.

**Материалы и методы.** Исследования проведены в рамках задания «Изучение генетических вариантов сальмонелл — возбудителей сальмонеллезов, циркулирующих в Республике Беларусь», ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация» 2014–2015 гг.

В качестве объектов исследования использовали 106 культур сальмонелл, выделенных от заболевших, носителей, из внешней среды и продуктов питания в инфекционных больницах и ЦГЭ в первом полугодии 2015 г. в Витебской, Гродненской, Могилевской, Брестской, Минской областях и г. Минске. Поступившие культуры относились к *S. enterica serovar Enteritidis* — 25, *S. enterica serovar Typhimurium* — 60, *S. enterica serovar Infantis* — 3, *S. enterica serovar Virchov* — 5, *S. enterica serovar Fyris (B)* — 1, *S. enterica serovar Chester* — 1, *S. enterica serovar Braenderup* — 1, *S. enterica serovar Muenchen* — 1, сальмонеллы группы C — 6, сальмонеллы группы O:3 — 1, сальмонеллы группы O:7 — 1, *S. enterica serovar Bovismorbificans* — 1.

Были исследованы 146 культур сальмонелл, поступавших в ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» из различных регионов Беларуси во втором полугодии 2014 г. и в первом полугодии 2015 г. Определение антибиотикорезистентности сальмонелл проводили стандартным методом разведений в агаре. Определяли чувствительность к ампициллину (натриевая соль, BioChemica, AppliChem, Германия), амоксициллину с клавулановой кислотой 5x1 (Duchefa Biochemie, The Netherlands), цефотаксиму (натриевая соль, Melford Laboratories Ltd), цефтриаксону (динариевая соль полугептагидрат, Melford Laboratories Ltd), цефепиму (гидрохлорид моногидрат, Alfa Aesar GmbH, Германия), ципрофлоксацину (Acros Organics), тетрациклину (гидрохлорид, BioChemica, AppliChem, Германия), левомицетину (BioChemica, AppliChem, Германия), налидиксовой кислоте (BioChemica, AppliChem, Германия).

Выделение ДНК, изучение генетических детерминант резистентности проводили согласно утвержденной Инструкции на метод генетического типирования сальмонелл с использованием ПЦР (№ 011-1213). В работе использованы методы вариационной статистики.

**Результаты и их обсуждение.** Исследование устойчивости сальмонелл к антибиотикам показало, что к цефотаксиму, цефтриаксону, цефепиму, ципрофлоксацину, левомицетину все тестированные культуры сальмонелл проявляли чувствительность. При этом МИК для большинства штаммов для цефтриаксона и цефотаксима была менее 0,125 мкг/мл, для цефепима — 0,25 мкг/мл. МИК сальмонелл для ципрофлоксацина составляла менее 0,125 мкг/мл у 46,6±4,1% и 0,25 мкг/мл — у 53,4±4,1% штаммов. На рисунке 1 приведена частота встречаемости устойчивых, чувствительных и умеренно устойчивых сальмонелл.

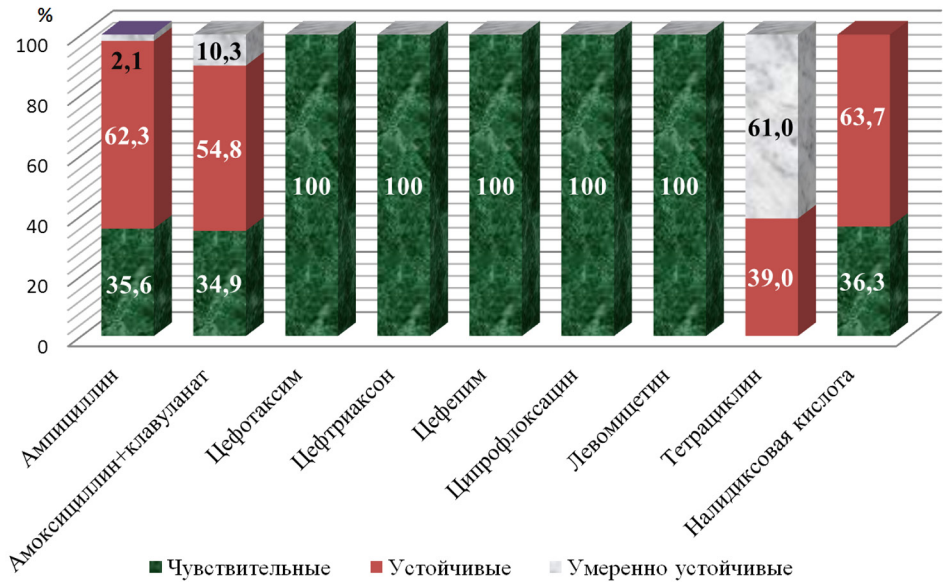



**Рисунок 1. — Частота устойчивых, умеренно устойчивых, чувствительных вариантов сальмонелл к антибиотикам**

Удельный вес устойчивых к ампициллину, амоксициллину/клавулановой кислоте, тетрациклину, налидиксовой кислоте сальмонелл составил 62,3±4,0; 54,8±4,1; 39,0±4,0; 36,3±3,97% соответственно. Среди тестированных культур к ампициллину, амоксициллину/клавулановой кислоте проявляли чувствительность 35,6; 34,9% сальмонелл. К тетрациклину чувствительных культур не было: 39,0±4,0% культур были устойчивы, 61,0±4,1% — умеренно устойчивы. К налидиксовой кислоте устойчивость проявляли 63,7±3,97% тестированных сальмонелл, чувствительными были 36,3±3,97% культур.

Таким образом, выраженную активность в отношении сальмонелл проявляли цефалоспорины третьего и четвертого поколений, фторхинолоны, левомицетин. Частота устойчивых форм к ампициллину и амоксициллину/клавулановая кислота была достаточно высокой — более 50% (62,3±4,0 и 54,8±4,1% соответственно), что не позволяет рассматривать эти препараты как препараты стартовой терапии сальмонеллезов.

Высокая частота резистентности к ампициллину и амоксициллину/клавулановая кислота свидетельствует об активном распространении сальмонелл с устойчивостью к пенициллинам, что диктует необходимость определения генетических основ устойчивости к этим препаратам. Устойчивость сальмонелл к пенициллинам и цефалоспоринам определяется продукцией бета-лактамаз, которые способны разрушать химическую структуру бета-лактамных антибиотиков. Были исследованы 108 штаммов на присутствие blaTEM, blaOXA, blaACC. В случае их присутствия (рисунок 2) при проведении ПЦР образовывались ампликоны размером 854, 708, 818 нт.

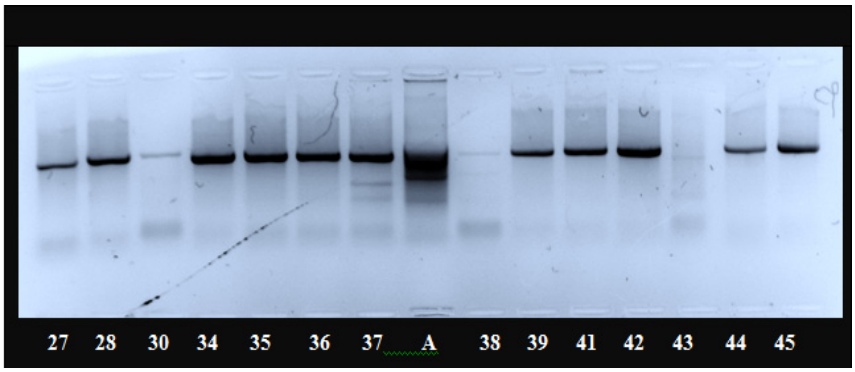



**Рисунок 2. — Результаты амплификация ТЕМ гена (номера культур сальмонелл указаны на фореграммах, А — стандарт молекулярного веса 50 п.о.)**

Из 108 культур сальмонелл у 65 (60,2±4,6%) выявляли гены бета-лактамаз (blaTEM, blaACC), при этом с большей частотой среди сальмонелл встречается blaTEM. Ген, кодирующий blaTEM, идентифицировали у 78,5±5,3% (n = 51) культур, содержащих гены бета-лактамаз, ген blaACC — у 26,2±5,45% (n = 17), у 3 из исследованных штаммов одновременно присутствовали blaACC и blaTEM. Две культуры сальмонелл с одновременным присутствием в геноме blaACC и blaTEM проявляли умеренную устойчивость, одна культура — устойчивость. У исследованных культур, как правило, присутствие blaTEM было сопряжено с устойчивостью к ампициллину и амоксициллину/клавулановая кислота: 86,3±4,8% (n = 44) культур сальмонелл, содержащих ген blaTEM (n = 51), проявляли устойчивость к пенициллинам, 5,9±3,3% (n = 3) — умеренную устойчивость, 4 культуры были чувствительными к ампициллину и амоксициллину/клавулановая кислота. Из 17 исследованных сальмонелл с геном blaACC 10 культур проявляли устойчивость, 5 — умеренную устойчивость, две были чувствительны к ампициллину и амоксициллину/клавулановая кислота. У некоторых штаммов с чувствительностью или умеренной резистентностью, у которых выявлен ген бета-лактамазы TEM, образующиеся ампликоны в ходе ПЦР были низкой интенсивности.

Исследование устойчивых к бета-лактамным антибиотикам штаммов сальмонелл, у которых отсутствовали гены бета-лактамаз TEM и ACC (n = 12), показало, что только одна культура *S. serovar Typhimurium* 213 имела ген blaOXA, у остальных 11 устойчивых к пенициллинам культур генетические детерминанты устойчивости не выявлены, и по всей видимости, они связаны с присутствием иных типов бета-лактамаз.

В процессе амплификации tetA, tetB, tetG образуются ампликоны размером 956, 600 (рисунок 3), 391 нт.

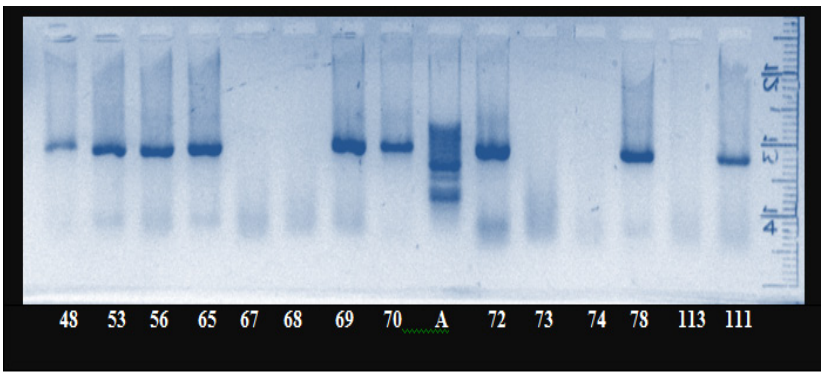



**Рисунок 3. — Результаты амплификации генов TET A, TET B и TET G (номера культур сальмонелл указаны на фореграммах, А — стандарт молекулярного веса 50 п.о.)**

У большинства штаммов с устойчивостью к тетрациклинам идентифицировали ген tetB, который встречался у 66,7±3,9% сальмонелл, у двух штаммов идентифицирован ген tetG, tetA не выявляли. У 15 умеренно устойчивых и у 9 резистентных культур к тетрациклинам сальмонелл устойчивость к тетрациклинам связана не с генами tetA, tetB, tetG, а с какими-то другими детерминантами.

Исследованные *S. typhimurium* содержали некоторые элементы генетической кассеты Int-CS1. В то время как полная кассета Int-CS1, ассоциированная с фенотипом множественной резистентности, при амплификации которой образуются фрагменты 1000 и 1600 нт., отсутствовала у исследованных штаммов.

Антибиотики нашли широкое применение в ветеринарии как лечебные средства против многих заболеваний сельскохозяйственных животных. Антибиотики также используются в животноводстве в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных животных и птиц, что позволяет достигнуть большей продуктивности. В сельском хозяйстве используют следующие препараты: стрептомицин, хлорамфеникол, хлортетрациклин, магнамицин, окситетрациклин, линкомицин в комбинации со спектиномицином, амоксициллин, цефалексин натрия (Солвасол), сульфадимизин, гентамицин. Для лечения мастита коров применяют цефоксазол совместно с бензилпенициллином. Использование в животноводстве и птицеводстве антибиотиков из группы тетрациклинов и бета-лактамов создает предпосылки для селекции штаммов сальмонелл, устойчивых к этим группам антибиотиков [5]. Полученные данные о высоких уровнях резистентности у сальмонелл к тетрациклинам и полу-

синтетическим пенициллинам, обусловленных присутствием генов tetB, tetG, blaTEM, blaACC, могут быть связаны с действием селективного давления антибиотиков в сельском хозяйстве, обусловливающих циркуляцию среди животных и птиц резистентных вариантов сальмонелл.

**Заключение.** Выраженную активность в отношении сальмонелл проявляли цефалоспорины третьего (цефотаксим, цефтриаксон) и четвертого поколений (цефепим), фторхинолоны (ципрофлоксацин), левомицетин. Удельный вес устойчивых к ампициллину, амоксициллину/клавулановой кислоте, тетрациклину, налидиксовой кислоте сальмонелл составил 62,3±4,0; 54,8±4,1; 39,0±4,0; 36,3±3,97% соответственно. Устойчивость к пенициллинам обусловлена в большинстве случаев присутствием гена TEM, реже — гена blaACC. Устойчивость к тетрациклинам была ассоциирована с присутствием преимущественно гена tetB.

**Литература**

1.Ефимочкина, Н.Р. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа: автореф. дис. … д-ра биол. наук / Н.Р. Ефимочкина. — М., 2010. — 48 с.

2.Птицеводство [Электронный ресурс] / М-во сель. хоз-ва и прод. ресурсов Респ. Беларусь. — Минск, 2015. — Режим доступа: http://mshp.minsk.by/sh/animal/fowl/. — Дата доступа: 20.10.2015.

3.WHO global salm-surv external quality assurance system (EQAS): an important step toward improving the quality of Salmonella serotyping and antimicrobial susceptibility testing worldwide / A. Petersen [et al.] // Microb. Drug. Resist. — 2002. — Vol. 8. — P. 345–353.

4.Генетическое типирование *Salmonella enterica* с помощью ПЦР / В. Слизень [и др.] // Мед. журн. — 2014. — № 3. — С. 93–97.

5.Соловьева, О.В. Рациональные подходы к антибиотикотерапии у животных при хирургических вмешательствах / О. В. Соловьева // Рос. ветеринар. журн. — 2006. — № 1. — С. 35–40.

## RESISTANCE OF NON-TYPHOID SALMONELLA TO ANTIBIOTICS

*Slizen V.V.[1], Tsyrkunova J.F.[1], Gudkova E.I.[1], Skorokhod G.A.[1], Filipenok S.S.[2]*

*[1]Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus;*
*[2]State Institution "Republican Centre for Hygiene, Epidemiology & Public Health", Minsk, Republic of Belarus*

The background of the study is the dynamic monitoring for circulating Salmonella serovariants to limit the spread of resistant to antibiotics strains and to ensure microbiological safety of food products. Third- and fourth-generation cephalosporins, fluoroquinolones, chloramphenicol has displayed marked activity against non-typhoid salmonella: all tested isolates were susceptible to these groups of antibiotics. Proportion of salmonella resistant to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, tetracycline, nalidixic acid was 62.3±4.0; 54.8±4.1; 39.0±4.0; 36.3±3.97% respectively. Resistance to penicillin mainly was associated with the presence of the gene TEM, and more rarely with the gene blaACC. Salmonella resistant to tetracycline harbored predominantly the gene tetB.

**Keywords:** Salmonella, antibiotic resistance, blaTEM, blaACC, blaOXA, tetB, tetG.

Поступила 23.10.2015

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ИНВАЗИВНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ *HELICOBACTER PYLORI*

*Янович О.О.[1], Титов Л.П.[1], Дорошко М.В.[2]*

*[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь;*
*[2]Иностранное частное медицинское унитарное предприятие «Медицинский центр "Нордин"», Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Проведено сравнение диагностической значимости трех инвазивных методов детекции *Helicobacter pylori* (*HP*): гистологический метод, ПЦР в режиме реального времени и быстрый

уреазный тест. Наличие бактерии определяли на основании комбинации методов — пациента считали инфицированным при положительном результате двух методов. При использовании этого критерия *HP* была выявлена у 138 пациентов (63%). Показано, что наиболее чувствительным методом является гистологический (93%), наиболее специфическим — ПЦР (93%). Полученные данные указывают, что для правильной детекции *HP* необходимо использование двух и более методов диагностики.

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*, методы диагностики.

**Введение.** *Helicobacter pylori* (*HP*) — бактерия, колонизирующая эпителиальные клетки желудка примерно у 25% населения в развитых странах и у 70–90% населения в развивающихся странах. Хронический хеликобактериоз развивается у чувствительных индивидуумов и клинически выражается от поверхностного гастрита до злокачественных новообразований желудка. *HP* является бактерией, которая была классифицирована Международным агентством по исследованию рака при ВОЗ как канцероген I класса вследствие эпидемиологической связи с аденокарциномой и MALT-лимфомой желудка [1].

Существенная роль *HP* в развитии заболеваний желудка предполагает проведение предварительного обследования пациентов с целью выявления у них данных микроорганизмов. С момента открытия *HP* в 1983 г. разработаны многочисленные методы ее диагностики, которые постоянно усовершенствуются и модифицируются. Все методы верификации *HP* подразделяют на инвазивные, требующие эндоскопического исследования с получением биоптата, и неинвазивные. Инвазивные включают культуральный, гистологический, молекулярный методы и уреазный тест, неинвазивные — дыхательный тест и иммуноферментные методы [2].

Гистологический метод считается самым надежным и референсным методом диагностики *HP*. Это был первый метод, используемый для детекции *HP*. Основой его является окрашивание и микроскопическое исследование препаратов [3]. Гистологическое исследование имеет ряд преимуществ: возможность оценки состояния слизистой оболочки желудка и активность воспалительного процесса, удобство хранения и транспортировки препаратов. При этом необходимо иметь в виду, что результаты исследований могут быть получены через 2–3 дня и зависят от опытности специалиста, который их проводит [4].

Быстрый уреазный тест основан на определении *HP* по уреазной активности бактерии. Уреаза микроорганизма превращает мочевину в аммиак, изменяя pH среды, что может быть определено по изменению цвета на индикаторе [5]. Достоинством метода является быстрота получения результата и относительно низкая стоимость. К недостаткам теста относится возможность получения ложноотрицательных (при малом количестве микробных тел, при приеме антибактериальных препаратов) или ложноположительных (контаминирование материала другими уреазопродуцентами) результатов [6, 7].

Молекулярные методы широко используются для диагностики *HP* [8, 9]. Использование ПЦР позволяет выявить микроорганизм, как в вегетативной, так и в кокковой форме. Получение ДНК бактерии дает возможность генотипировать штамм бактерии, определить факторы патогенности, наличие мутаций, связанных с резистентностью к антибиотикам. Преимуществом данного метода является возможность быстро получить результат, используя в качестве материала биоптат (без культивирования микроорганизма), высокая специфичность и чувствительность. К недостаткам метода относят его высокую стоимость, необходимость специального оборудования и обученного персонала.

**Цель** исследования — сравнение диагностической значимости трех инвазивных методов детекции *HP*.

**Материалы и методы.** Было проведено обследование 219 пациентов, обращавшихся в диагностический центр «Нордин» г. Минска с целью эндоскопического исследования желудочно-кишечного тракта. Средний возраст составил 41,7±0,8 года; 142 женщины и 77 мужчин. Материалом для исследования служили биоптаты из антрального отдела желудка, полученные при ФЭГДС пациентов.

Для идентификации *HP* применяли быстрый уреазный тест, гистологическое исследование, постановку ПЦР в режиме реального времени в биоптате.

Уреазную активность *HP in vitro* исследовали с помощью быстрого уреазного теста (БУТ) Хелпил (РФ). Тест расценивали как положительный при изменении цвета индикаторного диска на синий при размещении на нем биоптата.

Для гистологического исследования брали биоптат из антрального отдела желудка, фиксировали в 10% растворе формалина. Выявление *HP* проводили окрашиванием препаратов по Гимзе.

Для ПЦР использовали биоптаты из антрального отдела желудка. Экстракцию ДНК *HP* из биопсийного материала проводили с использованием набора «ДНК-сорбВ» (Амплисенс, РФ) в соответствии с инструкцией производителя. Выявление *HP* (мишень ген 23S рРНК) осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени на приборе Rotor Gene 3000.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы SPSS. Для установления статистической достоверности различий между группами использовали таблицы сопряженности с использованием критерия Хи-квадрат. Критерием достоверности считалось достижение уровня значимости $p<0,05$.

Для каждого метода были подсчитаны чувствительность, специфичность, предсказательная ценность положительного результата (ПЦПП), предсказательная ценность отрицательного результата (ПЦОР), точность.

**Результаты и их обсуждение.** Так как ни один из применяемых методов не является «золотым стандартом» в диагностике *HP*, то в нашем исследовании наличие бактерии определяли на основании комбинации методов. Пациента считали инфицированным при положительном результате двух методов. При использовании этого критерия *HP* была выявлена у 138 пациентов (63%).

Из обследованных 219 пациентов у 207 был поставлен диагноз «хронический гастрит», у 12 — «язва двенадцатиперстной кишки и/или язвы желудка». Установлено, что частота инфицирования *HP* пациентов с хроническим гастритом составила 63,4%, пациентов с язвой двенадцатиперстной кишки и/или язвы желудка — 91,7% ($p<0,05$).

Установлено, что методом ПЦР наличие хеликобактера выявлено у 53,4% обследованных пациентов, гистологическим методом — у 66,7%, быстрым уреазным тестом — у 66,7%.

Результаты сравнительного исследования клинического материла от одних и тех же пациентов разными диагностическими методами представлены в таблице 1. Данные таблицы показывают, что у 74 (33,7%) пациентов было диагностировано наличие *HP* всеми тремя методами. Практически у равного количества человек наблюдали различие в показании одного метода из трех: у 27 пациентов ПЦР+/гистология+/ БУТ- и у 25 пациентов ПЦР-/гистология+/ БУТ+. Наибольшее число ложноположительных результатов наблюдали при выполнении быстрого уреазного теста — 34 образца.

Результаты ПЦР-диагностики совпали с данными гистологического метода при положительных результатах у 101 пациента (46,4% случаев), а при отрицательных результатах — у 57 (26%).

Данные гистологического метода обнаружения *HP* с быстрым уреазным тестом совпали при положительном результате у 99 пациентов (45,2%), при отрицательных — у 29 человек (13,2%).

Таблица 1. — Результаты трех различных методов диагностики *HP* в биопсийном материале желудка

| Число случаев | ПЦР | Гистология | БУТ |
|---|---|---|---|
| 74 | + | + | + |
| 23 | – | – | – |
| 27 | + | + | – |
| 10 | + | – | + |
| 6 | + | – | – |
| 20 | – | + | – |
| 25 | – | + | + |
| 34 | – | – | + |

Основываясь на выбранных нами критериях, установлено, что чувствительность гистологического метода, ПЦР и БУТ составила 80,4; 93 и 58% соответственно (таблица 2).

Таким образом, наиболее чувствительным методом является гистологический, наиболее специфическим — ПЦР. Меньшей чувствительностью и специфичностью обладал быстрый уреазный тест.

Таблица 2. — Критерии оценки результатов трех методов диагностики *HP*

| Показатели | Методы исследования | | |
|---|---|---|---|
| | ПЦР | Гистология | БУТ |
| Чувствительность, % | 80,4 | 93 | 78 |
| Специфичность, % | 93 | 78 | 59 |
| ПЦПР | 95 | 87,6 | 76,2 |
| ПЦОР | 73,5 | 86 | 61,8 |
| Точность | 85 | 87 | 71 |

Диагностика *HP* является важным вопросом в плане разработки и выбора наиболее информативных и точных методов. Как стало ясно из практики, ни один из предлагаемых в настоящее время методов не является универсальным [2]. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки, характеризуется различной чувствительностью и специфичностью.

Многочисленные исследования по оценке различных методов детекции *HP* сталкиваются с проблемой золотого стандарта, т. е. метода сравнения. В нашем исследовании результат считался положительным или отрицательным при совпадении данных двух методов. Такой способ оценки результатов позволяет определить диагностические показатели исследуемых методов [10, 11].

Основные характеристики лабораторного метода — его чувствительность и специфичность. Чувствительность — способность исследования точно выявлять лиц с патологией, специфичность — способность исследования точно выявлять здоровых лиц. Точность метода определяется как чувствительностью, чем она выше, тем меньше процент ложноположительных результатов, так и специфичностью, чем она выше, тем меньше процент ложноотрицательных результатов.

Наиболее часто используемым методом в диагностических лабораториях для обнаружения *HP* является гистологический метод [11]. В данном исследовании данный метод характеризуется хорошими показателями: чувствительность — 93%, специфичность — 78%, точность — 87%.

*HP* является труднокультивируемой бактерией и требует сложных комплексных ростовых сред. Молекулярные методы выявления *HP* позволяют проводить детекцию бактерии не только в чистой культуре, но и в клиническом материале, минуя процесс культивирования. Появление ПЦР в режиме реального времени сделало данный метод более доступным для клинических лабораторий [12]. Для обнаружения *HP* используются консервативные гены: ureA [13], GLM (ureC) [14], 16S рРНК [15], 23S рРНК [16]. В нашей работе использование гена 23S рРНК для выявления *HP* обусловлено тем, что данная методика позволяет вместе с идентификацией бактерии выявить мутации, связанные с резистентностью к кларитромицину. Установлено, что метод ПЦР имеет более высокую специфичность (93%) и несколько меньшую чувствительность (80,4%) по сравнению с гистологическим методом, точность метода ПЦР практически равна точности гистологического метода. Полученные показатели для ПЦР-метода сходны с другими ранее проведенными исследованиями [12].

Быстрый уреазный тест нашел широкое применение из-за возможности быстрого получения результатов и простоты исполнения (не требуется специальное оборудование). Однако при выполнении данного теста возможны ложноотрицательные результаты при низкой обсемененности слизистой оболочки желудка или использовании ингибиторов протонной помпы. С другой стороны, загрязнение биопсии слюной может приводить к ложноположительным результатам [17]. В нашем исследовании быстрый уреазный тест характеризовался сниженной точностью результатов, однако достоверных различий по сравнению с другими используемыми методами не выявлено.

**Заключение.** Таким образом, выбор диагностических тестов для детекции *HP* зависит от чувствительности, специфичности, точности, стоимости и быстроты получения результатов. К сожалению, ни один из используемых в настоящее время методов не может быть использован в качестве «золотого стандарта» для диагностики хеликобактериоза. Решение данной проблемы состоит в правильном сочетании более двух методов детекции *HP* с оценкой полученных результатов.

**Литература**

1. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / International Agency for Research on Cancer. — Lyon, 1994. — Vol. 61: Schistosomes, Liver Flakes and Helicobacter pylori. — 243 p.

2. Mégraud, F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection / F. Mégraud, E. Bessède, Ph. Lehours // Helicobacter. — 2014. — Vol. 19, suppl. 1. — P. 6–10.

3. Успенский, Ю.П. *Helicobacter pylori*-ассоциированные заболевания: патогенез, особенности диагностики и дифференцированное лечение: учеб.-метод. пособие / Ю.П. Успенский, Н.В. Барышникова. — СПб., 2010. — 64 с.

4. Performance of routine *Helicobacter pylori* Invasive tests in patients with dyspepsia / H.C. Lee [et al.] // Gastroenterol. Res. Pract. — 2013. — Vol. 2013. — art. 184806.

5. Хронический гастрит: метод. рекомендации / Центр. НИИ гастроэнтерологии; сост. Л.Б. Лазебник [и др.]. — М., 2011. — 34 с.

6. Сарсенбаева, А.С. Методы диагностики инфекции *Helicobacter pylori*: учеб. пособие / А.С. Сарсенбаева, Г.Л. Игнатова, С.В. Воротникова. — Челябинск, 2005. — 50 с.

7. Diagnosis and genotyping of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction of bacterial DNA from gastric juice / S. Datta [et al.] // J. Gastroenterol. Hepatol. — 2005. — Vol. 20, № 8. — P. 1253–1259.

8. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by invasive and noninvasive tests / B. Pourakbari [et al.] // Braz. J. Microbiol. — 2013. — Vol. 15, № 44. — P. 795–798.

9. Rimbara, E. PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples / E. Rimbara, M. Sasatsu, D.Y. Graham // Meth. Mol. Biol. — 2013. — Vol. 943. — P. 279–287.

10. Accuracy of diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a reappraisal / X. Calvet [et al] // Clin. Infect. Dis. — 2009. — Vol. 48, № 10. — P. 1385–1391.

11. Comparison of five diagnostic methods for *Helicobacter pylori* / M. Khalifehgholi [et al.] // Iran J. Microbiol. — 2013. — Vol. 5, № 4. — P. 396–401.

12. Quantification of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa by real-time polymerase chain reaction: comparison with traditional diagnostic methods / S. Belda [et al.] // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 74, № 3. — P. 248–252.

13. Clayton, C. Detection and identification of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction / C. Clayton, K. Kleanthous, S. Tabaqchali // J. Clin. Pathol. — 1991. — Vol. 44. — P. 515–516.

14. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by invasive and noninvasive tests / B. Pourakbari [et al.] // Braz. J. Microbiol. — 2013. — Vol. 15, № 44. — P. 795–798.

15. Direct detection and amplification of *Helicobacter pylori* ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies / S. Hoshina [et al.] // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. — 1990. — Vol. 13. — P. 473–479.

16. Rimbara, E. PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples / E. Rimbara, M. Sasatsu, D.Y. Graham // Meth. Mol. Biol. — 2013. — Vol. 943. — P. 279–287.

17. Mégraud, F. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing / F. Mégraud, P. Lehours // Clin. Microbiol. Rev. — 2007. — Vol. 20, № 2. — P. 280–322.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF DIAGNOSTIC CHARACTERISTICS OF INVASIVE METHODS FOR *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION DIAGNOSIS

*Yanovich O.O.[1], Titov L.P.[1], Doroshko M.V.[2]*

*[1]State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;*

*[2]Foreign private medical unitary enterprise "Medical Center "Nordin"", Minsk, Republic of Belarus*

The study purpose was to compare the diagnostic significance of the three invasive methods for *Helicobacter pylori* (*HP*) detecting: histological, in real-time polymerase chain reaction, and rapid urease test. The bacteria presence was determined by the methods combination, and the patient was considered infected with a positive result of the two methods. Using this criterion, *HP* was detected in 138 patients (63%). It was shown that the most sensitive method was the histological (93%), the most specific — PCR (93%). These data indicate that a correct *HP* detection necessary to use two or more diagnostic methods.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, diagnostic methods.

Поступила 16.09.2015

# СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ

*Газиумарова Л.Д.[1], Бакаева Т.Н.[1], Титов Л.П.[1], Шнып И.В.[1], Филипенок С.С.[2], Дудчик Н.В.[3], Клюйко Н.Л.[4], Дорина Г.А.[5], Войтик С.Б.[6]*

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

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

*[3]Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», Минск, Республика Беларусь;*

*[4]Учреждение здравоохранения «Городская детская инфекционная больница», Минск, Республика Беларусь;*

*[5]Государственное учреждение «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии», Минск, Республика Беларусь;*

*[6]Государственное учреждение «Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Для диагностики листериозной инфекции разработаны и использованы в лабораторной практике бактериологические, биохимические, молекулярно-генетические методы исследования. Сочетание метода ПЦР с бактериологическими методами позволит совершенствовать эпидемиологический контроль за возбудителем листериозной инфекции.

**Ключевые слова:** сухие питательные среды, изоляты рода *Listeria*, идентификация.

**Введение.** Листериоз — инфекционная болезнь людей и животных, вызывается бактериями рода листерий, характеризуется множеством источников возбудителя, разнообразием путей и факторов его передачи, полиморфизмом клинических проявлений, высокой летальностью.

В настоящее время листериоз рассматривается как одна из важнейших пищевых инфекций, которая связана с употреблением продуктов животного и растительного происхождения, а также морепродуктов (молоко, мясо, сыры, особенно мягкие, сосиски, моллюски, креветки).

Возможен также контактный путь заражения (от инфицированных животных и грызунов), аэрогенный (в помещениях при обработке шкур, шерсти), трансмиссивный (при укусах насекомыми, в частности клещами).

Особое значение имеет возможность передачи листерий от беременной плоду — либо во время беременности (трансплацентарно), либо при контакте новорожденного с родовыми путями родительницы (интранатально).

Летальность в целом от листериоза очень высока и достигает в среднем 40–44%, особенно у новорожденных (24,8%), у лиц, старше 60 лет (35%). В США и странах Европы осуществляется мониторинг за лабораторно подтвержденными случаями инфекции.

В Республике Беларусь статистические данные по заболеваемости листериозом практически отсутствуют. В ряде микробиологических лабораторий (Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Городских детской и взрослой инфекционных клинических больницах г. Минска, Минском, Гродненском, Могилевском областных центрах гигиены и общественного здоровья и др.) выделяются патогенные штаммы листерий, что указывает на их циркуляцию и необходимость мониторинга данной инфекции. В пользу этого свидетельствует стабильно высокая заболеваемость острыми кишечными инфекциями (ОКИ), значительный процент ОКИ неустановленной этиологии.

Низкий уровень выявления больных листериозом у нас в стране не отражает истинной картины заболеваемости и во многом объясняется неудовлетворительным качеством лабораторной диагностики этой инфекции и отсутствием эффективной системы санитарно-эпидемиологического надзора за ее распространением. Значительный рост числа заболеваний листериозом явился серьезным толчком к разработке новых методов диагностики этой инфекции. Важнейшим элементом современных схем выделения листерий стало использование сухих селективных питательных сред [1–4], тест-систем для биохимической идентификации, тест-систем ПЦР. Их применение значительно повысило эффективность выделения листерий из клинического материала и продуктов питания по сравнению с ранее применявшимися средами (кровяной агар, мясо-пептонный агар или агар Хоттингера с теллуритом калия и полимиксином).

В этой связи нами разработаны отечественные сухие питательные среды для обогащения и выделения листерий из различных клинических источников, пищевых продуктов и объектов внешней среды [5–8]. Разработана тест-система для биохимической идентификации листерий (МТСЛ-стрип).

**Цель** исследования — совершенствование лабораторной диагностики листериоза и молекулярно-генетическая характеристика изолятов возбудителя.

**Материалы и методы.** В работе были использованы типовые штаммы *Listeria monocytogenes* и культуры, выделенные из клинического материла и пищевых продуктов. В общей сложности изучено и идентифицировано 28 штаммов рода *Listeria*, из которых 4 штамма из музея лаборатории и 24 штамма получены из различных клинических и научных учреждений г. Минска. Полученные штаммы выделены из мясо-молочных продуктов, крови, спинно-мозговой жидкости и секционного материала легкого. Хранение штаммов листерий осуществляли на питательном бульоне в замороженном состоянии при температуре -25°С. На этапе идентификации использовали совокупность методов, позволяющих решать 2 задачи: окончательно подтвердить принадлежность выделенной культуры к *Listeria spp.*, идентифицировать ее до вида, используя тесты для дифференциации от непатогенных листерий.

Для видовой дифференциации выделенных культур исследовали признаки, рекомендуемые в различных руководствах для дифференциации листерий: наличие каталазы определяли по образованию газа при суспендировании колоний в 3%-м растворе перекиси водорода на предметном стекле; подвижность — уколом в пробирке 0,35% агара при температуре 22 и 37°С в течение 48 ч; гемолитическую активность — на колумбийском агаре с добавлением 5% крови; ферментацию маннита, маннозы, ксилозы, рамнозы определяли по изменению окраски, образованию газа в среде Гиса, содержащей 1% сахара при температуре 37°С. Для первичной идентификации культуры использовали диагностический набор Api-Listeria и показания прибора Vitek.

Молекулярно-генетическую идентификацию и типирование выделенных патогенных изолятов изучали методами ПЦР и пульс-электрофореза.

В целях родовой идентификации методом ПЦР в качестве мишени использовали праймеры для амплификации гена Prs, кодирующего родоспецифический белок — фосфорибозил-фосфатсинтазу, участвующую в общем метаболизме бактериальной клетки. Для видовой дифференциации листерий и идентификации *L. monocytogenes* использовали два типа праймеров: а) к гену inlA, кодирующему белок интерналин А, участвующий в инвазии эпителиальных клеток; б) к гену Act, амплифицирующие участок гена, ответственного за синтез поверхностного белка АстА, индуцирующего внутриклеточную полимеризацию актина и обеспечивающего способность возбудителя к передвижению в цитоплазме инфицированных клеток [9, 10].

Реидентификация культур бактерий рода *Listeria* была проведена в референс-лаборатории по изучению листерий в Институте Пастера (Франция). Выражаем благодарность руководителю референс-лаборатории Институт Пастера M. Lecuit и A. Leclercq за сотрудничество в проведении исследований.

Серогруппоспецифические маркерные гены выявляли с помощью мультиплекс-ПЦР метода, предложенного Doumith и соавт. [11]. ПЦР-серотипирование является альтернативой традиционного серотипирования для характеристики *L. monocytogenes*.

С целью установления эпидемической значимости исследуемых изолятов проводили типирование штаммов *L. monocytogenes* методом PFGE по стандартному протоколу PulseNet, разработанному Центром по контролю и профилактике заболеваний (CDC, Атланта, США) [12].

В результате типирования с использованием рестриктаз (AscI, ApaI) получали фореграммы с различным числом полос фрагментов ДНК, т. н. рестрикционных спектров. На основании полученных рестрикционных спектров определялся пульс-тип и клональный комплекс, а также родство исследуемых изолятов.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты первичной идентификации культур с использованием 2 диагностических наборов и ПЦР-диагностики, как у нас в республике так и в референс-лаборатории по листериям Института Пастера, представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Результаты биохимического тестирования и ПЦР-исследования листерий

| № штам-ма | Исследуемый материал | Идентификация культур | | ПЦР-анализ | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Api *Listeria* | Vitek 2 | РНПЦЭМ | Институт Пастера |
| 32991 | Спинномозговая жидкость | *L. monocytogenes* | подтверждено | подтверждено | подтверждено |
| 88535 | Отделяемое зева | *L. monocytogenes* | подтверждено | подтверждено | подтверждено |
| 234 | Шпик | *L. monocytogenes* | подтверждено | подтверждено | подтверждено |
| 975 | Секционный материал (легкие) | *L. monocytogenes* | подтверждено | подтверждено | подтверждено |
| 5760 | Околоплодные воды | *L. monocytogenes* | подтверждено | подтверждено | подтверждено |
| 87045 | Плацента | *L. monocytogenes* | *Enterococcus spp.* | не подтверждено | не подтверждено |
| 5917 | Кровь | *L. monocytogenes* | подтверждено | подтверждено | подтверждено |
| 50 | Ликвор | *L. monocytogenes* | подтверждено | подтверждено | подтверждено |
| 259 | Шпик свиной | *L. monocytogenes* | подтверждено | подтверждено | подтверждено |
| 7973 | Шпик свиной | *L. monocytogenes* | подтверждено | подтверждено | подтверждено |
| 16660 | Фарш | *L. monocytogenes* | подтверждено | подтверждено | подтверждено |
| 1212/3 | Фарш домашний | *L. innocua* | подтверждено | подтверждено* | подтверждено* |
| 274/5 | Мясо говядины | *L. innocua* | подтверждено | подтверждено* | подтверждено* |
| 305/3 | Сердце говяжье | *L. welshimeri* | подтверждено | подтверждено* | подтверждено* |
| 305/4 | Язык говяжий | *L. welshimeri* | подтверждено | подтверждено* | подтверждено* |
| 305/5 | Почки говяжьи | *L. welshimeri* | подтверждено | подтверждено* | подтверждено* |
| 347/2 | Сыр «Российский особый» | *L. ivanovii* | подтверждено | подтверждено* | подтверждено* |
| 347/4 | Сыр сливочный | *L. seiligeri* | *L. welshimeri* | подтверждено* | подтверждено* |
| 24гн/2 | Мясо птицы (окорочок) | *L. innocua* | подтверждено | подтверждено* | подтверждено* |
| 408/6 | Печень-сердце куриное | *L. innocua* | подтверждено | подтверждено* | подтверждено* |
| 408/7 | Шеи кур | *L. grayi* | *L. innocua* | подтверждено* | подтверждено* |
| 285/2 | Капуста брокколи | *L. innocua* | подтверждено | подтверждено* | подтверждено* |
| 19119 | Фарш | *L. ivanovii* | подтверждено | подтверждено* | подтверждено* |
| 13 | Шпик свиной | *L. innocua* | подтверждено | подтверждено* | подтверждено* |
| Примечание — * — Методом ПЦР определяли только принадлежность к роду *Listeria*. | | | | | |

Сравнительный анализ выполненных испытаний показал совпадение результатов выделенных культур рода *Listeria* до 96%. Все культуры подтвердили принадлежность к роду *Listeria* методом ПЦР. Несовпадение данных биохимической идентификации одного изолята (№ 87045) на принадлежность культуры к *L. monocytogenes* было дополнительно проверено методом ПЦР, показавшим отрицательный результат. У других видов листерий (непатогенных) — несовпадение результатов по 2 изолятам (№№ 347/4 и 408/7), что может быть объяснено вариабельностью биохимических свойств листерий.

С другой стороны, специфичность ПЦР в отношении *L. monocytogenes* не позволяет определить присутствие других видов листерий. Поэтому для подтверждения принадлежности выделенных штаммов к патогенному виду мы предварительно высевали их на разработанные нами селективные среды, изучали признаки, рекомендованные в различных руководствах для идентификации листерий. В параллельных опытах принадлежность культур к виду *L. monocytogenes* определяли методом ПЦР. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2. — Характеристика штаммов *Listeria monocytogenes*, используемых в работе

| № штамма | Откуда выделен | Рост на селективной среде | Каталаза (+) | Подвижны при t | | Гемолиз | Ферментируют | | | | Положительны в ПЦР |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 22°С | 37°С | | манноза | маннит | ксилоза | рамноза | |
| 7973 | АТСС | наличие черного ореола вокруг колоний | + | + | – | + | + | – | – | + | + |
| 234 | Шпик свиной | + | + | + | – | + | + | – | – | + | + |
| 259 | Шпик свиной | + | + | + | – | + | + | – | – | + | + |
| 50 | Ликвор | + | + | + | | + | + | | | + | + |
| 88535 | Отделяемое зева | + | + | + | – | + | + | – | – | + | + |
| 5917 | Кровь | + | + | + | – | ± | + | – | – | + | + |
| 5760 | Околоплодные воды | + | + | + | – | + | + | – | – | + | + |
| 32991 | Спинномозговая жидкость | + | + | + | – | + | + | – | – | + | + |
| 975 | Легкие | + | + | + | – | + | + | – | – | + | + |
| 16660 | Пищевые продукты | + | + | + | – | + | + | – | – | + | + |

Как видно из этих данных, на разработанной нами селективной среде через 48 ч инкубации при температуре 37±1°С листерии формируют круглые сероватые или оливково-зеленые колонии с черным ореолом диаметром от 1,0 до 1,5 мм. В клинических образцах возбудитель листериоза морфологически может быть сходен с различными кокками (например, энтерококками) и дифтероидами, но высокие ингибирующие свойства среды в отношении ассоциативной микробной флоры позволяют выделить искомую культуру практически в чистом виде.

Все изученные штаммы были каталазоположительны, подвижными при температуре 22°С и неподвижными при 37°С, образовывали гемолиз (за исключением 1 штамма) на чашках с кровью. Ферментировали маннозу и рамнозу (положительная реакция) и не усваивали маннит и ксилозу (отрицательная реакция).

Результаты, полученные микробиологическими методами, были подтверждены при помощи ПЦР. Все культуры *L. monocytogenes* в результате ПЦР амплифицировали фрагменты гена патогенности Act A и гена инвазии Inl A. Однако, несмотря на преимущества, которыми обладает ПЦР-диагностика (скорость выполнения, высокая чувствительность и специфичность), представляется целесообразным сочетанное использование в современных схемах диагностики как классических бактериологических, так и молекулярно-генетических методов исследования.

На втором этапе исследования для изучения обоснования филогенетического родства и установления эпидемиологической значимости исследуемых изолятов проводили типирование 10 штаммов *L. monocytogenes* методом мультиплексной ПЦР и пульс-электрофореза. Результаты исследования представлены в таблице 3. Известно, что бактерии вида *L. monocytogenes* имеют сложную антигенную структуру и делятся на 13 серологических вариантов. Большая часть случаев заболеваний листериозом у людей связана лишь с сероварианта 4b, 1/2a, 1/2b, причем эпидемические вспышки чаще всего вызываются сероварианта 4b [13].

Из 10 исследованных нами культур *L. monocytogenes* 3 изолята принадлежали серотипу IIa,7 культур — к серотипу IVb, наиболее опасному в эпидемическом плане. При анализе серогрупповой принадлежности в зависимости от источника выделения отмечено, что серотип IVb встречался практически одинаково как среди изолятов, выделенных из клинического материала, так и изолятов, полученных из пищевых продуктов (таблица 3).

Таблица 3. — Молекулярно-генетическая характеристика изолятов *L. monocytogenes*

| № изолята | Источник выделения | Серогенотип | Пульс-тип рестриктаза AscI | Пульс-тип рестриктаза ApaI | Клональный комплекс |
|---|---|---|---|---|---|
| 50 | Клинический материал | II a | 050207bis | 270807 | CC29 |
| 5760 | Клинический материал | II a | 120108 | 270807 | CC29 |
| 7973 | АТСС | II a | 050207 | 050207bis | CC37 |
| 975 | Клинический материал | IV b | 151005 | 111206 | CC6 |
| 32991 | Клинический материал | IV b | 151005 | 111206 | CC6 |
| 16660 | Пищевые продукты | IV b | 151005 | 111206 | CC6 |
| 88535 | Клинический материал | IV b | 151005 | 111206 | CC6 |
| 234 | Пищевые продукты | IV b | 210792 | 210792 | Э |
| 259 | Пищевые продукты | IV b | 210792 | 210792 | Э |
| 5917 | Клинический материал | IV b | 011001 | 160602 | CC1 |

Рестрикционный анализ (рисунок) 10 изученных изолятов *L. monocytogenes* позволил разделить их на 5 пульс-типов, относящихся к клональным комплексам CC29, CC37, CC6, CC1. Пульс-тип 151005 111206 включал 4 идентичных штамма, еще один пульс-тип 210792 210792 включал 2 штамма, причем идентичных по обеим рестриктазам.

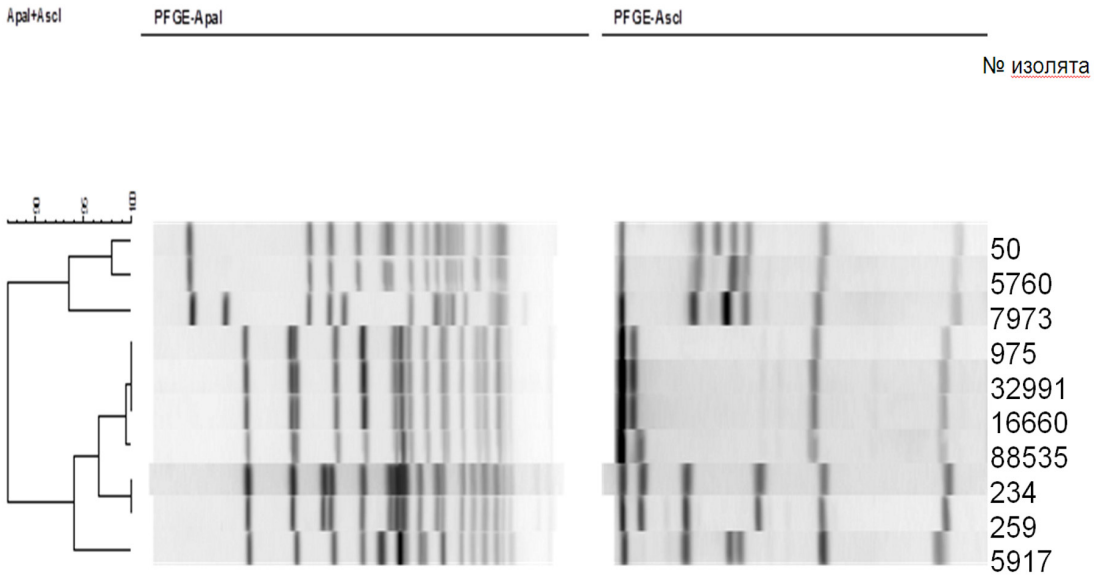



**Рисунок — Рестрикционный анализ изолятов *Listeria monocytogenes*, исследованных методом PFGE**

PFGE-профили изолятов, выделенных в Республике Беларусь, были проанализированы с PFGE профилями баз данных референс-лаборатории по листериям Франции. В результате сравнительного анализа было установлено, что профиль M-IVb-210792/210792 является эндемичным для Франции. Вспышка инфекции листериоза, вызванная *L. monocytogenes* этого пульс-типа, была связана с потреблением инфицированного молока во Франции в августе-ноябре 2012 г. [14]. В нашей стране возбудитель листериоза был выделен в мае 2010 г. из шпика свиного глубокой заморозки (по-

ставщик Польша, штамм 259) и из шпика свиного глубокой заморозки (поставщик Испания, штамм 234), что говорит о возможном заносе возбудителя из другой страны.

Идентичные профили были объединены в клональные комплексы. При сравнении с международной базой данных по листериям установлено, что большинство выделенных нами изолятов относились к двум наиболее распространенным в мире клонам CC1 и CC6, преобладающим в Европе [15].

Исследования, выполненные методом мультиплексной ПЦР, позволили более детально охарактеризовать структуру популяции *L. monocytogenes*, распространенной на территории Республики Беларусь, и, прежде всего, установить преобладание эпидемически значимого серотипа IVb. Сочетание серогенотипирования методом мультиплексной ПЦР и пульс-гель электрофореза с рестриктазами AscI и ApaI обладает самыми высокими дискриминационными возможностями, позволяет оценить эпидемиологическую значимость изолятов, выделенных из разнообразных источников, сравнить выделенные культуры *L. monocytogenes* со свойствами изолятов, выделеных в других странах [16].

**Заключение.** Таким образом, для диагностики листериозной инфекции нами были разработаны и использованы в лабораторной практике как бактериологические, биохимические, так и молекулярно-генетические методы исследования. Сочетание метода ПЦР с бактериологическими методами позволит совершенствовать эпидемиологический контроль за возбудителем листериозной инфекции.

Изучен мониторинг культур листерий, выделенных из различных клинических источников и пищевых продуктов Республики Беларусь. Как показали исследования, большинство изолятов относятся к двум наиболее распространенным в мире клонам CC1 и CC6, циркулирующим и в других странах.

**Литература**

1. Biosciences Catalogue. Microbiology, Animal Cell Culture, Plant & Insect Tissue Culture, Molecular Biology Products [Electronic resource] / Himedia Laboratories, 2008-09. — Mode of access: http://www.himedialabs.com/HML/Pages/default.aspx. — Date of access: 20.06.2014.

2. Готовые питательные среды: комментированный каталог / Науч.-исслед. центр фармакотер. (НИИЦФ). — СПб., 2005. — С. 42–44.

3. Комплект питательных сред для культивирования и выделения листерий / М.В. Храмов [и др.] // Актуальные вопросы разработки и производства диагностических питательных сред и тест-систем: материалы 3-й Междунар. науч-практ. конф. — Махачкала, 2001. — С. 45.

4. Алиева, Е.В. Разработка лабораторных экспресс-методов и технологии производства иммунодиагностических препаратов для выявления возбудителей листериоза и кампилобактериоза: автореф. дис. … д-ра мед. наук: 03.00.07 / Е.В. Алиева; ФГУН «Моск. науч.-исслед. ин-т эпидемиол. и микробиол.». — М., 2008. — 30 с.

5. Разработка сухого питательного бульона для выделения листерий / Л.Д. Газиумарова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2011. — Вып. 4. — С. 250–254.

6. Разработка сухой селективной среды для выделения листерий / Л.Д. Газиумарова [и др.] // Здравоохранение. — 2012. — № 10. — С. 17–21.

7. Выделение и идентификация листерий из клинического материала и пищевых продуктов / Л.Д. Газиумарова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2013. — Вып. 6. — С. 141–144.

8. Испытание новых питательных сред для накопления и выделения листерий с целью микробиологического мониторинга / Л.Д. Газиумарова [и др.] // Медицина. — 2014. — № 3. — С. 57–61.

9. Метод молекулярно-генетической индикации бактерий рода *Listeria* и идентификации вида *Listeria monocytogenes*: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 11.11.2014 № 013-1114.

10. Зайцева, Е.А. Система анализа микробиологических и молекулярно-генетических маркеров для выявления высоко вирулентных штаммов *Listeria monocytogenes*: автореф. дис. … д-ра мед. наук: 03.02.03 / Е.А. Зайцева. — М., 2010. — 40 с.

11. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR / M. Doumith [et al.] // J. Clin Microbiol. — 2004. — Vol. 42. — P. 3819–3822.

12. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes* [Electronic resource] / CDC; PulseNet. — Mode of access: http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/listeria-pfge-protocol-508c.pdf. — Date of access: 12.10.2015.

13. Borucki, M.K. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR / M.K. Borucki, D.R. Call // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41. — P. 5537–5540.

14. Lecuit, M. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des *Listeria* / M. Lecuit, A. Leclercq. — Paris: Institut Pasteur, 2014. — 88 p.

15. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution / M. Ragon [et al.] // PLoS Pathog. — 2008. — Vol. 4, № 9. — e1000146. doi: 10.1371/journal.ppat.1000146.

1.6. Cooney, C.A. Techniques and high resolution DNA size markers for pulsed field gel electrophoresis / C.A. Cooney // Mol. Biotechnol. — 1994. — Vol. 2, № 2. — P. 119–127.

## PERFECTION OF LISTERIOSIS LABORATORY DIAGNOSIS AND THE PATHOGEN ISOLATES MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS

*Gaziumarova L.D.[1], Bakaeva T.N.[1], Titov L.P.[1], Shnyp I.V.[1], Filipienok S.S.[2], Dudchik N.V.[3], Kluiko N.L.[4], Dorina G.A.[5], Voitik S.B.[6]*

*[1]State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;*

*[2]State Institution "Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health", Minsk, Republic of Belarus;*

*[3]Republican Unitary Enterprise "Scientific Practical Centre of Hygiene", Minsk, Republic of Belarus;*

*[4]Healthcare Institution "Municipal Children's Infectious Hospital', Minsk, Republic of Belarus;*

*[5]State InstitutionMinsk "Municipal Center for Hygiene & Epidemiology", Minsk, Republic of Belarus;*

*[6]State Institution "Minsk Region Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health", Minsk, Republic of Belarus*

Bacteriological, biochemical, and molecular genetic methods for listeriosis diagnosis were developed and used in the laboratory practice. The combination of PCR with the bacteriological methods will allow improving the epidemiological monitoring for the listeriosis pathogen.

**Keywords:** dry culture media, isolates genus *Listeria*, identification.

Поступила 15.10.2015

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ А И ИНТЕЛЕЙКИНА 6 И ГЕНИТАЛЬНАЯ ИНФЕКЦИЯ ПРИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДАХ

*Недосейкина М.С.[1], Аксенова Е.А.[2]*

*[1]Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь;*

*[2]Государственное научное учреждение «Институт цитологии и генетики Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** В исследовании была изучена роль полиморфизма генов, кодирующих продукцию провоспалительных цитокинов, и генитальной инфекции в инициации преждевременных родов. Среди женщин с преждевременными родами выявлена высокая частота генитальной инфекции (88%; p<0,0001), без этиотропного лечения в III триместре возрастает доля вагинита (79%; p<0,0001). У пациенток с генотипом IL-6(-174GC)/TNFα(-308GG) при генитальной инфекции возрастает вероятность развития преждевременных родов в 21 раз (p<0,0001), при генотипе IL-6(-174CC)/TNFα(-308GG) — в 22 раза (p = 0,01), при IL-6(-174GG)/TNFα(-308GG) — в15 раз (p = 0,01).

**Ключевые слова:** преждевременные роды, цитокины, генитальная инфекция.

**Введение.** Одним из приоритетных направлений развития перинатологии является снижение фетоинфантильных потерь и, как следствие, совершенствование методов профилактики преждевременных родов, разрабатываемых на основании детального изучения этиопатогенетических механизмов досрочного прерывания беременности.

С наступлением беременности весь организм женщины претерпевает изменения, наиболее выраженные в иммунной системе — модуляция иммунного ответа с активацией Т-хелперов 2 типа, ответственных за работу гуморального звена иммунитета [1].

Функции вырабатываемого Т-хелперами 2 типа интерлейкина 6 (IL-6) многообразны: инициация воспалительной реакции, регуляция иммунного ответа, активация иммуносупресорных кле-

ток в период беременности с подавлением реакции материнского иммунитета по отношению к плоду [2]. IL-6 подавляет секрецию фактора некроза опухолей α (TNFα), способствуя регуляции воспалительного процесса [3]. TNFα является активатором синтеза матриксных металлопротеиназ, разрушающих коллагенновые и эластиновые волокна шейки матки, и фагоцитарной активности клеток Гофбауера–Кащенко, которые при восходящем инфицировании плаценты могут оказывать прямое повреждающее действие, приводя к активации сократительной деятельности матки [4].

Выявлены полиморфные локусы в промоторной области генов цитокинов, влияющие на их количественное содержание в биологических жидкостях [5]. Низкий сывороточный уровень IL-6 в крови у обследованных пациенток наблюдали при генотипе IL-6(-174CC), который характерен для представительниц европеоидной расы [6, 7]. Высокая частота встречаемости генотипа IL-6(-174CC) выявлена среди женщин с повторными самопроизвольными абортами [8].

Генотип TNFα(-308GG) ответственен за низкую продукцию цитокина [9], при гомозиготном носительстве аллеля G повышается риск преждевременных родов в 2,7 раза, а при сочетании с бактериальным вагинозом — в 6 раз [10].

**Цель** исследования — изучение роли полиморфизма генов TNFα(-308A/G) и IL-6(-174G/C) и генитальной инфекции при преждевременных родах.

**Материалы и методы.** Обследовано 100 женщин в III триместре беременности. В исследуемой группе изучали течение настоящей беременности и родов. Оценивали клинические проявления генитальной инфекции при поступлении беременных в стационар. Все пациентки после госпитализации были обследованы на возбудителей генитальных инфекций (*U. parvum*, *U. urealyticum*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *C. trachomatis*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с помощью тест-систем «АмплиСенс® Флороценоз/Микоплазмы-FL», «АмплиСенс® Mycoplasma genitalium-FL» и «АмплиСенс® Chlamydia trachomatis-скрин-титр-FL» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ). Уточняли результаты обследования на возбудителей генитальных инфекций при постановке на диспансерный учет по беременности и при положительном результате лечение.

Определение цитокинового статуса проводили методом иммуноферментного анализа. Кровь для исследования брали из локтевой вены пациенток за 1–3 ч до родоразрешения. Уровни провоспалительных цитокинов IL-6 и TNFα в венозной крови рожениц исследованы с помощью тест-систем «Альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» и «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ» («ЗАО Вектор-БЕСТ», РФ), значения концентрации цитокинов использованы для рассчета коэффициента IL-6/TNFα. Его снижение отражает уменьшение в крови концентрации IL-6 или повышение уровня TNFα, данный дисбаланс приводит к нарушению регуляции воспалительной реакции и способствует распространению воспаления.

Проводили типирование полиморфных аллелей -174 G/C в промоторной области гена IL-6 и -308A/G в промоторной области гена TNFα. Материалом для исследования была кровь пациенток, ДНК выделяли при помощи тест-системы «АмплиСенс®ДНК-сорб-В» (РФ). Диагностика полиморфных аллелей -174 G/C в промоторной области гена IL-6 и -308G/A в промоторной области гена TNFα проводится методом ПЦР со специфическими праймерами. Программа амплификации для генотипирования полиморфизма в гене IL-6: начальная денатурация при 94ºС в течение 4 мин, 35 циклов (денатурация при 94ºС в течение 30 с, отжиг праймеров при 54ºС 40 с и элонгация при 72ºС 40 с), финальная элонгация в течение 4 мин при температуре 72ºС. Для генотипирования TNFα программа амплификации включает следующие этапы: начальная денатурация при 94ºС в течение 4 мин, 30 циклов (денатурация при 94ºС в течение 30 с, 30 с отжиг праймеров при 63ºС и элонгация при 72ºС 20 с), финальная элонгация при температуре 72ºС в течение 2 мин. Охлаждение образцов до 4–12ºС.

После амплификации продукты реакции подвергали действию специфических эндонуклеаз Nla III (Hin1II) для гена IL-6 для и Nco I — для гена TNFα (Fermentas, Литва). Рестрикции проводили в водном термостате в течение 15 ч при температуре 37ºС. Для детекции использовали вертикальный гель-электрофорез (6% полиакриламидный гель). Маркер длины амплифицированных фрагментов — pCU19/MspI. Для гена IL-6 выявление одного фрагмента 166 пар оснований (п.о.) оценивали как гомозиготный генотип IL-6(-174GG), а при одновременном выявлении фрагментов 166 и 122 п.о. — гетерозиготный генотип IL-6(-174GC). Гомозиготы IL-6(-174CC) определялись по наличию фрагмента длиной 122 п.о. Для гена TNFα выявление только фрагментов 107 п.о. оценивали как

гомозиготный генотип TNFα(-308AA), а 87 п.о. — TNFα(-308GG), при одновременном выявлении фрагментов 107 и 87 п.о. — гетерозиготный генотип TNFα(-308AG).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы MedCalc 10.2.0.0 («MariaKerke», Бельгия). Для описания качественных признаков использовали долю (p) и 95% доверительный интервал (95% CI), рассчитанный по методу Клоппер–Пирсона. Общее межгрупповое различие качественных признаков определяли с помощью критерия $\chi^2$ с поправкой Йейтса на непрерывность. Шансы возникновения изучаемого события в группах оценивали по отношению шансов (OR) и 95% CI.

Для описания признаков, не подчиняющихся закону нормального распределения, применяли следующие критерии: медиана (Me), 25 и 75 процентили (25; 75%). Парное межгрупповое сравнение количественных признаков рассчитывали по критерию Манна–Уитни с поправкой Йейтса (Z).

Статистически значимыми были результаты с значением $p<0,05$.

**Результаты и их обсуждение.** У 50 женщин данная беременность завершилась преждевременными родами на сроке от 196 до 258 дней. Данные пациентки были госпитализированы в стационар по поводу развившейся родовой деятельности или с преждевременным излитием околоплодных вод. На сроке от 196 до 238 дней родоразрешена 31 (62%; 47–75) беременная и на сроке от 239 до 258 дней — 19 (38%; 25–53) женщин. Также обследовано 50 рожениц с доношенной беременностью.

Среди женщин, у которых данная беременность завершилась преждевременными родами, в I триместре обследовано на возбудителей генитальных инфекций 34 (68%; 53–81) пациентки, из которых диагноз генитальной инфекции поставлен 19 (56%; 38–73). По сравнению с женщинами с преждевременными родами у наибольшей доли пациенток с доношенной беременностью (47; 94%; 84–99) проведено исследование при постановке на диспансерный учет ($\chi^2 = 10,9$; $p = 0,001$), генитальная инфекция была подтверждена в 33 (70%; 55–83) случаях.

Генитальная инфекция перед родоразрешением верифицирована у 44 (88%; 76–96) женщин с преждевременными родами и у 10 (20%; 10–34) с доношенной беременностью ($\chi^2 = 46,5$; $p<0,0001$). Антибактериальная терапия была проведена 28 (85%; 68–85) пациенткам с преждевременными родами и 12 (63%; 38–84) женщинам со срочными родами, сроки начала антибактериальной терапии микоплазменной и хламидийной инфекций в группах значимо не различались и составили 18±4,8 и 16,8±2,8 недели соответственно ($p = 0,5$). Для лечения генитальной инфекции во время беременности использовали антибактериальные лекарственные средства из группы макролидов. У пациенток, не получивших этиологическую антибактериальную терапию, с увеличением срока беременности возрастали шансы вагинита, который диагностирован в III триместре у 38 (79%; 65–89) беременных против 18 случаев во II триместре (38%; 24–53; OR = 6,3; 95% CI 2,6; 15,7, $p = 0,0001$) и 14 случаев в I (29%; 17–44; OR = 9,2; 95% CI 3,6; 23,5, $p<0,0001$).

Значение коэффициента IL-6/TNFα у пациенток с генитальной инфекцией составило 5,05 (1,64; 53,47), что было статистически значимо ниже по сравнению с 30,03 (4,05; 292,00) у женщин без признаков инфекции ($Z = 2,07$; $p = 0,038$).

Распределение выявленных аллельных вариантов генов TNFα(-308A/G) и IL-6 (-174 G/C) среди женщин с преждевременными и срочными родами представлено в таблице 1.

Таблица 1. — Варианты генотипов, выявленные у обследованных пациенток, (n, p%, $CI_p$)

| Комбинация генотипов | Преждевременные роды (N = 50) | Срочные роды (N = 50) | Уровень статистической значимости |
|---|---|---|---|
| IL-6(-174GG)/TNFα(-308GG) | 10 (20%; 10–34) | 11 (22%; 12–36) | $\chi^2 = 0,06$; $p = 0,8$ |
| IL-6(-174GC)/TNFα(-308GG) | 26 (52%; 37–66) | 27 (54%; 39–68) | $\chi^2 = 0,04$; $p = 0,8$ |
| IL-6(-174CC)/TNFα(-308GG) | 9 (18%; 9–31) | 3 (12%; 3–31) | $\chi^2 = 3,4$; $p = 0,07$ |
| IL-6(-174GG)/TNFα(-308AG) | 2 (4%; 1–14) | 2 (4%; 1–14) | $p = 1$ |
| IL-6(-174GC)/TNFα(-308AG) | 2 (4%; 1–14) | 6 (12%; 5–24) | $\chi^2 = 2,2$; $p = 0,1$ |
| IL-6(-174GG)/TNFα(-308AA) | 1 (2%; 0–11) | 1 (2%; 0–11) | $p = 1$ |

Генотип IL-6(-174CC) у всех обследованных пациенток выявлен в комбинации с TNFα(-308GG). У 8 (67%; 35–90) женщин с данным генотипом и манифестной генитальной инфекцией

данная беременность завершилась преждевременными родами протиа 3 (25%; 6–57) пациенток, у которых выявлен генотип IL-6(-174CC)/TNFα(-308GG), при отсутствии генитальной инфекции доносили беременность до физиологического срока родов ($\chi^2 = 4,2$; p = 0,041). Из 8 беременных с данным генотипом и генитальной инфекцией перед родоразрешением при преждевременных родах у 7 (87,5%) пациенток выявлены значения коэффициента IL-6/TNFα ниже 75-го процентиля концентрации ($\chi^2 = 9,0$; p = 0,003).

При генотипе IL-6(-174GC)/TNFα(-308GG) и наличии урогенитального микоплазмоза у женщин с преждевременными родами составил индекс IL-6/TNFα 1,75 (1,05; 10,49), что статистически значимо ниже по сравнению со значением 36,29 (12,78; 171,94) у пациенток с доношенной беременностью (Z = 2,48; p = 0,01).

Шансы преждевременных родов у пациенток с генотипами IL-6(-174GC)/TNFα(-308GG), IL-6(-174GG)/TNFα(-308GG) и IL-6(-174CC)/TNFα(-308GG) были выше при манифестной генитальной инфекции (таблица 2).

Таблица 2. — Преждевременные роды у пациенток с генотипами IL-6(-174GC)/TNFα(-308GG), IL-6(-174GG)/TNFα(-308GG) и IL-6(-174CC)/TNFα(-308GG) при наличии генитальной инфекции, n, p%, 95%$CI_p$

| Генотип | Преждевременные роды | | OR, 95%CI, p |
|---|---|---|---|
| | при генитальной инфекции | без генитальной инфекции | |
| IL-6(-174GG)/TNFα(-308GG) N = 21 | 9 (43%; 22–66) | 1 (5%; 0–24) | OR = 15,0, 95%CI 1,7; 133,6, p = 0,01 |
| IL-6(-174CC)/TNFα(-308GG) N = 12 | 8 (67%; 35–90) | 1 (8%; 0–39) | OR = 22,0, 95%CI 2,1; 236,1, p = 0,01 |
| IL-6(-174GC)/TNFα(-308GG) N = 53 | 24 (45%; 32–60) | 2 (4%; 1–13) | OR = 21,1, 95%CI 4,7; 95,8, p<0,0001 |

**Заключение.** Обследование для диагностики возбудителей генитальных инфекций проведено у 68% женщин с преждевременными родами и 94% пациенток с доношенной беременностью ($\chi^2 = 10,9$; p = 0,001).

Манифестная генитальная инфекция перед родоразрешением отмечена у наибольшей доли женщин с преждевременными родами (88%; p<0,0001). Процент охвата антибактериальным лечением при верифицированной генитальной инфекции и сроки начала терапии у пациенток с преждевременными и срочными родами были сопоставимы. При отсутствии этиотропной антибактериальной терапии с увеличением срока беременности повышаются шансы вагинита, доля которого в III триместре составила 79% против 29% в I триместре (p<0,0001). При генитальной инфекции отмечены статистически значимо низкие значения коэффициента IL-6/TNFα (Me = 5,05; p = 0,038).

При генотипе IL-6(-174CC)/TNFα(-308GG) и манифестной генитальной инфекции у 67% женщин беременность завершилась преждевременными родами (p = 0,041), из них у наибольшей доли пациенток (87,5%) отмечены низкие и парамедианные значения коэффициента IL-6/TNFα (p = 0,003). При генотипе IL-6(-174GC)/TNFα(-308GG) и наличии урогенитального микоплазмоза у женщин с преждевременными родами коэффициент IL-6/TNFα был ниже по сравнению с пациентками при доношенной беременности (1,75 против 36,29; p = 0,01).

При генитальной инфекции у пациенток с генотипом IL-6(-174GC)/TNFα(-308GG) шансы преждевременных родов возрастают в 21 раз (p<0,0001), при генотипе IL-6(-174CC)/TNFα(-308GG) — в 22 раза (p = 0,01), при IL-6(-174GG)/TNFα(-308GG) — 15 раз (p = 0,01).

**Литература**

1.Th1/Th2/Th17 and regulator y T-cell paradigm in pregnancy / S. Saito [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. — 2010. — Vol. 63. — P. 601–610.

2.Margni, R. During pregnancy, in the context of a Th2-type cytokine profile, serum IL-6 levels might condition the quality of the synthesized antibodies / R. Margni, A. Zenclussen // Am. J. Reprod. Immunol. — 2001. — Vol. 46, № 3. — P. 181–187.

3.Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF / R. Schindler [et al.] // Blood. — 1990. — Vol. 75. — P. 40–47.

4.Сидельникова, В.М. Невынашивание беременности / В.М. Сидельникова, Г.Т. Сухих. — М.: МИА, 2010. — 536 с.

5.Sehgal, P.B. Regulation of IL6 gene expression / P.B. Sehgal // Res. Immunol. — 1992. — Vol. 143. — P. 724–734.

6.Are cytokine gene polymorphisms related to *in vitro* cytokine production profiles? / M.C. Warlé [et al.] // Liver Transpl. — 2003. — Vol. 9. — P. 170–181.

7.Interleukin-6 promoter -174 polymorphism and spontaneous preterm birth / H.N. Simhan [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. — 2003. — Vol. 189, № 4. — P. 915–918.

8.Von Linsingen, R. A case-control study in IL6 and TGFB1 gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion in southern Brazilian patients / R. von Linsingen, E.P. Bompeixe, G. Mda Bicalho // Am. J. Reprod. Immunol. — 2005. — Vol. 53, № 2. — P. 94–99.

9.Pu, J. Relationship among TNF-alpha gene promoter -308 site polymorphism, the levels of maternal serum TNF-alpha, and the mRNA expression placental TNF-alpha in preterm labor / J. Pu, W. Y. Zeng // Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. — 2009. — Vol. 40, № 1. — P. 77–80.

10. A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth / G.A. Macones [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. — 2004. — Vol. 190, № 6. — P. 1504–1508.

## POLYMORPHISMS IN HUMAN INTERLEUKIN-6 (-174) AND TUMOR NECROSIS FACTOR α (-308) GENES AND GENITAL INFECTION OF PRETERM LABOUR

*Nedoseikina M.S.[1], Aksyonova E.A.[2]*

*[1]Educational Establishment "Gomel State Medical University", Gomel, Republic of Belarus;*
*[2]State Scientific Institution "Institute of Genetics & Cytology, National Academy of Sciences of Belarus", Minsk, Republic of Belarus*

The aim of this study was to determine the role of genes polymorphisms which encode pro-inflammatory cytokine production, and genital infection in the initiation of premature birth. It was revealed a high frequency of genital infection (88%; $p<0.0001$) among women with preterm labor, increased the proportion of vaginitis in women in the third trimester without etiotropic treatment (79%; $p<0.0001$). The patients with genotype of IL-6(-174GC)/ TNFα (-308GG) and the genital infection have 21-times higher probability of preterm birth development ($p<0.0001$), with the genotype of IL-6 (-174CC)/TNFα (-308GG) — to 22-time ($p = 0.01$), with IL-6 (-174GG)/TNFα (-308GG) — 15-fold ($p = 0,01$).

**Keywords:** preterm labour, cytokines, genital infection.

Поступила 14.09.2015

## ПАТОМОРФОЗ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ЭНДО- И ЭКЗОЦЕРВИКСА И ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ШЕЙКИ МАТКИ, ПЕРСИСТЕНТНО-ИНФИЦИРОВАННЫХ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* И ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА

*Асташонок А.Н.[1], Рубаник Л.В.[1], Полещук Н.Н.[1], Квачева З.Б.[2]*

*[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь;*
*[2]Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Проведен микробиологический анализ соскобного материала 45 пациенток с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта. Выявлено наличие ДНК ВПЧ ВКР в 5 из 10 (50%) образцов I группы (эрозия). Во II (цервицит) и III (дисплазия) группах ДНК ВПЧ ВКР регистрировалась в 6 из 10 (60,0%) пробах и в 19 из 25 (76%) образцах соответственно. Методом электронной микроскопии определены морфологические признаки, свидетельствующие о деструк-

тивных и репаративных процессах в эпителиоцитах урогенитального тракта. Получены первичные культуры эпителиоцитов шейки матки для изучения механизмов клеточной трансформации и влияния других патогенов (*Chlamydia trachomatis*) на клетку в условиях персистенции папилломавирусной инфекции.

**Ключевые слова:** вирус папилломы человека, *Chlamydia trachomatis*, электронная микроскопия, первичные культуры клеток.

**Введение.** Заболевания урогенитального тракта сохраняют лидирующие позиции среди инфекций, передаваемых преимущественно половым путем [1]. В последнее десятилетие наблюдается неуклонный рост урогенитальной папилломавирусной инфекции, этиологический агент, как известно, обладает высоким онкогенным потенциалом и является основным экзогенным фактором цервикального канцерогенеза [1, 2].

Показано, что среди лиц с цервикальными дисплазиями, ассоциированными с папилломавирусами высокого онкогенного риска (ВПЧ ВКР), диагностируются и другие патогены, в т. ч. и *C. trachomatis*, вирусы семейства *Herpesviridae* [3]. Эпидемиологические данные указывают на то, что наличие по меньшей мере одной, а возможно, и нескольких урогенитальных инфекций ускоряет развитие цервикальной дисплазии и является фактором риска развития рака шейки матки [1, 4]. Установлено, что наиболее опасным в отношении возникновения предрака и рака шейки матки представляется ассоциат, в котором присутствует *Trichomonas vaginalis*, высокоонкогенная группа папилломавирусов и герпес группа (цитомегаловирус, ВПГ-2 типа) [3]. При таком составе ассоциата нередко наблюдают картину тяжелой дисплазии.

Механизмы патогенеза и истинные факторы, обуславливающие различные темпы прогрессирования папилломавирусной инфекции, до настоящего времени остаются малоизученными. Не выявлены достоверные прогностические признаки, способствующие длительному персистированию папилломавирусов в организме человека. Влияет ли вирус на репродуктивные свойства, морфогенез *C. trachomatis* и усиливают ли хламидии собственно трансформацию или гиперпролиферацию чувствительных клеток-мишеней в условиях дополнительной вирусной нагрузки также неизвестно.

Противоречивость имеющихся в литературе данных о механизмах трансформации клеток урогенитального тракта под влиянием онкогенных папилломавирусов и роли бактериально-вирусных ассоциатов, в т. ч. и *C. trachomatis*, обуславливает необходимость всестороннего проведения исследований по данной проблеме с использованием разнообразного клинического материала и современного технологического оборудования — электронной микроскопии. Это позволит адекватно сопоставить клинические данные с данными об обнаруживаемых патогенах и, возможно, выявить пути прогнозирования течения заболеваний урогенитального тракта в зависимости от репродуктивных свойств возбудителей.

**Цель** исследования — используя микробиологические методы в сочетании с электронной микроскопией, изучить клетки цервикального эпителия *in situ* и в первичной культуре клеток, хронически инфицированной *C. trachomatis* и ВПЧ ВКР.

*Материалы и методы.* Исследован соскобный материал, полученный из урогенитального тракта 45 пациенток с воспалительными заболеваниями: I группа — эрозия шейки матки (n = 10), II группа — цервицит (n = 10), III группа — дисплазия (n = 25). Возраст пациенток варьировал от 20 до 38 лет (29±9 лет).

*Электронная микроскопия.* Для ультраструктурного анализа мазки-соскобы из уретры, цервикального канала 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–x250000.

*Полимеразная цепная реакция (ПЦР).* Выделение ДНК проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ).

Выявление ДНК хламидий проводили с помощью «АмплиСенс Chlamydia trachomatis-EPh». Детекцию ДНК и дифференциацию герпесвирусов проводили с использованием наборов «АмплиСенс CMV – Eph» и «АмплиСенс HSV I, II – Eph», предусматривающий метод ПЦР. Выявление ДНК

ВПЧ проводили с помощью ПЦР-набора «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин – FL». Количественное определение титра ВПЧ ВКР осуществляли с помощью набора «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр – FL». Учет результатов осуществляли с помощью четырехканального роторного анализатора «АЛА-1/4», предназначенного для оценки результатов ПЦР при использовании реагентов серии FEP, основанных на принципах флуоресцентной детекции по «конечной точке» (SIA «BioSan»).

*Получение модели хламидийно-папилломавирусной инфекции in vitro и ее характеристика.* Источником клеток являлись образцы ткани биопсийного материала слизистой шейки матки 7 женщин с лабораторно подтвержденной хламидийно-папилломавирусной инфекцией. Забор ткани осуществлялся во флакон со стерильной питательной средой DMEM/F-12, содержащей гентамицин (150 мкг/мл) и амфотерицин Б (10 мкг/мл).

Были апробированы два подхода приготовления монослойных культур эпителиальных клеток слизистой шейки матки (ЭКШМ).

Первый подход заключался в получении эпителиальных клеток методом «эксплантов». Для этого образец ткани промывали в течение 5 мин в фосфатном буфере, содержащем антибиотики. В чашке Петри ткань механически измельчали на фрагменты размером 1–2 мм$^2$ и вносили в капельке эмбриональной телячьей сыворотки в пластиковые флаконы с высокой адгезионной способностью или вносили во флаконы, покрытые коллагеном 1-го типа. Флаконы с эксплантами переносили в термостат на 30 мин. Затем добавляли питательную среду DMEM/F-12 с 10%-й сывороткой так, чтобы экспланты находились на 1/2 объема в среде.

Второй подход заключался в ферментативной обработке измельченных фрагментов ткани 0,5%-м раствором коллагеназы 1-го типа в течение 20 мин. К дезагрегированной ткани добавляли 5–7 мл среды DMEM/F12 с 10%-й сывороткой, затем центрифугировали при 200 g. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в ростовой среде. Засевали во флаконы с площадью адгезии клеток 12 или 25 см$^2$, в объеме 2,5–5 мл — до 500 тыс. клеток.

**Результаты и их обсуждение.** *Микробиологический анализ.* Результаты ПЦР-исследования показали наличие ДНК ВПЧ ВКР в 5 из 10 (50%) образцов I группы. Во II и III группе ДНК ВПЧ ВКР регистрировалась в 6 из 10 (60,0%) пробах и в 19 из 25 (76%) образцах соответственно. При определении вирусной нагрузки ВПЧ ВКР выявлено, что у женщин с дисплазией шейки матки значительно чаще регистрировалась повышенная вирусная нагрузка (более 5 lg) по сравнению с другими группами. Полученные данные свидетельствовали о том, что у женщин с цервицитом вероятнее всего имеет место транзиторная папилломавирусная инфекция, а у женщин с эрозией и дисплазией шейки матки отмечается хроническая форма инфекции.

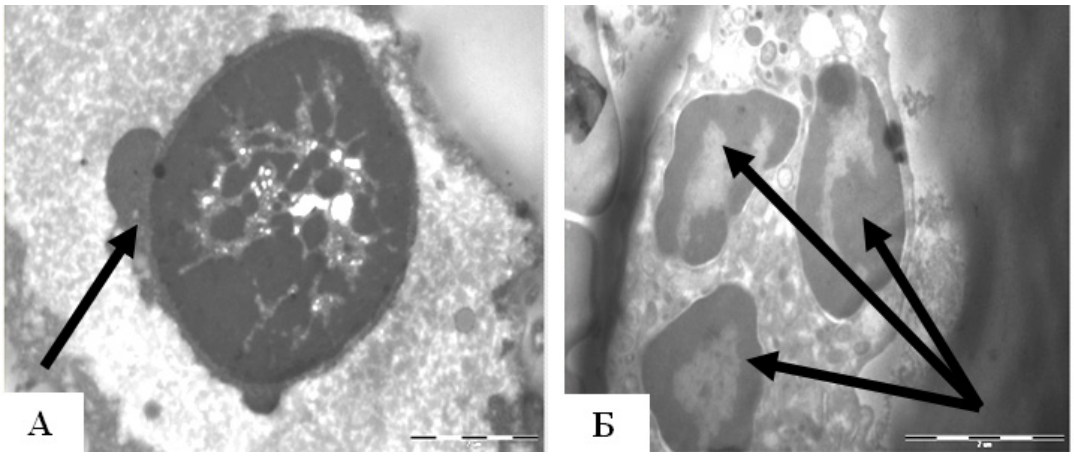
Специфический *orf3* участок ДНК криптической плазмиды *C. trachomatis* был выявлен в 15 из 45 (33,3%) проб. Однако, используя дополнительно культуральный метод, часть изолятов *C. trachomatis* удалось выделить из отрицательных ПЦР-образцов. Это можно объяснить тем фактом, что диагностическая чувствительность ПЦР-наборов составляет не менее $10^3$–$10^4$ геном эквивалентов ДНК в 1 мл пробы. При хронической форме хламидийной инфекции, как правило, возбудитель репродуцируется в более низких титрах.

*Электронная микроскопия соскобного материала.* Ультраструктурный анализ материала показал, что в организации урогенитального эпителия наблюдается ряд морфологических изменений, затрагивающих преимущественно клеточное ядро и отдельные клеточные органеллы (митохондрии, эндоплазматический ретикулум).

Эпителиоциты были уплощены и, как правило, имели пикнотическое ядро. Структура хроматина была не однородная, преобладал гетерохроматин, который распределялся вблизи ядерной мембраны. В отдельных случаях вокруг ядра определялась светлая зона цитоплазмы, заполненная бесструктурным веществом высокой электронной плотности. Ядра части эпителиоцитов приобретали неправильную морфологию с разбухшей ядерной мембраной, а количество хроматина в них увеличивалось (рисунок 1). Это сопровождалось появлением участков повышенной электронной плотности в центральной части кариоплазмы и образованием сильно конденсированных глыбок хроматина вблизи ядерной мембраны. В отдельных случаях в надъядерной зоне отмечались остаточные тельца. Наблюдалось разрыхления цитозоля с появлением в цитоплазме участков различной электронной плотности.

Вблизи базальной мембраны располагались эпителиоциты пристеночного слоя. Сама базальная мембрана имела неравномерный контур, в отдельных участках отмечалось ее расслоение и/или

истончение. Эпителиоциты базальной мембраны имели вытянутую или цилиндрическую форму. Большую часть этих клеток занимало овальное ядро с преобладанием в структуре гетерохроматина. В отдельных случаях ядра имели признаки апоптоза: конденсация и «раздробление» хроматина на отдельные глыбки, образование множественных вакуолей. Среди клеточных органелл визуализировались единичные митохондрии с кристами, свободные рибосомы, небольшое число сильно уплощенных цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума. Одновременно отмечались признаки нарушения межклеточных контактов — отсутствие свободных микроворсинок, микрошипиков, образующих щелевидные контакты за счет десмосом. В отдельных случаях наблюдались признаки повышенной проницаемости эпителиального пласта за счет накопления в межклеточном пространстве инфильтратов из эритроцитов или лимфоцитов.




А — аномальная конденсация глыбок хроматина внутри кариоплазмы, контуры ядерной мембраны извилистые и неоднородные с очаговым лизисом; Б — мультинуклеация клеточного ядра эпителиоидной клетки с гомогенизацией хроматина и акцентированием зоны ядерной оболочки

**Рисунок 1. — Ультраструктурные изменения эпителиоцитов соскобного материал (масштабный отрезок — 100 нм)**

В ряде эпителиоцитов отмечались специфические изменения, характерные для хламидийной и папилломавирусной инфекции. В одних клетках отмечались включения, содержащие ретикулярные тельца (РТ) в виде «реверсируемых» структур. В других клетках отмечались скопления нуклеокапсидов ВПЧ. Комплекс морфологических изменений представлен в таблице.

Таблица — Морфологические признаки патологии органелл клеток экзо- и эндоцервикального типов

| Признаки | Эпителиоциты экзоцервикса | Эпителиоциты эндоцервикса |
|---|---|---|
| 1. Койлоцитарная атипия | | |
| а) значительное увеличение размеров ядра | + | ++ |
| б) гиперхроматоз ядер | + | ++ |
| в) неравномерное распределение ядерного хроматина | + | ++ |
| г) ядерная мембрана неровная, складчатая | + | ++ |
| д) кариорексис; двухъядерность, многоядерность | + | ++ |
| 2 Клеточная атипия | | |
| а) отсутствие органелл (баллонная клетка) | + | ++ |
| б) маргинация цитоплазмы с образованием зон просветления вокруг ядра | + | + |
| в) гиперкератоз (клетки в виде «безъядерных» чешуек) | + | + |
| г) паракератоз (миниатюрные компактные клетки с пикнотическим ядром) | + | + |
| 3 Характер поверхности клеточного пласта: | | |
| а) ровная поверхность | + | + |
| б) неровная поверхность | + | + |
| Примечание: ++ — постоянное наличие признака; + — признак не постоянен; - — отсутствие признака. | | |

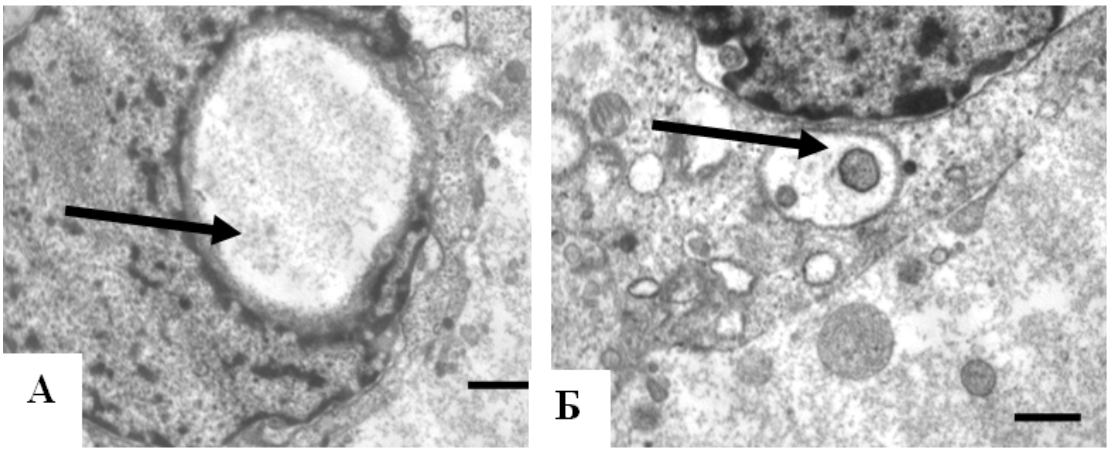
Таким образом, по результатам ультраструктурного анализа выявлены морфологические признаки, свидетельствующие о деструктивных и репаративных процессах эпителиоцитов урогенитального тракта. Комплекс выявленных патологических изменений (обнаружение койлоцитов, атипии клеточных ядер, гиперкератоз, паракератоз, вирусные нуклеокапсиды) свидетельствует о сопутствующей папилломавирусной инфекции.

*Получение первичных культур клеток ЭКШМ. Светооптическая и ультраструктурная характеристика.* Динамическое наблюдение за эпителиальными клетками слизистой шейки матки показало, что через 8 дней культивирования наблюдалась миграция клеток округлой формы из эксплантa. Через 8–10 дней при микроскопии наблюдали зону роста клеток вокруг эксплантa. Популяция была морфологически разнородной и представлена из клеток полигональной и фибробластоподобной формы.

Через 14 дней появлялись крупные многоядерные и вакуолизированные клетки с потерей контактов друг с другом. У части клеток наблюдался пикноз, или фрагментация ядер, или просветление околоядерного пространства. В течение последующих 3–4 дней усиливался процесс цитопатологии и наблюдалась цитодеструкция, отслоение фрагментов ткани, клеток от субстрата.

Клеточный материал далее был исследован с помощью электронной микроскопии. Ультраструктурный анализ образцов выявил изменения, затрагивающие клеточное ядро, органеллы и цитоплазматические отростки (филоподии).

Внутриклеточные типичные включения (тельца Гальберштедтера–Провачека), характерные для *C. trachomatis*, в материале не обнаруживались. В цитоплазме эпителиоцитов отмечались одиночные или множественные «беспорядочно разбросанные» включения с массой мелких частиц внутри без выраженной ультраструктурной организации (рисунок 2). Данные структуры близки по морфологическим признакам к L-подобным формам возбудителя и могут указывать на частичное блокирование синтеза нуклеопротеидов и нарушение их интеграции в элементарных тельцах. Однако роль этих частиц в патогенезе коинфекций, и в частности при хламидийно-папилломавирусной инфекции, неизвестна.




А — крупная внутрицитоплазматическое включение, отжимающее клеточное ядро и оттесняющее его к периферии; Б — накопление одиночных или множества электронно плотных частиц в цитоплазме эпителиоцита

**Рисунок 2. — Ультраструктурные изменения эпителиоцитов, свидетельствующие о сопутствующей хламидийной инфекции (масштабный отрезок — 100 нм)**

Наряду с общими деструктивными процессами в клетке в 2 из 7 образцов отмечены ультраструктурные признаки, характерные для папилломавирусной инфекции. Эти изменения сводились к уменьшению (паракератоз) или увеличению в размерах отдельных эпителиоцитов (гиперкератоз), мультинуклеации с гомогенизацией хроматина и акцентирование зоны ядерной оболочки, образованием многоядерных клеток с тесно прилегающими друг к другу ядрами, мелкоглыбчатый распад части пораженных ядер. В перинуклеарном участке цитоплазмы отмечалась дезорганизация эндо-

плазматического ретикулума с увеличением лизосомоподобных структур. Полноценных вирусных частиц выявлено не было.

Таким образом, результаты сравнительного использования 2 методов выделения ЭКШМ и их культивирования показали преимущества первого способа — метода «эксплантов». Это объяснялось тем, что взятие биоматериала осуществлялось поверхностным соскобом ткани, фрагменты ткани содержали небольшое количество эпителиальных клеток, которые выделялись из стромы образца вместе с клетками крови в транспортную среду и их трудно было отсепарировать.

В настоящее время считается, что вирусы папилломы человека не имеют экспериментальных моделей *in vitro* и *in vivo*. Это связано с тем, что клетки плоского эпителия, в которых персистирует ВПЧ, проходят определенные этапы созревания — от базальных до поверхностных клеток. ВПЧ инфицирует только базальные клетки (более глубокие слои эпителия), а персистирует в других слоях плоского эпителия (преимущественно в слое зернистых клеток и поверхностном слое клеток) [4]. Однако исследования последних лет свидетельствуют о том, что культивирование кусочков папиллом (кондилом), содержащих ВПЧ-11, ВПЧ-12 на поверхности фибробластов, а также заражение методом трансфекции кератиноцитов ДНК из клеток, инфицированных ВПЧ-16, приводило к включению и экспрессии вирусной ДНК в геном клетки-хозяина [5, 6]. В представленной работе получены первичные данные, свидетельствующие о перспективах использования первичных культур урогенитального эпителия для изучения механизмов трансформации и влияние других патогенов (*C. trachomatis*) на клетку в условиях персистенции папилломавирусов.

**Заключение.** Ультраструктурные исследования цервикального эпителия позволили идентифицировать в образцах отек, кератинизацию, фагоцитирующие сквамозные клетки и клетки, сходные по морфологии с койлоцитами. Охарактеризованы вариации субклеточных органелл в норме и в измененных эпителиоцитах, транзиторные изменения, прогрессирование изменений ультраструктурных параметров в клетках от базального к поверхностному сквамозному слою. Использованный подход по пассированию первичных высокодифференцированных эпителиоидных клеток перспективен для изучения взаимодействия вирус-клетка в условиях коинфекции.

**Литература**

1.Franco, E. Cervical cancer: epidemiology, prevention and role of human papillomavirus infection / E. Franco, E. Duarte-Franco, A. Ferenczy // GMA. — 2001. — Vol. 164. — P. 1017–1025.

2.Новиков, А.И. Инфекции, передаваемые половым путем, и экзоцервикс / А.И. Новиков, А.В. Кононов, И.Г. Ваганова. — М.: Медицина, 2002. — С. 34–59.

3.Macnab, J.C. Herpes simplex virus and human cytomegalovirus: their role in morphological transformation and genital cancers / J.C. Macnab // J. Gen. Virol. — 1987. — Vol. 68. — P. 2525–2550.

4.Doorbar, J. The papillomavirus life cycle / J. Doorbar. // J. Clin. Virol. — 2005. — Vol. 32. — P. 7–15.

5.HSV 2 induced tumourigenicity in HPV-16 immortalized human genital keratinocytes / J.A. DiPaolo [et al.] // Virology. — 1990. — Vol. 177. — P. 777–779.

6.Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line / E.R. Flores [et al.] // Virology. — 1999. — Vol. 262. — P. 344–354.

## PATHOMORPHOSIS OF THE CERVIX ENDO- AND EXO-EPITHELIAL CELLS AND OBTAINING OF PRIMARY CULTURES OF CERVICAL CELLS PERSISTENTLY INFECTED WITH *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* AND HUMAN PAPILLOMAVIRUS OF HIGH ONCOGENIC RISK

*Astashonok A.N.[1], Rubanik L.V.[1], Poleschiuk N.N.[1], Kvacheva Z.B.[2]*

*[1]State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology and Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;*

*[2]State Scientific Institution "Institute of Biophysics & Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus", Minsk, Republic of Belarus*

Microbiological analysis of the urogenital material from 45 patients with inflammatory diseases has been done. HPV-18 DNA was found in 5 of 10 (50%) samples of group I (erosion). HPV DNA was recorded in 6 of 10 (60.0%) and 19 samples of 25 (76%) samples in groups II (cervicitis) and III (dysplasia),

respectively. Morphological signs of destructive and reparative processes of epithelial urogenital tract cells have been identified by electron microscopy. Primary cultures of the cervix epithelial cells have been obtained to study the mechanisms of cell transformation and the impact of other pathogens (*Chlamydia trachomatis*) on cell under conditions of HPV infection persistent.

**Keywords:** human papilloma virus, *Chlamydia trachomatis*, electron microscopy, primary cell cultures.

Поступила 15.09.2015

## ИЗУЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И НЕВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СУСТАВОВ

*Полуян О.С., Костюк С.А., Юрага Т.М.*

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

**Реферат.** Исследование посвящено изучению процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у 150 пациентов с воспалительными и невоспалительными заболеваниями суставов. Анализ полученных результатов свидетельствует о глубоких нарушениях в системе перекисного окисления липидов, что подтверждается достоверным увеличением его продуктов, в частности, диенкетонов, дитенконъюгатов, малоновогодиальдегида, при этом интенсивность процессов липопероксидации зависит от этиологического агента заболевания. Повышение активности перекисного окисления липидов в организме пациентов с заболеваниями суставов различной этиологии, вероятно, является одним из патогенетических звеньев и требует проведения фармакокоррекции указанных состояний.

**Ключевые слова:** заболевания суставов, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, витамин А, витамин Е.

**Введение.** Перекисное окисление липидов (ПОЛ) — сложный многостадийный цепной процесс окисления кислородом липидных субстратов, главным образом полиненасыщенных жирных кислот, включающий стадии взаимодействия липидов со свободнорадикальными соединениями и образования свободных радикалов липидной природы [1]. Перекисное окисление фосфолипидов биологических мембран играет важную роль в жизнедеятельности живых организмов. Усиление процессов ПОЛ имеет существенное значение в этиологии и патогенезе многих заболеваний и развитии последствий различных экстремальных воздействий [2].

В живых организмах существует сложная система регуляции интенсивности процесса ПОЛ. В норме процессы образования и расходования продуктов ПОЛ хорошо сбалансированы, что определяет их относительно низкое содержание в клетках [1, 2]. При развитии патологического процесса баланс образования и расходования перекисей и других продуктов ПОЛ может нарушаться, метаболиты накапливаются в тканях и биологических жидкостях, что приводит к серьезным нарушениям, в первую очередь, в биологических мембранах [3]. Следствием активизации ПОЛ может быть изменение физико-химических свойств мембранных белков и липидов [2, 3], изменение активности мембранно-связанных ферментов [4], нарушение проницаемости мембран (в т. ч. для протонов и ионов кальция) [3, 4], ионного транспорта (например, угнетение натриевого насоса) [2], уменьшение электрической стабильности липидного бислоя мембран [4]. Активация ПОЛ приводит к изменению структуры липопротеинов сыворотки крови и гиперхолестеринемии, нарушает разнообразные процессы клеточного метаболизма практически на всех уровнях [4, 5].

Активация ПОЛ является общим ключевым фактором, опосредующим повреждение мембранных структур органов и тканей при многих заболеваниях [6]. Процессам ПОЛ принадлежит значительная роль в патогенезе таких заболеваний, как ишемическая болезнь сердца [7], инфаркт миокарда [8], гипертоническая болезнь [9], в заболеваниях воспалительного генеза [10], аллергических состояний [11]. Накопление продуктов ПОЛ в избыточном количестве меняет структуру клеточных мембран, приводит к изменению их функциональной активности, что в конечном итоге ведет к дистрофии, гибели клеток, играя определенную патогенетическую роль в механизме этих заболева-

ний [12]. Усиление перекисного окисления липидов играет немаловажную роль в реализации хрящевой и костной деструкции [13].

В нормальных условиях жизнедеятельности при функционировании живых систем в условиях физиологического оптимума существует про- и антиоксидантное равновесие, которое является важнейшим механизмом окислительного гомеостаза [5, 10]. Любое повреждение структур живой системы сопровождается нарушением этого равновесия в сторону развития окислительного стресса. Однако система антиоксидантной защиты (АОЗ) ограничивает развитие радикальных окислительных процессов, удерживая про- и антиоксидантное равновесие в пределах нормальной реакции [10]. В случае, когда расход антиоксидантов превышает их биосинтез, происходит окислительная деструкция биомембран, клеток, тканей, что ведет к развитию патологического процесса [1, 6].

Одним из важных аспектов изучения патогенеза различных заболеваний является исследование состояния системы ПОЛ-АОЗ. Нарушение стационарного состояния свободнорадикального окисления считается одним из универсальных, неспецифических показателей наличия повреждения и характерно для самых различных заболеваний воспалительной и невоспалительной этиологии. Известно, что основную роль в развитии и поддержании воспалительной реакции в суставе играют иммунные механизмы, при этом направленность и интенсивность иммунологических реакций определяется изменением липидного бислоя клеточных мембран. При наличии предрасполагающих факторов развития воспаления в суставе (генетическая предрасположенность, гормональные перестройки организма, наличие хронической инфекции, предшествующие травмы суставов и др., способствующих возникновению хронического воспаления синовиальной оболочки суставов) происходит стойкое повышение уровня образования свободнорадикальных форм кислорода и, как следствие, возникновение самоподдерживающегося иммунопатологического воспаления в суставах.

**Цель** исследования — сравнительный анализ изменений показателей системы ПОЛ-АОЗ — диенкетоны ($ДК_{233}$), диенконъюгаты ($ДК_{278}$), малоновыйдиальдегид (МДА), витамин А, витамин Е, водо- (ACL) и жирорастворимые (ACW) вещества антиоксидантной направленности — у пациентов с воспалительными и невоспалительными заболеваниями суставов.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 150 пациентов с заболеваниями суставов, при этом были сформированы следующие группы: группа 1 — пациенты с ревматоидным артритом (n = 30); группа 2 — пациенты с реактивным артритом (n = 30); группа 3 — пациенты с псориатическим артритом (n = 30); группа 4 — пациенты с подагрическим артритом (n = 30); группа 5 — пациенты с остеоартрозом (n = 30). Средний возраст пациентов основной группы составил 56,5±4,1 года. Группу сравнения (группа 6) составили 30 практически здоровых лиц. Исследования проводились на базе Научно-исследовательской лаборатории Белорусской медицинской академии последипломного образования. В качестве биологического материала для исследований использовались сыворотка крови (определение МДА, витаминов А и Е, ACL, ACW) и плазма крови (определение содержания $ДК_{233}$ и $ДК_{278}$).

Разделение пациентов на группы с воспалительными и невоспалительными заболеваниями осуществлялось на основании клинико-анамнестических, рентгенологических, инструментальных данных, результатах биохимических исследований (для воспалительных заболеваний СОЭ >30 мм/ч, С-реактивный белок >80 мкг/мл), а также результатов ПЦР-исследований по наличию в соскобах урогенитального тракта и образцах синовиальной жидкости ДНК артритогенных возбудителей *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Borrelia burgdorferi*, *Herpes simplex virus I/II*, *Cytomegalovirus*, *Epstein–Barr virus*.

Все данные, полученные в ходе исследований, вносились в соответствующую компьютерную базу с последующей статистической обработкой при помощи статистического пакета программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.). Для количественных параметров, распределение которых не подчинялось нормальному закону (при использовании критерия Колмогорова–Смирнова), вычислялись медиана Me и (25/75) процентили. Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна–Уитни (U-тест) с целью сравнения величин измерений признака. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p<0,05$ [14].

**Результаты и их обсуждение.** При биохимических исследованиях по изучению содержания в сыворотке и плазме крови пациентов с воспалительными и невоспалительными заболеваниями су-

ставов показателей состояния системы ПОЛ $ДК_{233}$, $ДК_{278}$, МДА было установлено достоверное увеличение содержания данных аналитов по отношению к группе сравнения (рисунок 1).

При сравнении значений уровней $ДК_{233}$ в исследуемых группах пациентов были получены следующие данные: в группе 1 значение Me (25/75 процентили) составило 2,88 (2,75/3,04) усл. ед., в группе 2 — 4,33 (4,09/4,61) усл. ед., в группе 3 — 2,00 (1,73/2,32) усл. ед., в группе 4 — 1,96 (1,76/2,30) усл. ед., в группе 5 — 1,76 (1,65/1,91) усл. ед., в группе 6 — 1,46 (1,37/1,56) усл. ед.

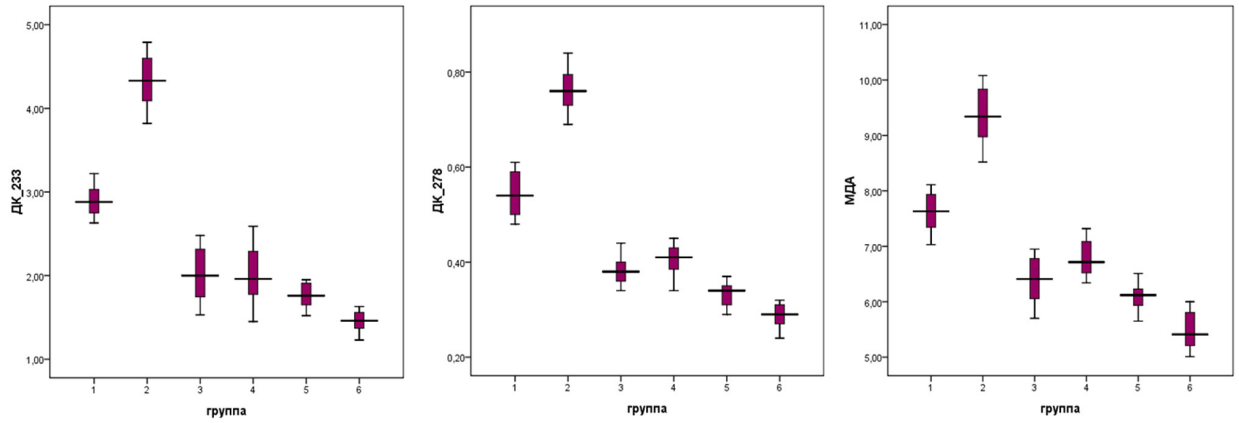



**Рисунок 1. — Концентрационные уровни $ДК_{233}$, $ДК_{278}$, МДА в биологическом материале пациентов основной и группы сравнения**

При проверке гипотезы о достоверности полученных результатов по определению содержания $ДК_{233}$ с использованием критерия Манна–Уитни было установлено следующее: для групп 1–2 Z = -7,580, p = 0,000; для групп 1–3 Z = -7,700, p = 0,000; для групп 1–4 Z = -7,700, p = 0,000; для групп 1–5 Z = -7,701, p = 0,000; для групп 1–6 Z = -7,700, p = 0,000; для групп 2–3 Z = -7,700, p = 0,000; для групп 2–4 Z = -7,700, p = 0,000; для групп 2–5 Z = -7,700, p = 0,000; для групп 2–6 Z = -7,700, p = 0,000; для групп 3–5 Z = -3,985, p = 0,000; для групп 3–6 Z = -7,532, p = 0,000; для групп 4–5 Z = -3,331, p = 0,001; для групп 4–6 Z = -7,003, p = 0,000; для групп 5–6 Z = -7,288, p = 0,000. Полученные данные свидетельствуют о достоверно значимых различиях по данному показатели среди обследуемых групп пациентов за исключением групп 3–4, для которых Z = -0,236, p = 0,814, что свидетельствует о недостоверности различий.

Аналогичные данные, свидетельствующие об усилении процессов ПОЛ, были поучены относительно $ДК_{278}$ и МДА. При этом относительное содержание $ДК_{278}$ в плазме крови составило Me 0,54 (0,50/0,59) усл. ед. для группы 1; 0,76 (0,73/0,80) усл. ед. — для группы 2; 0,38 (0,36/0,40) усл. ед. — для группы 3; 0,41 (0,38/0,43) усл. ед. — для группы 4; 0,34 (0,31/0,35) усл. ед. — для группы 5; 0,29 (0,27/0,31) усл. ед. — для группы 6. Для показателя МДА значение Me в группе 1 составило 7,63 (7,34/7,94) мкмоль/л, в группе 2 — 9,34 (8,96/9,87) мкмоль/л, в группе 3 — 6,41 (6,02/6,80) мкмоль/л, в группе 4 — 6,72 (6,52/7,11) мкмоль/л, в группе 5 — 6,12 (5,92/6,23) мкмоль/л, в группе 6 — 5,41 (5,21/5,81) мкмоль/л. Проверка гипотезы о достоверности различий по показателям $ДК_{278}$ и МДА с использованием критерия Манна–Уитни (Z, p) указывает на наличие достоверно значимых различий во всех указанных группах.

При изучении показателей системы АОЗ — витамин А, витамин Е, ACL, ACW — было установлено угнетение процессов восстановления продуктов ПОЛ у пациентов с воспалительными и невоспалительными заболеваниями суставов.

При сравнении значений уровней витамина А и витамина Е были получены следующие данные: в группе 1 значения Me составили 0,87 (0,75/0,95) и 8,75 (8,36/9,02) мкмоль/л; в группе 2 — 0,63 (0,41/0,78) и 6,20 (5,88/6,55) мкмоль/л; в группе 3 — 1,10 (0,98/1,24) и 10,18 (9,91/10,65) мкмоль/л; в группе 4 — 1,09 (1,01/1,18) и 10,03 (9,63/10,42) мкмоль/л; в группе 5 — 1,25 (1,16/1,32) и 11,82 (11,50/12,25) мкмоль/л; в группе 6 — 1,40 (1,28/1,49) и 12,63 (12,33/12,86) мкмоль/л соответственно (рисунок 2).

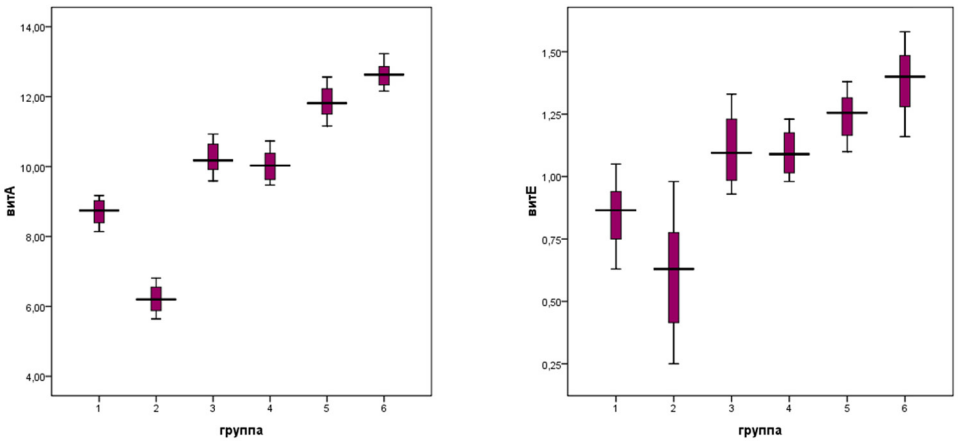



**Рисунок 2. — Концентрационные уровни витаминов А и Е в биологическом материале пациентов основной и группы сравнения**

При определении достоверности по показателю витамин А между группами 1–2, 1–3, 1–4, 2–3, 2–4, 2–5, 2–6, 3–5, 3–6, 4–5, 4–6 Z = -7,700, p = 0,000; между группами 1–5, 1–6 Z = -7,699, p = 0,000; между группами 5–6 Z = -6,258, p = 0,000, что свидетельствует о достоверно значимых различиях по данному показатели среди обследуемых групп пациентов. При этом различия не были статистически достоверными между группами 3–4, для которых Z = -2,156, p = 0,031.

Статистический анализ для доказательства достоверности различий по показателю витамин Е установил наличие достоверных различий между следующими группами пациентов: для групп 1–2 Z = -4,921, p = 0,000; для групп 1–3 Z = -6,625, p = 0,000; для групп 1–4 Z = -7,083, p = 0,000; для групп 1–5 Z = -7,702, p = 0,000; для групп 1–6 Z = -7,701, p = 0,000; для групп 2–3 Z = -7,450, p = 0,000; для групп 2–4 Z = -7,691, p = 0,000; для групп 2–5 Z = -7,700, p = 0,000; для групп 2–6 Z = -7,700, p = 0,000; для групп 3–5 Z = -4,280, p = 0,000; для групп 3–6 Z = -6,286, p = 0,000; для групп 4–5 Z = -5,823, p = 0,001; для групп 4–6 Z = -7,370, p = 0,000; для групп 5–6 Z = -4,549, p = 0,000. Недостоверность различий была установлена для групп 3–4, что подтверждается значениями Z = -0,284, p = 0,776.

Сравнение уровней ACL и ACW в сыворотке крови пациентов с воспалительными и невоспалительными заболеваниями суставов позволило установить достоверное (p<0,05) снижение данных показателей относительно группы сравнения, при этом значения Me в группе 1 составили 9,61 (9,31/9,84) и 7,65 (7,39/7,85) мкмоль/л; в группе 2 — 6,54 (6,25/7,19) и 4,90 (4,72/5,12) мкмоль/л; в группе 3 — 12,96 (12,68/13,34) и 9,21 (8,94/9,30) мкмоль/л; в группе 4 — 12,92 (12,73/13,26) и 8,99 (8,84/9,19) мкмоль/л; в группе 5 — 14,91 (14,55/15,29) и 9,96 (9,74/10,36) мкмоль/л; в группе 6 — 16,49 (16,20/16,76) и 10,93 (10,67/11,29) мкмоль/л соответственно (рисунок 3).

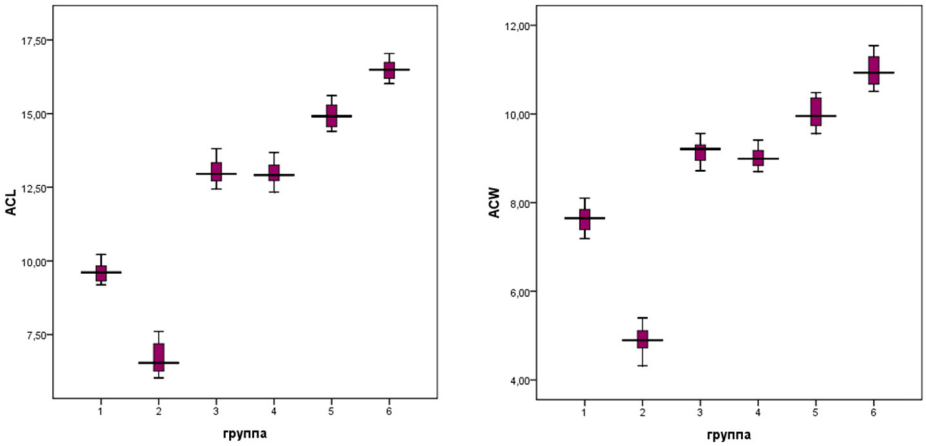



**Рисунок 3. — Концентрационные уровни ACL и ACW в биологическом материале пациентов основной и группе сравнения**

При проверке гипотезы о достоверности различий показателей ACL и ACW с использованием критерия Манна–Уитни между группами пациентов было установлено следующее: для групп 1–2 Z = -7,701, p = 0,000 и Z = -7,700, p = 0,000; для групп 1–3 Z = -7,700, p = 0,000 и Z = -7,699, p = 0,000; для групп 1–4 Z = -7,700, p = 0,000 и Z = -7,699, p = 0,000; для групп 1–5 Z = -7,70, p = 0,000 и Z = -7,700, p = 0,000; для групп 1–6 Z = -7,701, p = 0,000 и Z = -7,699, p = 0,000; для групп 2–3 Z = -7,699, p = 0,000 и Z = -7,700, p = 0,000; для групп 2–4 Z = -7,699, p = 0,000 и Z = -7,700, p = 0,000; для групп 2–5 Z = -7,699, p = 0,000 и Z = -7,700, p = 0,000; для групп 2–6 Z = -7,700, p = 0,000 и Z = -7,700, p = 0,000; для групп 3–5 Z = -7,699, p = 0,000 и Z = -7,695, p = 0,000; для групп 3–6 Z = -7,700, p = 0,000 и Z = -7,699, p = 0,000; для групп 4–5 Z = -7,699, p = 0,000 и Z = -7,700, p = 0,000; для групп 4–6 Z = -7,700, p = 0,000 и Z = -7,700, p = 0,000; для групп 5–6 Z = -7,700, p = 0,000 и Z = -7,700, p = 0,000 соответственно. При этом для групп 3–4 относительно показателя ACW Z = -2,334, p = 0,020, а в отношении показателя ACL Z = -0,765, p = 0,444, что свидетельствует о недостоверности различий между данными группами относительно показателя ACL.

На следующем этапе проводился расчет индексов окислительности, отражающих степень насыщения макроорганизма основными антиоксидантами. В качестве расчетных индексов использовались соотношения $ДК_{233}$/витамин А, $ДК_{278}$/витамин А, $ДК_{233}$/витамин Е, $ДК_{278}$/витамин Е (рисунок 4).

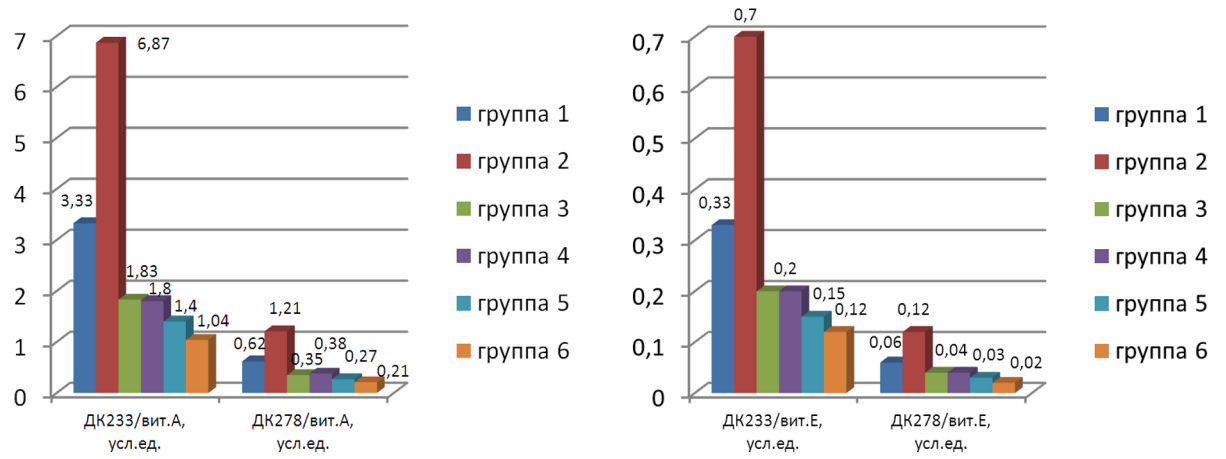



**Рисунок 4. — Индексы окислительности в биологическом материале пациентов основной и группы сравнения**

Статистический анализ с использованием критерия Манна–Уитни позволил установить достоверные различия по всем исследуемым индексам окислительности между группами 1–2, 1–3, 1–4, 1–5, 1–6, 2–3, 2–4, 2–5, 2–6, 3–5, 3–6, 4–5, 4–6, 5–6 (Z = -7,700, p = 0,000). При этом для групп 3–4 было характерно наличие достоверных различий по индексам $ДК_{233}$/витамин А и $ДК_{278}$/витамин А (Z = -7,699, p = 0,000 и Z = -7,700, p = 0,000), тогда как для индексов $ДК_{233}$/витамин Е и $ДК_{278}$/витамин Е статистически значимые достоверные различия отсутствовали (Z = -0,103, p = 0,931).

**Заключение.** Вне зависимости от вида клинико-анатомических признаков (воспалительные или невоспалительные заболевания суставов) патологический процесс, происходящий в пораженном суставе, характеризуется генерализованным, иммунологически обусловленным воспалением с обязательным развитием синовита.

Воспалительный процесс, происходящий в суставе, сопровождается чрезмерной активацией процессов свободно-радикального окисления, что приводит к напряжению механизмов антиоксидантной защиты и развитию окислительного стресса, который может проявляться на клеточном, тканевом и организменном уровнях.

В ходе исследований было показано, что заболевания суставов воспалительной и невоспалительной этиологии характеризуются дисбалансом процессов ПОЛ и АОЗ, при этом наиболее выраженные нарушения в данной системе происходят при реактивных артритах.

Установленные количественные изменения ПОЛ могут в равной степени определять как характер метаболических нарушений, так и их клинико-диагностическое значение при дифференциальной диагностике воспалительных и невоспалительных артропатий.

**Литература**

1.Конторщикова, К.Н. Перекисное окисление в норме и патологии: учебное пособие / К.Н. Конторщикова. — Нижний Новгород, 2000. — 24 с.

2.Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова [и др.]. — М.: Слово, 2006. — 556 с.

3.Горожанская, Э.Г. Свободнорадикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых заболеваниях / Э.Г. Горожанская // Клинич. лаб. диагностика. — 2010. — № 6. — С. 28–41.

4.Зенков, Н.К. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. — М.: Наука, 2001. — 340 с.

5.Дубинина, Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса / Е.Е. Дубинина // Вопр. мед. химии. — 2001. — Т. 47, № 6. — С. 561-581.

6.Шепелев, А.П. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев, И.В. Корниенко, А.В. Шестопалов // Вопр. мед. химии. — 2000. — Т. 46, № 2. — С. 110–116.

7.The impact of serum uric acid on cardiovascular outcomes in the LIFE study / A. Heieggen [et al.] // Kidney Int. — 2004. — Vol. 65, № 3. — P. 1041–1049.

8.Гацуба, С В. Проблемы регуляции кислородтранспортной функции крови в кардиологии / С.В. Гацуба, В.В. Гацуба. — М.: Наука, 2005. — 398 с.

9.Serum uric acid and cardiovascular events in successfully treated hypertensive patients / M.H. Alderman [et al.] // Hypertension. — 2003. — Vol. 34, № 1. — P. 144–150.

10. Трегубова, Н.В. Возрастные изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса при оксидативном стрессе / Н.В. Трегубова, И.С. Исмаилов // Вестн. АПК Ставрополья. — 2012. — № 3. — С. 42–148.

11. Михраилова, З.Т. Состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты организма при аллергическом рините: автореф. дис. ... канд. мед. наук / З.Т. Михраилова. — СПб., 2014. — 28 с.

12. Active defense under oxidative stress. The antioxidant responsive element / V.V. Lyakhovich [et al.] // Bio Prot. Network. — 2008. — Vol. 29, № 1. — P. 14–18.

13. Banfi, G. Oxidative stress, free radicals and bone remodeling / G. Banfi, E.L. Iorio, M.M. Corsi // Clin. Chem. Lab. Med. — 2008. — Vol. 46. — P. 1550–1555.

14. Наследов, А.Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных / А.Д. Наследов. — СПб.: Питер, 2008. — 416 с.

## STUDYING OF SEPARATE BIOCHEMICAL INDICATORS OF INFLAMMATORY AND NONINFLAMMATORY JOINT DISEASES

*Poluyan O.S., Kostiuk S.A., Yuraha T.M.*

*State Educational Institution "Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education", Minsk, Republic of Belarus*

Research is devoted to studying of lipid peroxidation processes and antioxidant system at 150 patients with inflammatory and noninflammatory joints diseases. The analysis of the received results testifies to deep violations in lipid peroxidation system that is confirmed by reliable increase in its products, in particular, of diyenketon, ditenkonjyugat, malonicdialdehyde. Thus intensity of processes of a lipoperoksidation depends on the etiologic agent of the disease — so at reactive arthritis the most expressed changes of system "lipid peroxidation – antioxidant system" are observed. It is important to note that the intensification of processes of a lipoperoksidation in patients with joint diseases is followed by essential oppression of activity of antioxidants: vitamin A, E, water-soluble and fat-soluble substances of an antioxidant orientation. Increase of lipid peroxidation activity in an organism of patients with various etiology joint diseases probably is one of pathogenetic links and demands carrying out the pharmacological correction of the specified states.

**Keywords:** joint diseases, lipids peroxidation, antioxidant system, vitamin A, vitamin E.

Поступила 10.09.2015

# ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СООТНОШЕНИЯ МАРКЕРОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛЫМИ КОГНИТИВНЫМИ РАСТРОЙСТВАМИ И ПСИХОНЕВРОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

*Асташонок А.Н.[1], Докукина Т.В.[2], Рубаник Л.В.[1], Полещук Н.Н.[1]*

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

*[2]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Исследованы образцы плазмы крови 45 пациентов с различными когнитивными нарушениями и психоневрологическими заболеваниями, находившихся на лечении в РНПЦ психического здоровья (Минск, РБ). Методом иммуноферментного анализа выявлены различия в количественном соотношении маркеров нейродегенерации (амилоиды — Аβ40, Аβ42, фосфорилированный тау-белок) у пациентов с шизофренией, эпилептическими припадками и аутизмом. Установлены критерии патологического процесса, которые могут являться маркерами развития и прогрессирования данных заболеваний.

**Ключевые слова:** амилоидные белки, тау-белок, психоневрологические заболевания, детекция.

**Введение.** Высокая частота распространенности и серьезные социальные последствия когнитивных нарушений позволяют рассматривать их в качестве актуальной общемедицинской проблемы. Спектр заболеваний, при которых наблюдается та или иная степень выраженности когнитивных расстройств, довольно широк: от болезни Альцгеймера (БА), выявляемой в пожилом и старческом возрасте, до тяжелых поражений ЦНС — шизофрения, эпилепсия, аутизм и т. д., затрагивающих нередко лиц молодого возраста [1].

Известно, что в патогенезе многих нейродегенеративных заболеваний огромное значение принадлежит дисфункции гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и выходу специфических антигенов (маркеров) в кровяное русло. Наиболее изученными из них являются: белок S-100, глиальный фибриллярный кислый белок, нейронспецифическая енолаза, рецепторы системы глутаматергической нейротрансмиссии (NMDA) и т. д. [1] Показано, что увеличение количественных показателей этих маркеров в сыворотке крови может свидетельствовать о повышении сосудистой проницаемости, реактивном астроглиозе, окислительном стрессе [1]. В ряде зарубежных клинических и научно-исследовательских центрах количественная оценка некоторых выделяемых из ликвора, плазмы или сыворотки крови нейроспецифических антигенов (амилоидные пептиды Аβ40, Аβ42, фосфорилированный тау-белок) используется в рутинной лабораторной практике для дифференциальной диагностики БА [2]. В отношении других социально значимых тяжелых психических и нейродегенеративных нарушений, таких как шизофрения, эпилепсия, судорожный синдром, умственная отсталость и нарушение речи, точные критерии ранней диагностики до настоящего времени отсутствуют. В этой связи актуальным является поиск чувствительных клинических, генетических, биохимических маркеров при этих тяжелых расстройствах с целью этиопатогенетической терапии и коррекции лечения в процессе наблюдения.

**Цель** исследования — характеристика количественных показателей соотношения маркеров нейродегенерации (Аβ40, Аβ42, фосфорилированный тау-белок) у пациентов с тяжелыми психоневрологическими заболеваниями.

**Материалы и методы.** В исследование включены 45 пациентов с различными когнитивными нарушениями. Выделено три группы: 1-я — 20 пациентов (шизофрения и шизоаффективное расстройство, рубрики F20.0, F25.2); 2-я — 16 пациентов (эпилепсия, рубрика G40.0); 3-я — 9 пациентов (аутизм, рубрики F84.0, F84.1). Возраст пациентов варьировал: 1-я группа — 39,2±15,3 года, [16; 66], соотношение мужчин и женщин — 1:4; 2-я группа — 32,4±9,5 года, [22; 42], соотношение — 2:1); 3-я группа — 7,6±4,5 года, [6; 21], 9 мальчиков).

Группу сравнения составили 10 психически здоровых лиц без отягощенной наследственности и какой-либо соматической патологии. Средний возраст — 30,2±3,3 года, среди них 7 мужчин и 3 женщины.

Пациентам из 1 и 2-й групп проводилось предварительное клиническое исследование, тестирование с использованием количественных нейропсихологических шкал (шкала PANSS, SAS — шка-

ла оценки экстрапирамидных расстройств) и количественная оценка эмоционально-аффективных и поведенческих нарушений.

Для серологического исследования забирались образцы крови из локтевой вены. Сыворотку крови получали сразу после взятия путем центрифугирования при 3000 оборотов течение 15 мин. Надосадочную жидкость отделяли и хранили до использования при -20ºС.

Для получения плазмы в центрифужную пробирку вносили 50 мг ЭДТА или 50 мкл гепарина (5000 МЕ/мл). Образцы крови перемешивали с антикоагулянтом, охлаждали при +4ºС в течение 15 мин и центрифугировали при 3000 оборотов в течение 10–15 мин. Надосадочную жидкость переносили в отдельные пробирки и подвергали глубокой заморозке (-80ºС) до использования.

Определение уровня биомаркеров нейродегенерации (амилоидные белки — Аβ40, Аβ42, фосфорилированный тау-белок) в сыворотке/плазме крови осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест систем: тау-белок, тест-система Human Tau [pT181] phosphoELISATM Kit, KHO0631); амилоид Аβ40 (Аβ40 Elisa Kit, KHB3481); амилоид Аβ42 (Аβ42 Elisa Kit, KHB3441). Учет результатов проводили согласно инструкциям фирмы-изготовителя.

**Результаты и их обсуждение.** Проведен анализ количественного соотношения маркеров нейродегенерации (Аβ40, Аβ42, фосфорилированный тау-белок) в образцах плазмы крови в выбранных группах пациентов. В 1-й экспериментальной группе амилоидные белки Аβ40 и Аβ42 не были обнаружены ни у одного из обследованных. Другой маркер, фосфорилированный тау-белок, в количестве 15,6 пг/мл выявлен у 8 пациентов в возрасте от 26 до 32 лет. У пациентов F20.0 старшей возрастной группы (от 42 до 73 лет) в плазме крови тау-белок вообще не выявлялся. Полученные результаты свидетельствовали о различиях в профиле экспрессии тау-белка у пациентов с ранним и поздним началом шизофрении.

Во 2-й экспериментальной группе (G40.0) выявлены вариации в количественном соотношении в плазме крови амилоидного пептида Аβ40. В возрастной группе 28–39 лет Аβ40 определялся в концентрациях от 13,8 до 38 пг/мл. В то же время ни у одного из обследованных лиц (старше 40 лет) данный белок не был обнаружен. Амилоид Аβ42 также не был выявлен ни в одном из случаев. Тау-белок (концентрация 30 пг/мл) определен только у 1 пациента.

У большинства из обследованных 3-й группы (F84.0) отмечено присутствие одновременно двух маркеров: тау-белок (концентрация 27,4 пг/мл) и амилоид Аβ40 (концентрация от 23 до 138 пг/мл). Результаты количественного определения маркеров нейродегенерации у пациентов всех трех исследованных групп представлены в таблице.

На основании полученных данных впервые на территории Республики Беларусь определены количественные показатели в соотношении маркеров нейродегенерации (Аβ40, Аβ42, фосфорилированный тау-белок), которые могут определять тяжесть течения и вероятно усиливать нейродегенеративный процесс в ЦНС у пациентов с психоневрологическими заболеваниями.

Все сказанное в полной мере относится к шизофрении, всестороннему изучению которой в последнее время уделяется значительное внимание. Шизофрения — это эндогенное прогредиентное психическое заболевание, характеризующееся диссоциацией психических функций и протекающее с обязательным развитием психического дефекта в эмоциально-волевой сфере и разнообразными продуктивными психопатологическими расстройствами. В основе патогенеза этого заболевания лежит нарушение процессов синаптической передачи, приводящее к повреждению нейронов и их дисфункции [1]. Вместе с тем коррекция когнитивных нарушений у пациентов, больных шизофренией, затруднена тем, что этиопатогенез данного заболевания включает в себя множество факторов: наследственные, инфекционные и аутоиммунные [1]. В настоящее время не существует лабораторных методов дифференциальной диагностики шизофрении и других шизоаффективных расстройств. Согласно зарубежным данным в развитии и прогрессировании данного заболевания может участвовать огромный пул сывороточных и экспрессируемых в ЦНС белков: S-100B, REDD1, нейропротекторный пептид ADNP, кальций-связывающие белки (GABA), ферменты обмена глутамата и т. д. [3]. Однако имеются отдельные сообщения о роли фосфорилированной изоформы тау-белка в патогенезе шизофрении. В данной работе показано преимущественное обнаружение тау-белка у пациентов с более ранним началом шизофрении. Полученные данные, вероятно, могут свидетельствовать о зависимости выраженности нейрокогнитивных нарушений при шизофрении от возраста дебюта заболевания.

Таблица — Количественные различия в соотношении маркеров нейродегенерации (Аβ40, Аβ42, тау-белок), выявленные при исследовании плазмы крови пациентов с шизофренией, эпилепсией и аутизмом

| Пациенты/ рубрики согласно МОКБ-10 | Маркеры нейродегенерации | | | Показатели нормы (плазма крови) |
|---|---|---|---|---|
| | Аβ40 | Аβ42 | тау-белок | |
| F20.0 (параноидная шизофрения) | [1]не выявлен<br>[2]не выявлен | [1*]не выявлен | [1]15,6 пг/мл<br>[2]не выявлен | <u>амилоид Аβ40</u><br>(до 40–50 пг/мл)<br><u>амилоид Аβ42</u><br>(0–10 пг/мл)<br><u>тау-белок</u><br>(0–10 пг/мл) |
| F25.2 (шизоаффективное расстройство) | ^80 пг/мл | [1*]не выявлен | ^14,2 пг/мл | |
| G40.0 (эпилепсия) | ^^13,8–31,25 пг/мл | [1*]не выявлен | ^^не выявлен<br>*30 пг/мл | |
| F84.0, F84.1 (аутизм) | **138 пг/мл<br>***72,5 пг/мл<br>****23 пг/мл | [1*]не выявлен | **не выявлен<br>***27,4 пг/мл;<br>****27,4 пг/мл | |

Примечания:
1 — [1] — возрастная структура (26–32 года).
2 — [1*] — во всех исследованных группах.
3 — [2] — возрастная структура (26–32 года).
4 — ^ — возрастная группа (25 лет).
5 — ^^ — возрастная группа (28–39 лет).
6 — * — выявлен только в 1 случае (возраст 33 года).
7 — ** — возрастная группа (6 лет).
8 — *** — возрастная группа (9 лет).
9 — **** — возрастная группа (13 лет).

Исследованы количественные показатели соотношения маркеров нейродегенерации у пациентов с эпилепсией. Согласно современной терминологии эпилепсия — хроническое полиэтиологическое заболевание, проявляющееся судорожными и другими припадками, психическими расстройствами и характерными изменениями личности. Большинство работ придают приоритетное значение роли наследственного фактора в этиологии эпилепсии [4]. Приобретенное предрасположение может быть результатом врожденной патологии развития головного мозга, внутриутробного поражения плода, асфиксии в родах, родовой травмы, нейротоксикозов, инфекционной природы [4]. Нами не было выявлено достоверных различий в уровне экспрессии амилоидного пептида Аβ40 у пациентов с эпилепсией. Он колебался от 13,8–31,25 пг/мл и соответствовал нормальным предельно допустимым значениям для плазмы крови. Другой маркер, тау-белок, выявлен только в 1 случае. Согласно современным представлениям в норме существует строго определенный баланс в выделении определенных белков из спинномозговой жидкости и поступлении их в кровяное русло. Тау-белок в норме должен содержаться только в спинномозговой жидкости и его обнаружение в крови может свидетельствовать о посттравматическом синдроме или нейродегенеративном процессе [5, 6].

Особый интерес представляли результаты анализа плазмы крови на маркеры нейродегенерации у пациентов с аутизмом. Аутизм рассматривается как психическое заболевание у детей, сопровождаемое отклонениями в сферах социализации, коммуникации и наличием необычных повторяющихся элементов поведения. Согласно зарубежным данным существует взаимосвязь между генетическими (наличие ломкой Х-хромосомы, инверсии и транслокации участков генома) и иммунологическими факторами (секретируемые белки плазмы — амилоиды Аβ40, Аβ42) [7]. Показано, что уровень экспрессии данных белков отражает степень выраженности нейродегенеративного процесса в ЦНС и определяет тяжесть течения заболевания. В отношении других маркеров, например, тау-белка, в настоящее время отсутствуют сведения о его влиянии на исход заболевания.

Таким образом, в исследовании показана возможность репрезентативной оценки уровня маркеров нейродегенерации у пациентов с различными формами психоневрологических заболеваний, что важно для получения более полной информации о глубине имеющихся у них расстройств в нейроглиальном комплексе ЦНС. Это предоставляет дополнительную информацию о возможной лока-

лизации патологического процесса и глубине дистрофии. С практической точки зрения эти данные важны для определения прогноза нейропсихологического статуса пациента и последующего динамического контроля лечения и эффективности использования лекарственных средств.

**Заключение.** В плазме крови пациентов с тяжелыми психоневрологическими заболеваниями определены маркеры амилоидоза — Аβ40, Аβ42 и фосфорилированный тау-белок. Показана вариабельность количественного соотношения амилоида Аβ40 у пациентов с шизофренией, эпилепсией и аутизмом. Тау-белок выявлен только в группе пациентов с ранним дебютом шизофрении и в 1 случае у пациента с эпилепсией, что свидетельствует о различных механизмах повреждения клеток-мишеней в ЦНС. Полученные результаты важны как для совершенствования методов дифференциальной диагностики, так и разработки тактики патогенетической терапии.

**Литература**

1. Beal, M.F. Neurodegenerative Diseases / M F. Beal. — London: Cambridge University Press, 2005. — 985 p.

2. Schneider, P. Biological marker candidates of Alzheimer's disease in blood, plasma and serum / P. Schneider, H. Hampel, K. Buerger // J. Neurosci. Therap. — 2009. — Vol. 15. — P. 358–374.

3. Discovery and development of integrative biological markers for schizophrenia / V. Oertel-Knöchel [et al.] // J. Biol. Markers Neurodegen. Dis. — 2011. — Vol. 95. — P. 686–702.

4. The etiologic classification of epilepsy / S.D. Shorvon [et al.] // J. Epilepsia. — 2011. — Vol. 52. — P. 1052–1057.

5. Tau and Aβ42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: establishment of reference values / M. Sjögren [et al.] // J. Clin. Chem. — 2001. — Vol. 47. — P. 1776–1781.

6. Tau protein as a serum marker of brain damage in mild traumatic brain injury: preliminary results / M. Bulut [et al.] // J. Adv Ther. — 2006. — Vol. 23. — P. 12–22.

7. Современные представления о молекулярной генетике и геномике аутизма / С.Г. Ворсанова [и др.] // Фундамент. исследования. — 2013. — № 4. — С. 356–367.

## VARIABILITY OF QUANTITATIVE MARKERS RATIO OF NEURODEGENERATION IN PATIENTS WITH SEVERE COGNITIVE IMPAIRMENTS AND NEUROPSYCHIATRIC DISORDERS

*Astashonok A.N.[1], Dokukina T.V.[2], Rubanik L.V.[1], Poleschiuk N.N.[1]*

*[1]State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;*

*[2]State Institution "Republican Research & Practical Center for Mental Health", Minsk, Republic of Belarus*

Samples of plasma of the 45 patients (Republican Research & Practical Center for Mental Health, Minsk, Belarus) were studied. Using ELISA method differences in the quantitative ratio of neurodegeneration markers (amyloids — Aβ40, Aβ42; phosphorylated tau protein) revealed in patients with schizophrenia, epilepsy, and autism. The criteria for pathological process that may be the markers of development and progression of these diseases were described.

**Keywords:** amyloid protein, tau protein, neuropsychiatric disease detection.

Поступила 09.09.2015

## ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОЧИЩЕННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G ИЗ МЫШИНОЙ ИММУНОАСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

*Дубков Н.А., Счесленок Е.П., Маханько О.В., Школина Т.В., Семижон П.А., Владыко А.С.*

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

**Реферат.** Отработаны условия очистки иммуноглобулинов G из мышиной иммуноасцитической жидкости двустадийной схемой очистки: преципитацией сульфатом аммония с последующей гель-фильтрацией.

**Ключевые слова:** имуноглобулины G, мышиная иммуноасцитическая жидкость, эксклюзионная хроматография, преципитация белков.

**Введение.** Поликлональные антитела представляют собой важный инструмент лабораторных исследований. Для их получения животных иммунизируют с целью стимулирования у них гуморального иммунного ответа на вводимый антиген. Мажорную фракцию, представляющую наибольший интерес для исследователей, составляют иммуноглобулины G (IgG).

Важным моментом при планировании получения поликлональных антител является выбор животного для иммунизации и места введения антигена. Одним из способов иммунизации животного является интраперитонеальный, или внутрибрюшинный, т. е. введение антигена и адъюванта (стимулятора иммунного ответа) в соответствии с выбранной схемой в брюшную полость животного. Данный способ должен приводить к формированию асцита, т. е. скоплению свободной жидкости в брюшной полости, вызванного притоком транссудата к месту введения [1].

Преимуществом использования асцитической жидкости для получения антител является большое количество производимого иммуноглобулина — иммунизированные мыши производят в среднем 5–10 мл поликлональной асцитической жидкости с концентрацией IgG 2–5 мг/мл, которая, однако, содержит посторонние примеси: большое количество липидов, альбумин, трансферрин, липопротеины, прочие эндогенные белки [2, 3]. Определенные области применения поликлональных антител (для химической модификации флуоресцентными красителями, изотопами; для получения фрагментов IgG) требуют дальнейшей очистки [4].

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. Для очистки IgG может быть использован ряд хроматографических методов: эксклюзионная, аффинная, ионообменная хроматография, а также их комбинации [4].

Разделение белков и других макромолекул при эксклюзионной хроматографии (гель-фильтрации) основано на механизме молекулярного сита: матрицы, используемые в гель-фильтрации, 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. В большинстве случаев гель-фильтрация используется как конечный этап очистки белковых компонентов [3].

Двухстадийная схема очистки иммуноглобулинов (преципитация сульфатом аммония с последующей доочисткой методом эксклюзионной хроматографии), приведенная в данной статье, представляет собой наименее затратный способ получения очищенного препарата IgG.

**Цель** исследования — получение очищенных иммуноглобулинов G из мышиных иммуноасцитических жидкостей.

**Материалы и методы.** В работе использовали мышиные иммуноасцитические жидкости (ИАЖ), содержащие антитела к участкам Fc-фрагментов IgG человека.

*Преципитация* иммуноглобулина из иммуноасцитической жидкости осуществлялась насыщенным раствором сульфата аммония.

*Обессоливание* преципитата осуществлялось методом диализа в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, Sigma) с последующим концентрированием ультрафильтрацией через фильтр Amicon Ultra-4 (Merck Millipore).

Метод *гель-фильтрации* использовали для получения очищенной фракции IgG. Гель-фильтрацию проводили с использованием колонки Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) на автоматическом жидкостном хроматографе AKTA Explorer 10S (GE Healthcare).

Фракции иммуноглобулина анализировали *электрофорезом в полиакриламидном геле* (ПААГ) согласно методу, предложенному Laemmli [5].

Оценку чувствительности и специфичности очищенных антител осуществляли методом *иммуноферментного анализа* (ИФА) относительно нормальной асцитической жидкости белых беспородных мышей [6].

**Результаты и их обсуждение.** В работе использовали мышиные ИАЖ, полученные путем внутрибрюшинной иммунизации белых беспородных мышей рекомбинантным полипептидом, содержащим CH2 и CH3 домены Fc-фрагмента иммуноглобулинов G человека.

Асцитические жидкости отбирали у мышей по мере накопления в период иммунизации и на окончательном этапе при выведении животных из опыта. Отобранные асциты осветляли центрифугированием при 10000×g (4°C) в течение 20 мин, надосадок переносили в новую пробирку и замораживали на -20°C до востребования.

Предварительный этап очистки включал удаление липидов, поскольку их наличие может препятствовать последующему осаждению иммуноглобулинов из раствора сульфатом аммония. Замороженные мышиные асциты размораживали, затем центрифугировали при 10000×g (4°C) 20 мин. В большинстве случаев на поверхности эппендорфов наблюдался слой липидов. Их удаляли добавлением порошка $SiO_2$ из расчета 15 мг/мл [7].

Осаждение иммуноглобулинов из раствора проводили добавлением насыщенного раствора сульфата аммония $(NH_4)_2SO_4$. Принцип осаждения сульфатом аммония основан на «высаливании» белков из раствора. На начальном этапе доводили уровень насыщения до 25% с целью осаждения слаборастворимых белковых примесей. Мышиный IgG при данном уровне насыщения остается в жидкой фазе [3]. Требуемый объем насыщенного раствора сульфата аммония для добавления к образцу определяли по формуле:

$$V_{(\text{сульф. амм.})} = V_{(\text{образца})} \times (S2 - S1) / (1 - S2),$$

где S1 — первоначальная доля сульфата аммония в растворе (0);
S2 — требуемая доля (0,25).

Насыщенный раствор сульфата аммония добавляли по капле при постоянном помешивании, после чего на 3–4 ч оставляли при постоянном помешивании при 4°C. Затем уровень насыщения раствора сульфатом аммония доводили до 45%. Мышиный IgG, согласно данным литературы, осаждается в диапазоне насыщения 40–50% [3]. Меньший уровень насыщения позволяет получить более чистый препарат иммуноглобулина, однако часть молекул остается в растворимой форме. По мере возрастания насыщения возрастает уровень загрязнения преципитата другими белками, в частности альбумином [7]. Осадок ресуспендировали в 500 мкл PBS-буфера (0,01 М фосфатный буфер, 0,0027M KCl, 0,137M NaCl, pH 7,4 при 25°C, Sigma) и вносили в диализную трубку (SERVA) с диметром пор 24Å, позволяющим удерживать белковые молекулы с молекулярной массой свыше 12–14 кДа. Диализ проводили в PBS-буфере (Sigma) в течение суток со сменой буфера при 4°C при постоянном помешивании.

Для подготовки к дальнейшей очистке диализат концентрировали ультрафильтрацией через фильтр Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Device 10K (4000×g, 4°C) до получения конечного объема 200–400 мкл и наносили на колонку для гель-фильтрации. Разделение белковых фракций осуществляли с использованием колонки Superdex 200 (GE Healthcare) с эффективным диапазоном разделения Mr 10000–600000 на автоматическом жидкостном хроматографе ÄKTAexplorer 10S в PBS-буфере (Sigma). Нанесение пробы на колонку и разделение проводили со скоростью 0,5 мл/мин. На всех этапах осуществляли фракционирование и измерение оптической плотности при длине волны 280 нм относительно буфера (рисунок 1).

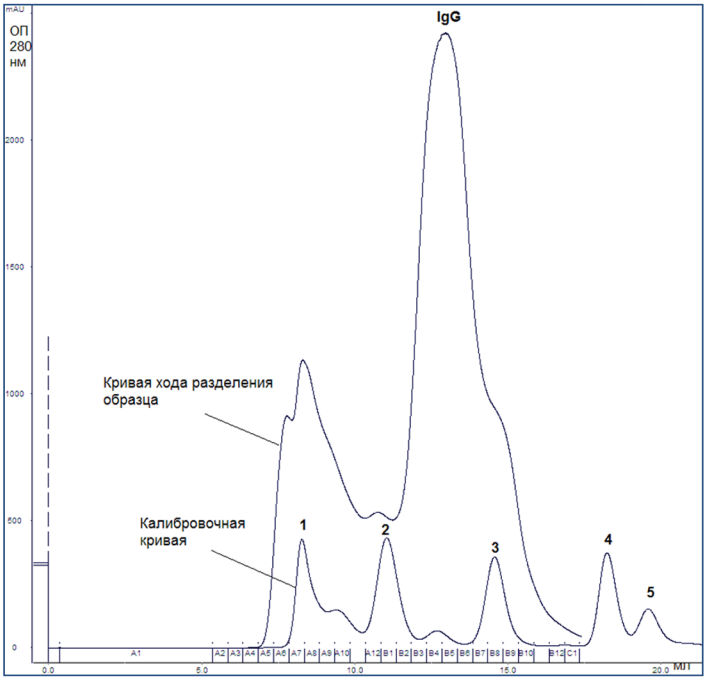
При наложении на хроматограмму калибровочной кривой, полученной для данной колонки, видно, что область повышенной оптической плотности располагается в области между ферритином (440 кДа) и бычим сывороточным альбумином (67 кДа), что позволяет предположить соответствие данного пика области распределения мышиных IgG (150 кДа). Фракции, соответствующие данной области, анализировали электрофорезом в ПААГ (рисунок 2).

Молекулы IgG, как известно, состоят из двух тяжелых и двух легких полипептидных цепей, связанных дисульфидными связями. В результате электрофореза в денатурирующих условиях, при которых разрушаются эти связи, на геле проявляются две полосы с молекулярной массой около 50 (тяжелая цепь) и 22–25 кДа (легкая цепь) [8]. Из рисунка 2 видно, что на дорожках 4 и 5 присутствуют мажорные полосы в областях, соответствующих 50 и 25 кДа, из чего можно сделать вывод, что данные фракции содержат искомый иммуноглобулин, не содержащий примесных белков.

Чувствительность и специфичность препарата очищенных антител к IgG человека оценивалась с помощью непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (рисунок 3). В качестве

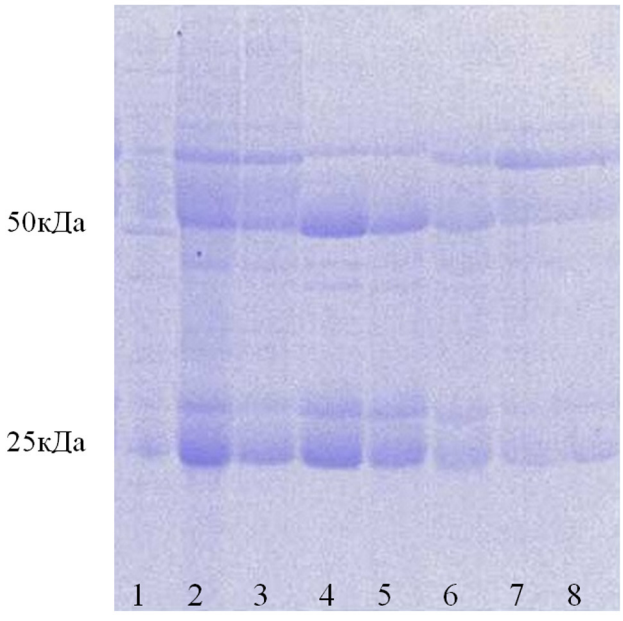
контролей использовались исходная неочищенная иммуноасцитическая жидкость и нормальная асцитическая жидкость неиммунизированного животного.

Результаты титрования показали, что препарат очищенного IgG не теряет своей специфичности, а его чувствительность выше, чем у IgG в неочищенной иммуноасцитической жидкости.



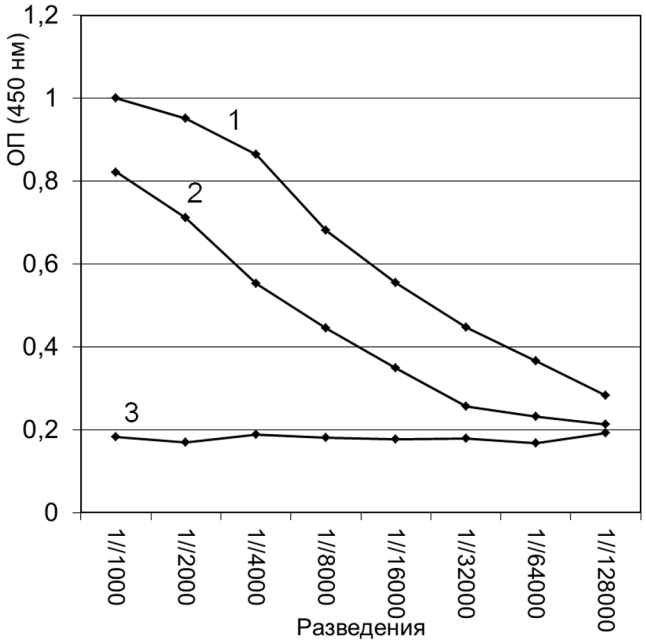

1 — тироглобулин (669 кДа); 2 — ферритин (440 кДа); 3 — бычий сывороточный альбумин (67 кДа); 4 — цитохром С (13,6 кДа); 5 — апротинин (6,5 кДа)

**Рисунок 1. — Спектрофотометрический анализ хода гель-фильтрации мышиной ИАЖ**




1 — маркер молекулярной массы; 2, 3 — образец для нанесения на колонку (разведения 1:10 и 1:20 соответственно); 4–8 — фракции элюции при гель-фильтрации иммуноглобулинов

**Рисунок 2. — Электрофоретический анализ фракций элюции иммуноглобулинов из ИАЖ гель-фильтрацией**




1 — препарат очищенных IgG; 2 — исходная ИАЖ; 3 — нормальная асцитическая жидкость

**Рисунок 3. — Титрование иммуноглобулиновой фракции, выделенной из мышиной ИАЖ, специфичной к IgG человека**

**Заключение.** Таким образом, использование двустадийной схемы очистки иммуноглобулинов G из мышиных асцитов преципитацией сульфатом аммония и гель-фильтрацией позволило нам получить очищенный препарат иммуноглобулинов G, специфичный в отношении человеческого иммуноглобулина G.

**Литература**

1. Hendriksen, C. Production of polyclonal and monoclonal antibodies / C. Hendriksen, J. Hau // Handbook of Laboratory Animal Science / Eds. J. Hau, G.L. Van Hoosier. — 2nd ed. — CRC Press LLC, 2001. — Vol. I : Essential Principles and Practices. — 271 p.

2. Burns, R. Antibody production / R. Burns // The Protein Protocols Handbook / Ed. J.M. Walker. — 3rd ed. — Humana Press, 2009. — 1985 p.

3. Grodzki, A.K. Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration / A.K. Grodzki, E. Berenstein // Immunocytochemical Methods and Protocols // Eds. C. Oliver, M.C. Jamur. — 3rd ed. — Humana Press, 2010. — 416 p.

4. Grodzki, A.K. Introduction to the purification of antibodies / A.K. Grodzki, E. Berenstein // Immunocytochemical Methods and Protocols // Eds. by C. Oliver, M.C. Jamur. — 3rd ed. — Humana Press, 2010. — 416 p.

5. 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.

6. Антитела. Методы: Кн. 2 / А. Брэдуэлл [и др.]; ред. Д. Кэтти. — М.: Мир, 1991 — 382 с.

7. Page, M. Purification of IgG by precipitation with sodium sulfate or ammonium sulfate / M. Page, R. Thorpe // The Protein Protocols Handbook / Ed. J.M. Walker. — 3rd ed. — Humana Press, 2009. — 1985 p.

8. Page, M. Analysis of IgG fractions by electrophoresis / M. Page, R. Thorpe // The Protein Protocols Handbook / Ed. J.M. Walker. — 3rd ed. — Humana Press, 2009. — 1985 p.

## USE OF SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY TO OBTAIN PURIFIED IMMUNOGLOBULINS G FROM MURINE ASCITIC FLUID

*Dubkov N.A., Scheslenok E.P., Makhanko O.V., Shkolina T.V., Semizhon P.A., Vladyko A.S.*
*State Institution "Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

Conditions for the purification of immunoglobulin G from murine ascitic fluid, specific to human immunoglobulin G, have been developed. The two-stage scheme consists of ammonium sulfate precipitation followed by gel-filtration. It allowed obtain purified sample of murine IgG with higher sensitivity against its antigen in comparison to initial unpurified ascitic fluid.

**Keywords:** immunoglobulin G, murine ascitic fluid, size-exclusion chromatography, protein precipitation.

Поступила 17.09.2015

## ПОЛУЧЕНИЕ МЫШИНЫХ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К РЕКОМБИНАНТНОМУ БЕЛКУ, ВКЛЮЧАЮЩЕМУ CH2 И CH3 ДОМЕНЫ Fc-ФРАГМЕНТА IgG ЧЕЛОВЕКА

*Маханько О.В., Семижон П.А., Фомина Е.Г., Счесленок Е.П., Дубков Н.А., Владыко А.С.*
*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Получены поликлональные антитела к рекомбинантному белку, включающему CH2 и CH3 домены Fc-фрагмента иммуноглобулина человека класса G, у беспородных мышей. Разработана оптимальная схема иммунизации. Введением физиологического раствора с антигеном или без него в эмульсии с полным адъювантом Фрейнда в соотношении 1:9 внутрибрюшинно было индуцировано образование асцитов. Титр отдельных асцитов достигал значения 1/65000.

**Ключевые слова:** антивидовые иммуноглобулины, рекомбинантный белок, схема иммунизации, адъювант Фрейнда, твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА).

**Введение.** Содержание специфических иммуноглобулинов классов G и M в крови человека является важным диагностическим признаком при многих инфекционных заболеваниях [1]. Одним из важных компонентов иммуноферментных диагностических тест-систем, использующихся для определения специфических иммуноглобулинов G и M, является антивидовой иммуноглобулин. Он широко используется как в виде меченого ферментами, так и меченого другими компонентами (например, флуорохромами и т. д.) препарата. Антивидовые антитела получают при иммунизации лабораторных животных препаратами иммуноглобулинов человека [2]. При иммунизации уделяют внимание выбору животных, их содержанию, правилам проведения лабораторных манипуляций, подготовке антигена, выбору адъюванта, схемы иммунизации, дозы и способа введения антигена и т. д. [3].

Обычно для получения препаратов антивидовых антител в качестве иммуногенов выступают иммуноглобулины, полученные фракционированием человеческих сывороток крови хроматографическими методами [4]. Использование в качестве антигена рекомбинантных полипептидов отдельных высокоиммуногенных участков Fc-фрагментов антител человека позволяет максимально исключить примеси посторонних белков и неспецифические реакции.

**Цель** исследования — разработка схемы иммунизации мышей к рекомбинантным белкам Fc-фрагмента иммуноглобулина человека класса G, получение и характеристика антивидовых иммуноглобулинов.

**Материалы и методы.** *Антиген:* рекомбинантный белок, включающий CH2 и CH3 фрагменты тяжелых цепей иммуноглобулина человека класса G, получен в экспрессирующей системе *E. coli* (штамм BL21 с рекомбинантной плазмидой pJC40-2 IGG1).

*Иммунизация лабораторных животных:* для иммунизации использовались самки беспородных мышей возрастом 8 недель, по 7–10 мышей на эксперимент. Содержание животных и лабора-

торные опыты проводились в соответствии с регламентирующими документами, обеспечивающими гуманное отношение к животным. Асциты отбирались по мере образования и на заключительном этапе при выведении животных из опыта (не более 2 раз у одной мыши).

*Проведение ТИФА:* полистерольные планшеты фирмы Greiner (Германия) сенсибилизировались коммерческим препаратом IgG человека (0,2 мкг/лунку). Для визуализации связавшихся специфических иммуноглобулинов использовался козий антимышиный конъюгат, меченый пероксидазой хрена, и субстрат-хромогенная смесь, содержащая перекись водорода и тетраметилбензидин. В качестве контроля использовалась нормальная асцитическая жидкость. Для сравнения анализировались также коммерческие античеловеческие мышиные антитела (Invitrogen). За титр антисыворотки (асцита) принимали величину, обратную ее разведению, которое дает в ТИФА значение оптической плотности (ОП), превышающее среднее значение в контроле на 0,1 ед. оптической плотности ($ОП_{крит.}$ = 0,3 о.е.).

**Результаты и их обсуждение.** В связи с необходимостью получения большого количества специфических иммуноглобулинов было индуцировано образование у мышей иммуноасцитических жидкостей. Это достигалось внутрибрюшинным введением восьминедельным самкам взвеси очищенного белка в физрастворе, эмульгированном в полном адъюванте Фрейнда (ПАФ), в соотношении 1:9 (в объеме 0,2 мл) в соответствии с рекомендациями A.S. Tung с соавт. [5]. До начала индукции образования асцитов была проведена иммунизация и один этап реиммунизации подкожным введением взвеси белка в физрастворе в область холки, эмульгированного в полном и неполном адъюванте Фрейнда, соответственно в соотношении 1:1 в объеме 0,1 мл. Далее после двух внутрибрюшинных инъекций с антигеном дважды вводилась эмульсия физраствора с ПАФ без антигена с целью продолжения образования асцитов у иммунизированных животных.

При экспрессии рекомбинантных белков в прокариотических системах чужеродные для бактерий пептиды нередко образуются в агрегированном состоянии в виде т. н. «телец включения» (inclusive bodies). Это зачастую рассматривается как нежелательное явление, т. к. затрудняет получение белков в растворимой, биологически активной форме.

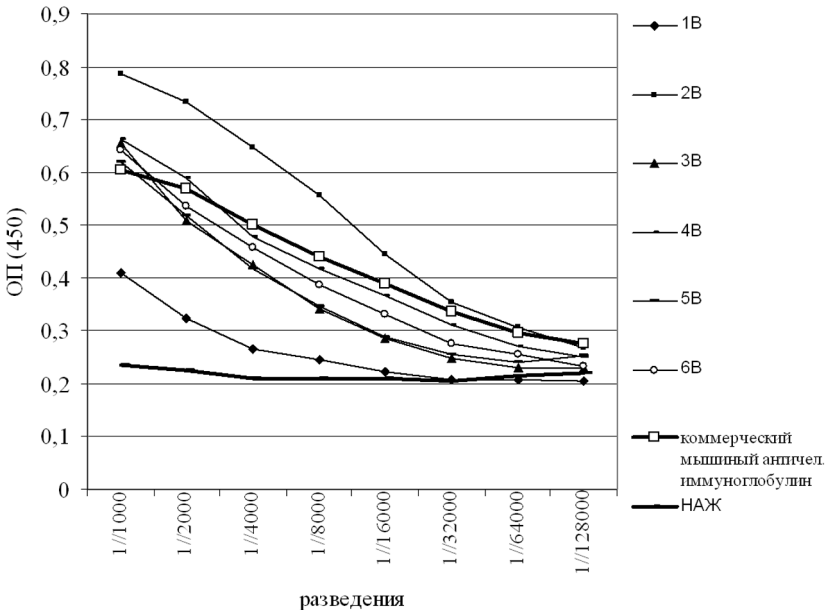
Тем не менее S. Hermeling с соавт. показали, что при введении рекомбинантного человеческого интерферона alpha2b мышам в агрегированном состоянии наблюдалось повышение его иммуногенности в сравнении с растворимой формой этого белка [6]. Поэтому в наших исследованиях антиген вводился лабораторным животным в виде взвеси телец включения в физиологическом растворе. Тельца включения были выделены и очищены двумя циклами обработки ультразвуком (4 раза при 20 КГц по 20 с) с последующим удалением бактериальных белков вместе с надосадком после центрифугирования при 6000 g по методике S.M. Singh и A.K. Panda с модификациями [7].

Разработаны три схемы иммунизации. Две из них различались распределением доз антигена в течение опыта (в общей сложности 4 введения с шагом в 10 мкг): 1) в «восходящей» схеме количество вводимого белка возрастало от 10 до 40 мкг на мышь; 2) в «нисходящей» — снижалось с 40 до 10 мкг. Интервал между инъекциями составлял 1–2 недели, общая продолжительность иммунизации — 49 дней.

По результатам оценки эффективности двух схем разработана третья схема, в основу которой взят «восходящий» вариант со следующими изменениями: время иммунизации увеличено с 49 до 56 дней, при 3 и 4-й реиммунизации белок вводился в растворимой форме в физрастворе с 0,15%-м додецилсульфатом натрия (SDS) подкожно в холку без адъюванта. Эмульсия физраствора в ПАФ (в соотношении 1:9 ) без антигена вводилась в виде второй инъекции внутрибрюшинно. Инъекции эмульсии в ПАФ с одновременным введением антигена подкожно чередовались с инъекциями без введения антигена (в общей сложности 5 раз).

Эффективность иммунизации оценивалась на основании определения титров антител с помощью непрямого твердофазного иммуноферментного анализа. Специфичность полученных антител к коммерческому препарату иммуноглобулинов G человека отражена на рисунке на примере схемы № 2.

Результаты по титрованию асцитов в ТИФА приведены в таблице.




1В–6В — иммуноасцитические жидкости мышей «восходящей» схемы; НАЖ — нормальная асцитическая жидкость (контроль); ОП — оптическая плотность

**Рисунок — Титрование мышиных антител, полученных к рекомбинантным полипептидам иммуноглобулинов человека IgG (схема № 2, «восходящая»)**

Таблица — Титрование мышиных антител, полученных к рекомбинантным полипептидам иммуноглобулинов человека IgG

| Титры | Количество образцов асцитов (объем, мл) | | |
|---|---|---|---|
| | схема № 1, «нисходящая», 7 мышей | схема № 2, «восходящая», 7 мышей | схема № 3, «восходящая», введение антигена в 0,15% SDS, 10 мышей |
| До 1/5000 | 0 (0) | 1 (5,5) | 5 (34,5) |
| 1/5000–1/15000 | 5 (23) | 3 (11) | 5 (34) |
| 1/15000–1/25000 | 5 (17,5) | 1 (2) | 0 (0) |
| 1/25000–1/65000 | 0 (0) | 2 (3) | 1 (5,5) |

Образование асцитов у мышей «нисходящей» схемы (№ 1) наблюдалось, начиная с 35-го дня иммунизации, у мышей, иммунизированных по схемам №№ 2 и 3 — с 42-го дня. За весь период иммунизации от 7 опытных животных «нисходящей» схемы отобрано 10 асцитов с титрами от 1/8000 до 1/20000 (в общей сложности 40,5 мл), от 7 мышей «восходящей» схемы — 6 асцитов с титрами от 1/3000 до 1/65000 (21,5 мл). От 10 мышей схемы № 3 получено 11 асцитов с титрами от 1/1500 до 1/55000 (74 мл).

При сравнении схем №№ 1 и 2 отмечено, что при иммунизации по «нисходящей» схеме половина полученных образцов асцитов имели титр 1/15000–1/25000 (объемом 17,5 мл), в то время как в «восходящей» схеме только один образец имел титр в этом диапазоне. Общий объем асцитов был в 2 раза меньше, чем в «нисходящей». Однако при реализации этой схемы получены две иммуноасцитические жидкости с самым высоким титром — 1/32000 и 1/65000 объемом 3 мл. Это является решающим фактором при выборе оптимальной схемы иммунизации, поскольку позволяет получить более качественный и концентрированный препарат специфических иммуноглобулинов при наименьших затратах на этапах очистки и конъюгации с ферментом.

При сравнении результатов иммунизации по схемам №№ 3 и 2 наблюдались сходные тенденции, однако в целом титры схемы № 3 были несколько ниже. Вероятно, это было связано с тем, что 3 и 4-я иммунизация проведена растворимым белком, иммуногенность которого уступает иммуногенности агрегированного. Увеличение объема полученных асцитов может быть связано с увеличением количества внутрибрюшинных инъекций ПАФ с 4 до 5 на фоне более щадящей нагрузки на животных по причине разнесения сайтов и времени инъекций антигена и эмульсии ПАФ с физраствором.

**Заключение.** В результате исследований получены мышиные имуноглобулины с высоким титром (до 1/65000). Отработана методика индукции образования поликлональных антител у мышей с накоплением асцитов с помощью введения полного адъюванта Фрейнда внутрибрюшинно. Показана эффективность использования в иммунизации агрегированного рекомбинантного белка в виде взвеси очищенных телец включения. В качестве оптимальной схемы иммунизации мышей рекомбинантным белком иммуноглобулинов G человека рекомендована «восходящая» схема (№ 2).

**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.А. Кишкун. — М.: Медицина, 2000. — 533 с.

3. Hanly, W.C. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry / W.C. Hanly, J.E. Artwohl, B.T. Bennet // ILAR J. — 1995. — Vol. 37, № 3. — P. 93–112.

4. Способ получения флуоресцирующего антивидового конъюгата против IgG человека или животного для реакции непрямой иммунофлуоресценции пат. 2240823 РФ : МПК A61K39/395, G01N33/531 / О.А. Тимашева, С.А. Басалгина; дата публ.: 27.11.2004.

5. Production of large amounts of antibodies in individual mice / A.S. Tung [et al.] // J. Immunol. — 1976. — Vol. 116. – P. 676–681.

6. Antibody response to aggregated human interferon alpa2b in wild-tipe and transgenic immune tolerant mice depends on type and level of aggregation / S. Harmeling [et al.] // J. Pharm. Sci. — 2006. — Vol. 95, № 5. — P. 1084-1096.

7. Singh, S. M. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins / S.M. Singh, A.K. Panda // J. Biosci. Bioeng. — 2005. — Vol. 99, № 4. — P. 303–210.

## PRODUCTION OF MURINE ANTI-HUMAN POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT PROTEIN, CONTAINING FC-FRAGMENT OF IgG

*Makhanko O.V., Semizhon P.A., Fomina E.G., Scheslenok E.P., Dubkov N.A., Vladyko A.S.*

*State Institution "Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

Polyclonal antibodies against recombinant protein, containing CH2 and CH3 domains of human IgG, were obtained in mice. The titers of antibodies were assessed in ELISA test. The antigen had good immune response. Some titers rose to 1/65000. The optimal immunization schedule was selected.

**Keywords:** antispecies immunoglobulins, recombinant protein, immunization schedule, Freund's adjuvant, ELISA.

Поступила 17.09.2015

# ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ВЕЩЕСТВ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ

*Бореко Е.И.*

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

**Реферат.** Приводятся данные мировой научной периодики о противовирусных свойствах веществ природного, в основном растительного происхождения. Экстракты и индивидуальные вещества из многих растений, употребляемых в пищу, обладают противовирусными свойствами. Большинство веществ из химического состава растений относятся к соединениям полифенольного комплекса, преобладающей группой являются флавоноиды. Все эти вещества считаются потенциально обладающими антиоксидантными свойствами, и с этим связано их мульти-медикаментозное действие. Противовирусные свойства наиболее распространенных соединений (кверцетин, катехин, куркумин, кофейная кислота, ресвератрол) рассмотрены более подробно.

**Ключевые слова:** противовирусные свойства, флавоноиды, кверцетин, катехин, куркумин, кофейная кислота, ресвератрол.

Общеизвестным недостатком синтетических лекарственных препаратов, не являющихся аналогами или производными природных соединений, 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 лишена абсолютно аналогичного недостатка, представляется более щадящей процедурой, причина чего лежит в эволюционно сложившейся системе детоксикации организмом человека и животных ксенобиотиков, встречающихся в природе. В частности, применительно к фитотерапии сущность метода заключается во введении в организм биологически активных веществ в их естественном виде и в наиболее легко усваиваемых формах [1].

Указанное обстоятельство, а также отсутствие достаточного количества противовирусных препаратов обуславливает большой интерес к изысканиям лекарственного сырья среди продуктов биологического происхождения [2].

Доказаны ингибирующие свойства протеин-связанных полисахаридов из водорослей *Nemacystus decipines*, *Kjellmaniella gyrate*, *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida*, *Hizikia fusiforme*, *Porphyra tenera*, *Gelidium amansii*, *Gloiopeltis complanate*, *Gracilaria rerrucosa*, *Hemineura schmitziana*, *Ulra pertusa*, *Spirogyra arcta*, *Codium fragile*, *Acetabularia ryukyuensis* в отношении ВИЧ (обратная транскрипция и адсорбция) [3], кислые полисахариды из морских водорослей семейств *Phaeophyceae*, *Chlorophyceae*, *Protoflorideophyceae*, *Florideophyceae* нейтрализуют инфекционность вируса (вирулицидные свойства) [4]. Каррагенаны и другие сульфатированные полисахариды из бурых морских водорослей *Rhodophyceal*, *Chondrus crispus*, *Gigartiana stellata*, *Gigartinaceae* обладают вирусингибирующими свойствами в отношении ретро-, герпес-, покс-, тога-, парамиксо-, рабдо-, ротавирусов [5–10], а также являются ингибиторами обратной транскриптазы ВИЧ [11].

Имеются указания на большое количество находок противовирусных свойств в экспериментах с экстрактами морских беспозвоночных, в частности, оболочечников семейства *Didemnidae* [12].

Собственные данные изучения противовирусных свойств препаратов из природных источников [13] свидетельствуют о наибольшем количестве находок со средней и высокой активностью среди фильтратов культуральной жидкости грибов, продуктов окисления торфа, полисахаридов из растений и водорослей, водных экстрактов морских беспозвоночных, настоев и отваров лекарственных растений.

Растения наиболее доступны, их химический состав исследован достаточно полно. В различных растениях широко распространены флавоноиды, терпеноиды, лигнаны, сульфиды, полифенолы, каротиноиды, кумарины, сапонины, стеролы, куркумины, фталиды [14, 15]. Большинство этих веществ относятся к соединениям полифенольного комплекса [16].

Преобладающей группой полифенольных соединений, содержащихся в растениях, являются флавоноиды. Они встречаются повсеместно в продуктах растительного происхождения, включая продукты питания (овощи, фрукты, злаки; в коре, корнях, стеблях, цветах, растений; в чае, вине).

В составе растений идентифицировано более 4000 флавоноидов. Эти универсальные растительные пигменты (фенилхромоны) обуславливают окраску цветов, плодов, иногда листьев растений [15].

Все эти вещества считаются потенциально обладающими антиоксидантными свойствами, и с этим связана их антикарциногенная, предотвращающая старение, противовоспалительная, иммуномодулирующая, противоаллергенная, противомикробная, противовирусная и др. активность [15, 17, 18]. В результате высокое потребление флавоноидов (с пищей, лекарственными растениями) позитивно сказывается на здоровье, например, смертность по причине заболеваний сердца снижается до 60% [15].

Среди экстрактов и индивидуальных веществ из многих растений, употребляемых в пищу, обладают противовирусными свойствами: экстракт корня хрена (*Horse-radish*) [19], цитрофлавоноиды, нарингин из цитрусовых (*Citrus (Rutaceae*) [17, 20], экстракты ягод черной смородины, брусники, черники [21–23], антоцианозиды из ягод черники, смородины, винограда темных сортов, красных вин [17, 24].

Свежий экстракт, аллицин (диаллилтиосульфонат) и аджоен из чеснока (*Allium sativum L.*) также обладают противовирусными свойствами. При размельчении чеснока аллиин контактирует с аллиназой и образуется аллицин. В присутствии низкомолекулярных алкоголей или даже воды аллицин формирует аджоен (ajoene). Экстракт чеснока и аллицин обладают вирулицидными и вирусингибирующими свойствами в отношении ДНК- и РНК-содержащих оболочечных и безоболочечных вирусов (герпеса простого 2 типа, гриппа, Коксаки, цитомегаловирус) [25–28], аджоен проявляет вирусингибирующее действие в отношении ВИЧ [24, 29, 30].

Вирусингибирующими и (или) вирулицидными свойствами обладают лигнины из различного растительного сырья, повсеместно распространенные флавоноиды кверцетин, гесперидин, катехин, процианидин, нарингин, нарингенин, рутин, цианидол, фенолы таниновая кислота и хлорогеновая кислота [31–35]. Эти полифенолы содержатся в широко используемых пищевых продуктах растительного происхождения и используются в качестве субстанций лекарственных средств и биологических добавок различного назначения. Противовирусные свойства некоторых из них, наиболее распространенных, рассмотрены ниже более подробно.

**Кверцетин** — широко распространенное природное соединение, придает окраску некоторым овощам и фруктам. Кверцетин среди флавоноидов в силу особенностей молекулярного строения является одним из наиболее сильных антиоксидантов. Противовирусные свойства кверцетина проявляются в ингибировании репродукции разных, оболочечных и безоболочечных вирусов. В частности, в присутствии соединения снижается титр различных вирусов гриппа, включая вирус гриппа А (H5N1), причем в этом случае достигается 68% ингибирование его репродукции [36, 37]. В исследовании противовирусного действия кверцетина, нарингина, гесперетина и катехина в отношении инфекционности и репродукции вируса герпеса простого 1 типа, полиовируса 1 типа, вируса парагриппа 3 типа и респираторно-синцитиального вируса на культуре клеток методом редукции бляшек кверцетин вызывал снижение инфекционности и репродукционной способности каждого из вирусов, пропорционально концентрации вещества. Предобработка культуры клеток кверцетином не была эффективна, что свидетельствует о прямом противовирусном воздействии [38].

Кверцетин проявил высокую ингибирующую активность в отношении репродукции вирусов герпеса простого 1 и 2 типов на культуре клеток Vero при учете по проявлению цитопатического эффекта вирусов [39], блокирование репродукции этих вирусов происходит посредством подавления активации транкрипционного фактора NF-κB, отвечающего за адаптивные реакции клеток [40]. Установлено вирулицидное действие кверцетина в отношении лошадиного вируса герпеса 1 типа [41]. Кверцетин и другие флавоноиды (байкалеин, кверцетагенин и нарингенин) ингибируют различные стадии репродукции цитомегаловируса человека. Наиболее активен байкалеин, наименее — кверцетагенин [42]. Байкалеин, получаемый из корневища шлемника байкальского (*Scutellariae baicalensis*, щитовка), проявляет более высокое антивирусное действие и в отношении вируса японского энцефалита на культуре клеток Vero ($EC_{50}$ = 14,3 мкг/мл), кверцетин гораздо менее активен ($EC_{50}$ = 212,1 мкг/мл) [43].

Кверцетин наряду с другими активными компонентами *Hypericum hircinum L.* (*Hypericaceae*), представленными бетулиновой, шикимовой и хлорогеновой кислотами, тетрагидрофлавононом и его гликозидом ингибирует функцию обратной транскриптазы ВИЧ-1 [44]. Подавление репродук-

ции вируса гепатита *C* кверцетином обусловлено ингибированием активности N53 протеазы [45]. Идентификация ключевых молекул, блокирующих активность геликазы вируса гепатита *C*, с использованием метода молекулярного 3D моделирования (докинг) показала высокую энергию взаимодействия на основе водородных связей для кверцетина, катехина, а также ресвератрола и лютеина [46]. Кверцетин проявил ингибирующее действие в отношении репродукции вируса Денге 2 типа на культуре клеток Vero ($EC_{50}$ = 28,9–35,7 мкг/мл), в то время как гесперитин не был активен [47], установлен ингибирующий эффект экстракта листьев *Kalanchoe gracilis* (*L.*), в составе которого кроме кверцетина содержится феруловая кислота и кемпферол, в отношении репродукции энтеровируса 71 и вируса Коксаки A16 ($EC_{50}$ = 35,8 и 42,9 мкг/мл соответственно) [48]. Кверцетин-7-гликозид из *Lagerstroemia speciosa* проявляет противовирусную активность в отношении риновируса человека [49, 50].

**Полифенолы чая** представлены катехинами, проантоцианидинами, флавонолами, теафлавинами. Вирусингибирующая активность в отношении вируса гриппа А проявляется теафлавином, процианидином и процианидин дигаллатом, эпигаллокатехином, эпигаллокатехин галлатом (расположены по убыванию активности) в диапазоне $EC_{50}$ 16,2–56,5 мкг/мл, в отношении вируса гриппа В — кемпферолом, эпигаллокатехин галлатом, теафлавином в диапазоне $EC_{50}$ 9,0–49,7 мкг/мл. Взаимосвязь «структура–активность» свидетельствует, прежде всего, об активности мономеров катехина в отношении вирусов гриппа разных типов [51]. С использованием докинг-технологии установлено, что эпигаллокатехин галлат, эпикатехин галлат и катехин-5-галлат зеленого чая стерически способны соединяться в консервативной области вблизи 430 аминокислотного остатка нейраминидазы вируса гриппа (вторичный сайт связывания с сиаловыми кислотами). Ингибиторная концентрация ($IC_{50}$) составляет 100–173 mkM [61].

Теафлавины черного чая из *Camellia sinensis* (теафлавин, теафлавин-3-моногаллат, теафлавин-3’-моногаллат и теафлавин-3,3’-дигаллат) проявляют противовирусную активность в отношении резистентных штаммов вируса герпеса простого 1 типа, теафлавин-3,3’-дигаллат в концентрации 50 mkM ингибирует более 99% продукции вирусных частиц в клетках Vero и A549 [52]. Катехин, эпигаллокатехин зеленого чая и наринген (флавонон из цитрусовых) ингибируют репродукцию вируса Чикунгунья [53, 54], проникновение вирусов гепатита *B* и *C* в гепатоциты [55, 56], репродукцию энтеровируса 71 [57].

В сравнении с кверцетином катехин и наринген проявляют более высокое ингибирующее действие в отношении репродукции вируса гепатита *C* на стадии сборки вирионов, однако кверцетин выраженно блокирует процесс трансляции, в то время как катехин и наринген на этой стадии проявляют среднюю активность [58]. Наринген способен к взаимодействию с белками капсида вируса гепатита *C*, о чем свидетельствует высокая прочность докинг-связывания. Максимальное количество водородных связей взаимодействия с тремя моделями капсидных протеинов обнаружено для эпигаллокатехин галлата [59]. Наринген способен снижать инфекционность (вирулицидное действие) суррогатных норовирусов (кошачий калицивирус FCV-F9 и мышиный норовирус MNV-1) [60].

**Куркумин.** Куркума, выделенная из *Curcuma longa*, используется как пищевая добавка и краситель. Куркумин (диферулометан), придающий желтое окрашивание куркуме, известен терапевтической активностью при широком спектре заболеваний, обладает антиоксидантной, противовоспалительной, противовирусной, антибактериальной, противоопухолевой активностью, эффективен при диабете, аллергиях, болезни Альцгеймера (сенильная деменция) и других хронических заболеваниях. Эти эффекты опосредованы регуляцией различных факторов транскрипции, ростовых факторов, воспалительных цитокинов, протеинкиназ и других энзимов. Куркумин проявляет активность, сходную с блокаторами факторов некроза опухолей, роста эндотелиальных клеток сосудов, рецепторов фактора роста эпидермиса человека. Суммируя современные научные данные о мультинаправленности полезных свойств куркумина, его можно назвать «специей для жизни» [62].

Куркумин ингибирует репродукцию цитомегаловируса человека *in vitro*, снижает уровень IgM к этому вирусу и количество его ДНК-копий в сыворотке крови экспериментально инфицированных мышей Balb/c [63]. При этом его фармакокинетика сходна с таковой у гелданамицина, известного противоопухолевого средства, мишенью действия которого является белок теплового шока 90 (Hsp90). Молекулярное 3D моделирование свидетельствует о том, что куркумин связывается с кар-

маном Hsp90 посредством водородных связей, гидрофобных взаимодействий и конъюгации. Цитомегаловирусная инфекция в фибробластах легкого эмбриона человека выражается в экспрессии Hsp90a, и этот процесс в значительной степени ингибируется куркумином [64].

Куркумин является ингибитором репродукции вирусов японского энцефалита [65], Денге [66], гриппа А [67], гепатита *С* и *В* [68–70] и других оболочечных вирусов [71].

Куркумин ингибирует экспрессию регуляторных генов и интегразы ВИЧ-1 [72–74]. Однако его активность как возможного анти-ВИЧ средства не установлена. Куркумин не оказывает влияния ни на вирусную нагрузку, ни на количество CD4-лимфоцитов. В качестве одной из возможных причин рассматривается плохая абсорбция в пищеварительном тракте [75–78]. Куркумин проявляет умеренную способность к снижению продукции вируса гепатита *В* в перманентно трансфицированных клетках HepG2 2.2.15 [79], проявляет цитотоксическую активность в отношении клеток, инфицированных вирусами папилломы человека 16 и 18 типов, преимущественно посредством воздействия на вирусные онкопротеины Е6 и Е7 [80], значительно снижает экспрессию РНК, синтез белков и титр вируса Коксаки В3 [81], репродукцию вируса герпеса простого 1 типа и экспрессию его генов [82], вируса японского энцефалита [83], экспрессию генов вируса гепатита *С* [84].

Рассматривается вопрос о возможности использования куркумина в качестве универсального контрацептива и микробицида [85, 86].

Синтезированы биконьюгаты куркумина с жирными кислотами, дипептидами и фолиевой кислотой, проявляющие противовирусную активность в отношении ВИЧ, вирусов герпеса простого и везикулярного стоматита ($EC_{50}$ = 0,019–0,105 mkM) [87, 88].

**Кофейная кислота** — диоксикоричная кислота, широко распространена в природе, обычно встречается в растениях в соединении с хинной кислотой в виде депсида — хлорогеновой кислоты. Кофейная кислота выделена из коры хинного дерева, смолы хвойных деревьев, из кофейных бобов.

Кофейная кислота проявляет заметное противовирусное действие в отношении вирусов герпеса простого 1 и 2 типа [89, 90] так же, как и продукты ее оксидации в концентрации 0,1–20 мкг/мл [91], вируса гриппа А [92]. Наряду с другими индивидуальными веществами, обладающими противовирусными свойствами, кофейная и хлорогеновая кислоты содержатся в водном экстракте *Plantago major L.* (подорожник), который ингибирует репродукцию вирусов герпеса простого 1 и 2 типа, аденовирусов 3, 8, 11 типов. Кофейная кислота проявляет высокую ингибирующую активность в отношении вируса герпеса простого 1 типа ($EC_{50}$ = 15,3 мкг/мл, индекс селективности = 671), вируса герпеса простого 2 типа ($EC_{50}$ = 87,3 мкг/мл, индекс селективности = 118), аденовируса 3 типа ($EC_{50}$ = 14,2 мкг/мл, индекс селективности = 727). Хлорогеновая кислота активна в отношении аденовируса 11 типа ($EC_{50}$ = 13,3 мкг/мл, индекс селективности = 301) [93].

Кофе, приготовленный из молотых зерен и растворимого порошка, ингибирует репродукцию вируса герпеса простого 1 типа путем сочетания вирулицидного и ингибирующего репродукцию действия. Кофеин ингибирует размножение вируса в той же степени, но как и хинная, а также хлорогеновая кислоты, не проявляет вирулицидности. Это свидетельствует о том, что другие компоненты кофе могут играть роль в наблюдаемом противовирусном эффекте. В дополнение экстракты кофе ингибируют репродукцию безоболочечного РНК полиовируса, но без вирулицидного действия [94].

Окисление о-дифенолов, катехолов, протокатеховой, кофейной, хлорогеновой кислот о-дифенолоксидазой приводит к созданию соединений с противовирусными свойствами в отношении вирусов герпеса простого 1 и 2 типа. На первичных клетках почки кролика, инфицированных вирусом герпеса простого 1 типа, 90% редукция бляшек достигается в присутствии 1 мкг/мл кофейной кислоты, 9 мкг/мл катехола, 13 мкг/мл хлорогеновой кислоты или 20 мкг/мл протокатеховой кислоты соответственно. Из базовых о-дифенолов только катехол и кофейная кислота проявляют заметное противовирусное действие. Такие же результаты получены с вирусом герпеса простого 2 типа [89, 95].

В лечении экспериментального кожного герпеса морских свинок использовали 3%-ю мазь продукта оксидации кофейной кислоты. Установлено предотвращение распространения поражения кожи [96]. В связи с антибактериальными, противогрибковыми, противовирусными, противовоспалительными, анестезирующими и противоопухолевыми свойствами кофейной кислоты изучены ее диффузия и проникновение в слизистой оболочке щеки поросят. Для этого готовили мукозоадгезивный гель, содержащий вещество. Установлено высокое проникновение кофейной кислоты, однако в

случае приготовления геля с раствором этанола проникновение было в 35 раз выше [87]. Полученные результаты предполагают использование препаратов кофейной кислоты в стоматологии.

Кофейная и хлорогеновая кислоты проявляют противовирусное действие в отношении вируса гепатита *B* в культуре клеток HepG 2.2.15 и при экспериментальном гепатите *B* уток. Необработанный (сырой) экстракт бобов кофе, в котором много хлорогеновой и кофейной кислот, а также экстракт декофеинированного кофе показали ингибирующий эффект в отношении репликации вируса гепатита *B* [98].

Фенетиловый эфир кофейной кислоты, как и куркумин, является ингибитором интегразы ВИЧ-1 [99]. Соединение является специфическим ингибитором транскрипционного фактора NF-κB, снимает алкоголь- и морфин-индуцированную экспрессию РНК вируса гепатита *C* [100, 101], наряду с другими производными кофейной кислоты ингибирует репродукцию ВИЧ [102], проявляет выраженные цитотоксические свойства в отношении опухолевых клеток посредством вовлечения протеина суппрессии опухолей p53 и p38 [103], блокирует пролиферацию клеток, запускает апоптоз и обладает заметной способностью перехвата перекиси водорода [104].

Хлорогеновая кислота не ингибирует интегразу ВИЧ-1 [73], не подавляет репродукцию вируса гриппа A [71], но проявляет ингибирующее действие в отношении репродукции энтеровируса 71 типа ($EC_{50}$ = 6,3 мкг/мл) [106].

Производные хлорогеновой кислоты, дикафеоилхинные кислоты из *Youngia japonica*, проявляют противовирусные свойства в отношении респираторно-синцитиального вируса ($EC_{50}$ = 0,5 мкг/мл) [106].

Кофейная кислота и ее эфиры наряду с другими веществами содержатся в прополисе, экстракт которого проявляет противовоспалительную, иммуномодулирующую, противовирусную и противобактериальную активность; 50% ингибирующая концентрация водного и спиртового экстрактов прополиса в отношении вируса герпеса простого 1 типа (метод редукции бляшек) составляют 0,0004 и 0,000035% соответственно [107].

Производные кофейной кислоты содержатся также в эхинацее [108, 109]. Производные феруловой и кофейной кислот являются основными компонентами водно-алкогольных экстрактов, а также сока *Echinacea pallida*. Они малотоксичны для культур клеток почек обезьян и проявляют ингибирующую активность в отношении репродукции вирусов герпеса простого 1 и 2 типа [110].

**Ресвератрол** — природный полифенол (пирокатехин), присутствующий в виноградной кожуре, красном вине, арахисе, проявляет ингибирующую активность как антиоксидант при воспалении, атеросклерозе, заболеваниях сердца, новообразованиях. Радиозащитное действие ресвератрола объясняется выраженной способностью предотвращать оксидативный стресс [111], который является одним из основных общих патогенетических звеньев в развитии многих заболеваний, в т. ч. инфекционных. Вероятно, благодаря этой особенности реализуются противовирусные свойства ресвератрола.

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что в основном привлекают внимание ингибирующие свойства ресвератрола в отношении ДНК-содержащих вирусов. В частности, установлены вирусингибирующие свойства в отношении репродукции цитомегаловируса ($EC_{50}$ = 1–2 мкМ). Для проявления цитотоксичности в отношении размножающейся или стационарной культуры клеток фибробластов легкого эмбриона человека требуется по меньшей мере в 50 раз более высокая концентрация ресвератрола (т. е. отношение МПК/$EC_{50}$ составляет не менее 25) [112]. Ресвератрол ингибирует также репродукцию вирусов герпеса простого 1 и 2 типов, а также вируса опоясывающего лишая, вируса Эпштейна–Барр. При этом он не вызывает прямого вирулицидного действия и не влияет на прикрепление вируса к клетке. Мишенью его действия, вероятно, являются ранние события в репродукционном цикле. Ресвератрол также задерживает клеточный цикл в интерфазе, подавляет реактивацию вируса из латентно инфицированных нейронов и снижает количество ICP-4, мажорного предшественника раннего регуляторного протеина вируса [113–115]. Более поздними исследованиями показано, что противовирусное действие ресвератрола в отношении вируса герпеса может быть опосредовано воздействием на клеточный фактор. В частности, установлено подавление активации фактора транскрипции NF-κB в ядре инфицированной клетки, опосредованной вирусом герпеса, и снижение экспрессии ранних и поздних генов вируса и синтеза вирусной ДНК [116].

Установлена эффективность 12,5 и 25% крема ресвератрола при экспериментальном кожном герпесе белых мышей. Лечение начинали спустя 1 или 6 ч после инфицирования. Крем продолжали

наносить каждые 3 ч в течение 5 последующих дней. Эффективность крема ресвератрола при этом была сравнима с эффективностью 5%-й мази ацикловира (зовиракс). Ресвератрол был эффективен также в случае инфицирования вариантом вируса, устойчивым к действию ацикловира. При начале лечения спустя 12 ч после инфицирования эффективность отсутствовала. Не установлено местнораздражающее действие крема ресвератрола [117].

В лечении экспериментальной вагинальной инфекции мышей, вызванной вирусами герпеса простого 1 и 2 типа, эффективен 19%-й крем ресвератрола. Его вводили при этом 5 раз в день на протяжении 5 дней, начиная через 1 ч после инфицирования. При этом репродукция вируса герпеса 2 типа снижалась, начиная с 1-го дня после инфицирования, и предотвращались экстравагинальные проявления инфекции. Концентрации крема 12,5 и 6,25%, а также трехкратное применение препарата были менее эффективны и не предотвращали развитие экстравагинальных проявлений. Гибель животных в контроле составила 37%, в случае применения 6,25; 12,5 и 19% крема ресвератрола — 40, 24 и 3% соответственно [118].

Ресвератрол подавляет репродукцию аденовирусов 5 и 7 типа [118, 120]. Показан вирусингибирующий эффект ресвератрола в отношении вируса полиомы в перевиваемых мышиных фибробластах 3Т6 и трансформированных клетках линии HL60 [121]. С использованием докинг-технологии установлено, что ресвератрол является умеренным ингибитором N1L протеина, фактора вирулентности вирусов натуральной оспы и оспенной вакцины. Сверхэкспрессия N1L приводит к апоптозу инфцированных клеток, и сам он не является необходимым для репродукции, но его удаление приводит к аттенуации вируса [122]. Ресвератрол является ингибитором репродукции вируса африканской чумы свиней [123].

Ресвратрол ингибирует репродукцию ВИЧ-1, вызывая 4-кратное снижение уровня протеина p24 [124], и синергически повышает анти-ВИЧ активность нуклеозидных аналогов зидовудина (AZT), зальцитабина (ddC) и диданозина (ddI). Ресвератрол в концентрации 10 mkM не токсичен для культуры клеток и снижает репродукцию вируса от 20 до 30%. В мононуклеарах периферической крови, активированных фитогемагглютинином и инфицированных Т-лимфотропным вирусом человека IIIB, ресвератрол в концентрации 10 mkM снижает $EC_{90}$ AZT, ddC и ddI в 3,5; 5,5 и 17,8 раза соответственно. Сходный эффект установлен на ВИЧ-1 инфицированных клетках [125].

В противоположность этим наблюдениям установлено значительное увеличение репликации РНК вируса гепатита *С* в присутствии ресвератрола [126].

Как свидетельствуют приведенные данные, полифенолы из распространенных пищевых продуктов обладают свойством нейтрализации инфекционности и подавления репродукции разнообразных вирусов, являющихся возбудителями многих инфекционных заболеваний. Судя по значениям их эффективных концентраций, противовирусное действие полифенолов за редкими исключениями не столь выражено в сравнении с наиболее эффективными лекарственными средствами, проявляющими ингибирующую активность нередко в микро- и наномолярных концентрациях. Вместе с тем использование для местного применения в виде линиментов и мазей для лечения экспериментального герпеса дает весьма значимый эффект. Учитывая универсальную молекулярную природу наблюдаемого действия, эти ингибиторы вирусов в составе медикаментов и биологических добавок могут благотворно влиять на течение хронической рецидивирующей инфекции, увеличивая интервалы между рецидивами и снижая их выраженность, а также обеспечивать синергический или аддитивный характер взаимодействия с официнальными противовирусными средствами. С учетом содержания флавоноидов в продуктах питания при потреблении с пищей необходимые концентрации каждого из соединений в организме могут не достигаться, однако, учитывая многокомпонентность состава продуктов, может проявляться суммарный эффект. Рациональное использование богатых флавоноидами пищевых продуктов может оказывать вспомогательное действие, дополняющее базовую терапию с применением противовирусных средств.

**Литература**

1. Шмерко, Е.П. Практическая фитотерапия. Опыт лечения растениями / Е.П. Шмерко, И.Ф. Мазан. — Минск: Лечприрода, 1996. — 640 с.

2. Вичканова, С.А. Антивирусная активность флавоноидов / С.А. Вичканова, Л.В. Горюнова // Лекарственные растения. Фармакология и химиотерапия. — М.: Колос, 1971. — Т. 14. — С. 212–217.

3. Polysaccharides and antiviral drugs containing the same as active ingredient: pat. US5089481, USA: IPC A61K 031/70; C08B 037/00 / S. Muto [et al.]; publ. date: 18.02.1992.

4. Condom coated with acidic polysaccharides: pat. US5878747, USA: IPC A61F 006/04 / Y. Enomoto [et al.]; publ. date: 09.03.1999.

5. Topical demulcent for viral and inflammatory diseases of the skin: pat. US5198217, USA: IPC A61K 035/78; A61K 031/715 / N.A. Vedros; publ. date: 30.03.1993.

6. Synergistic composition comprising a fibroblast growth factor and a sulfated polysaccharide, for use as antiviral agent: pat. US5288704, USA: IPC A61K 037/00 / D. Ungheri [et al.]; publ. date: 31.01.1992.

7. Method for inhibition of rotavirus infection with carrageenan: pat. US5658893, USA: IPC A61K 031/715 / S. Anderson [et al.]; publ. date: 19.08.1997.

8. Gonzalez, M.E. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan / M.E. Gonzalez, B. Alarcon, L. Carrasco // Antimicrob. Agents Chemother. — 1987. — Vol. 31, № 9. — P. 1388–1393.

9. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae / H. Nakashima [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. — 1987. — Vol. 31, № 10. — P. 1524–1528.

10. Witvrouw, M. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs / M. Witvrouw, E. De Clercq // Gen. Pharmacol. — 1997. – Vol. 29, № 4. — P. 497–511.

11. Method for the treatment of AIDS virus and other retroviruses: pat. US4783446, USA: IPC A61K 031/715 / M. Neushul; publ date: 08.11.1988.

12. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial, and antineoplastic agents / K.L. Rinehart [et al.] // Pure & Appl. Chem. — 1981. — Vol. 53. — P. 795–817.

13. Основные итоги исследования противовирусных свойств новых синтетических соединений, веществ природного происхождения и официнальных лекарственных препаратов / Е.И. Бореко [и др.] // Профилактика и лечение инфекц. и паразитар. заболеваний материалы юбил. конф. БелНИИЭМ. — Минск: Навука и тэхніка, 1995. — С. 153–169.

14. Фитотерапия в комплексном лечении заболеваний внутренних органов / А.А. Крылов [и др.]. — Киев: Здоровья, 1992. — 240 с.

15. Craig, W.J. Health-promoting properties of common herbs / W.J. Craig // Am. J. Clin. Nutr. —1999. — Vol. 70, suppl. 3. — P. 491S–499S.

16. Барабой, В.А. Биологическое действие растительных фенольных соединений / В.А. Барабой. — Киев: Навук. думка, 1976. — 260 с.

17. Microcapsules with a wall of crosslinked plant polyphenols and compositions containing them: pat. US5780060, USA: IPC A61K 009/50; A61K 035/78 / M.-C. Levy, M.-C. Andry; publ. date: 14.06.1998.

18. Middleton, E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function / E. Middleton // Adv. Exp. Med. Biol. — 1998. — Vol. 439. — P. 175–182.

19. Esanu, V. The effect of an aqueous horse-radish extract, applied as such or in association with caffeine, on experimental influenza in mice / V. Esanu, E. Prahoveanu // Virologie. ——1985. — Vol. 36, № 2. — P. 95–98.

20. Wacker, A. Antiviral activity of plant components. 1st communication: flavonoids / A. Wacker, H.G. Eilmes // Arzneimittelforschung. — 1978. — Vol. 28, № 3. — P. 347–350.

21. Противовирусные свойства распространенных лекарственных растений / Е.И. Бореко [и др.] // Роль антропогенных и природных патогенов в формировании инфекционных и неинфекционных болезней человека. Медико-экологические аспекты проблемы: материалы междунар. конф. / Ред. Л.П. Титов [и др.]. — Минск: ИНПРЕДО, 2002. — С. 343–355.

22. Противовирусное действие экстрактов лекарственных растений при экспериментальном клещевом энцефалите / Г.И. Фокина [и др.] // Вопр. вирусологии. — 1993. — Т. 38, № 4. — С. 170–173.

23. Экспериментальная фитотерапия клещевого энцефалита / Г.И. Фокина [и др.] // Вопр. вирусологии. — 1991. — Т. 36, № 1. — С. 18–21.

24. Galabov, A.S. Virucidal agents in the eve of manorapid synergy / A.S. Galabov // GMS Krankenhhyg. Interdiszip. — 2007. — Vol. 2, № 1. — Doc. 18.

25. Method for treating genital and oral herpes: pat. US4795636, USA: IPC A61K 035/78 / J.J. Tsuei; publ. date: 03.01.1989.

26. Antiviral properties of garlic: *in vitro* effects on influenza B, herpes simplex and coxsackie viruses / Y. Tsai [et al.] // Planta Med. — 1985. — Vol. 5. — P. 460–461.

27. Demonstration of the anti-viral activity of garlic extract against human cytomegalovirus *in vitro* / N. L. Guo [et al.] // Chin. Med. J. — 1993. — Vol. 106, № 2. — P. 93–96.

28. *In vitro* virucidal effects of Allium sativum (garlic) extract and compounds / N.D. Weber [et al.] // Planta Med. — 1992. — Vol. 58, № 5. — P. 417–423.

29. Methods of using ajoene: pat. US5856363, USA: IPC A61K 031/105 / A.V. Tatarintsev, A.S. Turgiev, J.B. Davidson; publ. date: 05.01.1999.

30. *In vitro* suppression of HIV-1 replication by ajoene [(e)-(z)-4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene-9 oxide] / R. Walder [et al.] // Biomed. Pharmacother. — 1997. — Vol. 51, № 9. — P. 397–403.

31. Antiviral disinfecting composition and method of inactivating the AIDS virus *in vitro*: pat. US5223258, USA: IPC A01N 025/02; A61K 031/70; C08L 097/02 / M. Makoto [et al.]; publ. date: 29.06.1993.

32. Kaul, T.N. Antiviral effect of flavonoids on human viruses / T.N. Kaul, E. Middleton, P.L. Ogra // J. Med. Virol. — 1985. — Vol. 15, № 1. — P. 71–79.

33. Vanden Berghe, D.A. Plant products as potential antiviral agents / D.A. Vanden Berghe, A.J. Vlietinck, L. Van Hoof // Bull. Inst. Pasteur. — 1986. — Vol. 84, № 2. — P. 101–147.

34. Pharmaceutical composition and method of use pat. US5145839, USA: IPC A61K 031/35; A61K 031/70 / M. Beljanski; publ. date: 08.09.1992.

35. Wacker, A. Antiviral activity of plant components. 1st communication: flavonoids / A. Wacker, H.G. Eilmes // Arzneimittelforschung. — 1978. — Vol. 28, № 3. — P. 347–350.

36. Anti-H5N1 virus flavonoids from Capparis sinaica Veill / A.K. Ibrahim [et al.] // Nat. Prod. Res. — 2013. — Vol. 27, № 22. — P. 2149–2153.

37. Antiviral effect of methylated flavonol isorhamnetin against influenza / A. Abdal Dayem [et al.] // PLoS One. — 2015. — Vol. 10, № 3. — e012161.

38. Kaul, T.N. Antiviral effect of flavonoids on human viruses / T.N. Kaul, E.Jr. Middleton, P.L. Ogra // J. Med. Virol. — 1985. — Vol. 15, № 1. — P. 71–79.

39. Lyu, S.Y. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro* / S.Y. Lyu, J.Y. Rhim, W.B. Park // Arch. Pharm. Res. — 2005. — Vol. 28, № 11. — P. 1293–1301.

40. Houttuynia cordata blocks HSV infection through inhibition of NF-κB activation / X. Chen [et al.] // Antiviral Res. — 2011. — Vol. 92, № 2. — P. 341–345.

41. *In vitro* assessment of the antiviral potential of trans-cinnamic acid, quercetin and morin against equid herpesvirus 1 / H.D. Gravina [et al.] // Res. Vet. Sci. — 2011. — Vol. 91, № 3. — e158-162.

42. Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication / S. Cotin [et al.] // Antiviral Res. — 2012. — Vol. 96, № 2. — P. 181–186.

43. Antiviral activity of baicalein and quercetin against the Japanese encephalitis virus / J. Johari [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2012. — Vol. 13, № 12. — P. 16785–16795.

44. Hypericum hircinum L. components as new single-molecule inhibitors of both HIV-1 reverse transcriptase-associated DNA polymerase and ribonuclease H activities / F. Esposito [et al.] // Pathog. Dis. — 2013. — Vol. 68, № 3. — P. 116–124.

45. Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity / L. Bachmetov [et al.] // J. Viral. Hepat. — 2012. — Vol. 19, № 2. — e81–88.

46. Docking studies of Pakistani HCV NS3 helicase: a possible antiviral drug target / K. Fatima [et al.] // PLoS One. — 2014. — Vol. 9, № 9. — e106339.

47. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2 / K. Zandi [et al.] // Virol. J. — 2011. — Vol. 8. — P. 560. — doi: 10.1186/1743-422X-8-560.

48. Antiviral ability of Kalanchoe gracilis leaf extract against Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 / C.Y. Wang [et al.] // Evid. Based Complement. Alternat. Med. — 2012. — Vol. 2012. — P. 503165.

49. Anti-human rhinovirus 2 activity and mode of action of quercetin-7-glucoside from Lagerstroemia speciosa / J.H. Song [et al.] // J. Med. Food. — 2013. — Vol. 16, № 4. — P. 274–279.

50. Quercetin inhibits rhinovirus replication *in vitro* and *in vivo* / S. Ganesan [et al.] // Antiviral Res. — 2012. — Vol. 94, № 3. — P. 258–271.

51. Comparison of *in vitro* antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure-activity relationship analysis / Z.F. Yang [et al.] // Fitoterapia. — 2014. — Vol. 93. — P. 47–53.

52. Antiviral activity of theaflavin digallate against herpes simplex virus type 1 / A. de Oliveira [et al.] // Antiviral Res. — 2015. — Vol. 118. — P. 56–67.

53. The green tea catechin, epigallocatechin gallate inhibits chikungunya virus infection / C. Weber [et al.] // Antiviral Res. — 2015. — Vol. 113. — P. 1–3.

54. Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays / L. Pohjala [et al.] // PLoS One. — 2011. — Vol. 6, № 12. — e28923.

55. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits entry of hepatitis B virus into hepatocytes / H.C. Huang [et al.] // Antiviral Res. — 2014. — Vol. 111. — P. 100–111.

56. Structure-activity studies of (-)-epigallocatechin gallate derivatives as HCV entry inhibitors. / R. Bhat [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. — 2014. – Vol. 24, № 17. — P. 4162–4165.

57. Antiviral effect of epigallocatechin gallate on enterovirus 71 / H.Y. Ho [et al.] // J. Agric. Food Chem. — 2009. — Vol. 57, № 14. — P. 6140–6147.

58. Divergent antiviral effects of bioflavonoids on the hepatitis C virus life cycle / R. Khachatoorian // Virology. — 2012. — Vol. 433, № 2. — P. 346–355.

59. In silico studies of medicinal compounds against hepatitis C capsid protein from north India / S. Mathew [et al.] // Bioinform. Biol. Insights. — 2014. — Vol. 8. — P. 159–168.

60. Su, X. Naturally occurring flavonoids against human norovirus surrogates / X. Su, D.H. D'Souza // Food Environ. Virol. — 2013. — Vol. 5, № 2. — P. 97–102.

61. Müller, P. Catechin inhibition of influenza neuraminidase and its molecular basis with mass spectrometry / P. Müller, K.M. Downard // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2015. — Vol. 111. — P. 222–230.

62. Curcumin: the Indian solid gold / B.B. Aggarwal [et al.] // Adv. Exp. Med. Biol. — 2007. — Vol. 595. — P. 1–75.

63. Protective effect of curcumin against cytomegalovirus infection in Balb/c mice / Y. Lv [et al.] // Environ. Toxicol. Pharmacol. — 2014. — Vol. 37, № 3. — P. 1140–1147.

64. Curcumin inhibits human cytomegalovirus by downregulating heat shock protein 90 / Y. Lv // Mol. Med. Rep. — 2015. — Vol. 12, № 3. — P. 4789–4793.

65. Antioxidants: potential antiviral agents for Japanese encephalitis virus infection / Y. Zhang [et al.] // Int. J. Infect. Dis. —— 2014. — Vol. 24. — P. 30–36.

66. Inhibitory effects of curcumin on dengue virus type 2-infected cells *in vitro* / S.L. Padilla [et al.] // Arch. Virol. — 2014. — Vol. 159, № 3. — P. 573–579.

67. Structure-activity relationship analysis of curcumin analogues on anti-influenza virus activity / J. L. Ou [et al.] // FEBS J. — 2013. — Vol. 280, № 22. — P. 5829–5840.

68. Pecheur, E.I. Curcumin against hepatitis C virus infection: spicing up antiviral therapies with 'nutraceuticals'? / E.I. Pecheur // Gut. — 2014. — Vol. 63, № 7. — P. 1035–1037.

69. Turmeric curcumin inhibits entry of all hepatitis C virus genotypes into human liver cells / Anggakusuma [et al.] // Gut. — 2014. — Vol. 63, № 7. — P. 1137–1149.

70. Inhibitory effects of crude extracts from some edible Thai plants against replication of hepatitis B virus and human liver cancer cells / W. Waiyaput [et al.] // BMC Complement. Altern. Med. — 2012. — Vol. 12. — P. 246.

71. Inhibition of enveloped viruses infectivity by curcumin / T.Y. Chen [et al.] // PLoS One. — 2013. — Vol. 8, № 5. — e62482.

72. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication / C.J. Li [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — Vol. 90, № 5. — P. 1839–1842.

73. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin / A. Mazumder [et al.] // Biochem. Pharmacol. — 1995. — Vol. 49, № 8. — P. 1165–1170.

74. Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase / T.R. Burke [et al.] // J. Med. Chem. — 1995. — Vol. 38, № 21. — P. 4171–4178.

75. Gilden, D. Curcumin trial finds no activity / D. Gilden, T. Smart // GMHC Treat Issues. — 1996. — Vol. 10, № 2. — P. 9.

76. Liu, J.P. Herbal medicines for treating HIV infection and AIDS / J.P. Liu, E. Manheimer, M. Yang // Cochrane Database Syst. Rev. — 2005. — Vol. 3. — CD003937.

77. Curcumin inhibits hepatitis B virus via down-regulation of the metabolic coactivator PGC-1alpha / M.M. Rechtman [et al.] // FEBS Lett. — 2010. — Vol. 584, № 11. — P. 2485–2490.

78. James, J.S. Curcumin: clinical trial finds no antiviral effect / J.S. James // AIDS Treat News. — 1996. — № 242. — P. 1–2.

79. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an *in vitro* replicative system / M.R. Romero [et al.] // Antiviral Res. — 2005. — Vol. 68, № 2. — P. 75–83.

80. Divya, C.S. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis / C.S. Divya, M.R. Pillai // Mol. Carcinog. — 2006. —— Vol. 45, № 5. — P. 320–332.

81. Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system by curcumin suppresses coxsackievirus B3 replication / X. Si [et al.] // J. Virol. —— 2007. — Vol. 81, № 7. — P. 3142–3150.

82. Curcumin inhibits herpes simplex virus immediate-early gene expression by a mechanism independent of p300/CBP histone acetyltransferase activity / S.B. Kutluay [et al.] // Virology. — 2008. — Vol. 373, № 2. — P. 239–247.

83. Dutta, K. Curcumin protects neuronal cells from Japanese encephalitis virus-mediated cell death and also inhibits infective viral particle formation by dysregulation of ubiquitin-proteasome system / K. Dutta, D. Ghosh, A. Basu // J. Neuroimmune Pharmacol. — 2009. — Vol. 4, № 3. — P. 328–337.

84. Curcumin inhibits hepatitis C virus replication via suppressing the Akt-SREBP-1 pathway / K. Kim [et al.] // FEBS Lett. — 2010. — Vol. 584, № 4. — P. 707–712.

85. Naz, R.K. Can curcumin provide an ideal contraceptive? / R.K. Naz // Mol. Reprod. Dev. — 2011. — Vol. 78, № 2. — P. 116–123.

86. Plant products as topical microbicide candidates: assessment of *in vitro* and *in vivo* activity against herpes simplex virus type 2 / K.Z. Bourne [et al.] // Antiviral Res. — 1999. — Vol. 42, № 3. — P. 219–226.

87. Design and development of curcumin bioconjugates as antiviral agents / D. Rai [et al.] // Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf). — 2008. — Vol. 52. — P. 599–600.

88. Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid / R.K. Singh [et al.] // Eur. J. Med. Chem. — 2010. — Vol. 45, № 3. — P. 1078–1086.

89. *In vitro* studies of the antiviral activity of enzymatically oxidized o-diphenolic compounds against herpes simplex virus type 1 and 2 // Zentralbl. Bakteriol. Orig. A. — 1976. — Vol. 234, № 2. — P. 159–169.

90. Helbig, B. Comparison of the antiviral activity of oxidized caffeic acid and hydrocaffeic acid against herpesvirus hominis types 1 and 2 *in vitro* / B. Helbig, K.D. Thiel // Pharmazie. — 1982. — Vol. 37, № 8. — P. 603–604.

91. Antiviral activity of enzymatically oxidized caffeic acid against herpesvirus hominis type 1 and type 2 / K.D. Thiel [et al.] // Acta Virol. — 1983. — Vol. 27, № 3. — P. 200–208.

92. Inhibition by caffeic acid of the influenza A virus multiplication *in vitro* / H. Utsunomiya [et al.] // Int. J. Mol. Med. — 2014. — Vol. 34, № 4. — P. 1020–1024.

93. Antiviral activity of Plantago major extracts and related compounds *in vitro* / L.C. Chiang [et al.] // Antiviral Res. — 2002. — Vol. 55, № 1. — P. 53–62.

94. Antiviral activities of coffee extracts *in vitro* / H. Utsunomiya [et al.] // Food Chem. Toxicol. — 2008. — Vol. 46, № 6. — P. 1919–1924.

95. Comparison of the *in vitro* activities of ammonium humate and of enzymically oxidized chlorogenic and caffeic acids against type 1 and type 2 human herpes virus / K.D. Thiel [et al.] // Pharmazie. — 1981. — Vol. 36, № 1. — P. 50–53.

96. Therapeutic effect of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine, caffeic acid oxidation product, and trisodiumphosphonoformate on cutaneous herpes simplex virus type 1 infection in guinea pigs / B. Helbig [et al.] // J. Med. Virol. — 1987. — Vol. 23, № 3. — P. 303–309.

97. *In vitro* permeation through porcine buccal mucosa of caffeic acid phenetyl ester (CAPE) from a topical mucoadhesive gel containing propolis / G.C. Ceschel [et al.] // Fitoterapia. — 2002. — Vol. 73, suppl. 1. — S. 44–52.

98. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro* / G.F. Wang [et al.] // Antiviral Res. — 2009. — Vol. 83, № 2. — P. 186–190.

99. Antiretroviral agents as inhibitors of both human immunodeficiency virus type 1 integrase and protease / A. Mazumder [et al.] // J. Med. Chem. — 1996. — Vol. 39, № 13. — P. 2472–2481.

100. Alcohol potentiates hepatitis C virus replicon expression / T. Zhang [et al.] // Hepatology. — 2003. — Vol. 38, № 1. — P. 57–65.

101. Morphine enhances hepatitis C virus (HCV) replicon expression / Y. Li [et al.] // Am. J. Pathol. — 2003. — Vol. 163, № 3. — P. 1167–1175.

102. Bailly, F. Anti-HIV activities of natural antioxidant caffeic acid derivatives: toward an antiviral supplementation diet / F. Bailly, P. Cotelle // Curr. Med. Chem. — 2005. — Vol. 12, № 15. — P. 1811–1818.

103. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells / Y.J. Lee [et al.] // Biochem. Pharmacol. — 2003. — Vol. 66, № 12. — P. 228.

104. Apoptotic effect of caffeic acid phenethyl ester and its ester and amide analogues in human cervical cancer ME180 cells / M.W. Hung [et al.] // Anticancer Res. — 2003. — Vol. 23, № 6C. — P. 4773–4780.

105. Chlorogenic acid inhibits the replication and viability of enterovirus 71 *in vitro* / X. Li [et al.] // PLoS One. — 2013. — Vol. 8, № 9. — e76007.

106. Antiviral activities of purified compounds from Youngia japonica (L.) DC (Asteraceae, Compositae) / L.S. Ooi [et al.] // J. Ethnopharmacol. — 2006. — Vol. 106, № 2. — P. 187–191.

107. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds / P. Schnitzler [et al.] // Phytother. Res. — 2010. — Suppl. 1. — S. 20–28.

108. Echinacea species (Echinacea angustifolia (DC.) Hell., Echinacea pallida (Nutt.) Nutt., Echinacea purpurea (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties / J. Barnes [et al.] // J. Pharm. Pharmacol. — 2005. — Vol. 57, № 8. — P. 929–954.

109. Echinacea alkylamides inhibit interleukin-2 production by Jurkat T cells / M. Sasagawa [et al.] // Int. Immunopharmacol. — 2006. — Vol. 6, № 7. — P. 1214–1221.

110. Anti-herpetic properties of hydroalcoholic extracts and pressed juice from Echinacea pallida / S. Schneider [et al.] // Planta Med. — 2010. — Vol. 76, № 3. — P. 265–272.

111. Resveratrol attenuates radiation damage in caenorhabditis elegans by preventing oxidative stress / K. Ye [et al.] // J. Radiat. Res. (Tokyo). — 2010. — Vol. 51, № 4. — P. 473–479.

112. 3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene (resveratrol) inhibits human cytomegalovirus replication and virus-induced cellular signaling / D.L. Evers [et al.] // Antiviral Res. — 2004. — Vol. 63, № 2. — P. 85–95.

113. Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication / J.J. Docherty [et al.] // Antiviral Res. — 1999. — Vol. 43, № 3. — P. 145–155.

114. Resveratrol inhibition of varicella-zoster virus replication *in vitro* / J.J. Docherty [et al.] // Antiviral Res. — 2006. — Vol. 72, № 3. — P. 171–177.

115. Resveratrol inhibits Epstein Barr Virus lytic cycle in Burkitt's lymphoma cells by affecting multiple molecular targets / A. De Leo [et al.] // Antiviral Res. — 2012. — Vol. 96, № 2. — P. 196–202.

116. Resveratrol suppresses nuclear factor-kappaB in herpes simplex virus infected cells / S.A. Faith [et al.] // Antiviral Res. — 2006. — Vol. 72, № 3. — P. 242–251.

117. Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice / J.J. Docherty [et al.] // Antiviral Res. — 2004. — Vol. 61, № 1. — P. 19–26.

118. Effect of resveratrol on herpes simplex virus vaginal infection in the mouse / J.J. Docherty [et al.] // Antiviral Res. — 2005. — Vol. 67, № 3. — P. 155–162.

119. Portuguese winemaking residues as a potential source of natural anti-adenoviral agents / A.A. Matias [et al.] // Int. J. Food Sci. Nutr. — 2010. — Vol. 61, № 4. — P. 357–368.

120. *In vitro* experimental study on the effect of resveratrol against several kinds of respiroviruses / W.D. Guan [et al.] // Zhong Yao Cai. — 2008. — Vol. 31, № 9. — P. 1388–1390.

121. Resveratrol exhibits a strong cytotoxic activity in cultured cells and has an antiviral action against polyomavirus: potential clinical use / V. Berardi [et al.] // J. Exp. Clin. Cancer Res. — 2009. — Vol. 28. — P. 96.

122. Vaccinia virus virulence factor N1L is a novel promising target for antiviral therapeutic intervention / A.V. Cheltsov [et al.] // J. Med. Chem. — 2010. — Vol. 53, № 10. — P. 3899–3906.

123. Comparative inhibitory activity of the stilbenes resveratrol and oxyresveratrol on African swine fever virus replication / I. Galindo [et al.] // Antiviral Res. — 2011. — Vol. 91, № 1. — P. 57–63.

124. Campagna, M. Antiviral activity of resveratrol / M. Campagna, C. Rivas // Biochem. Soc. Trans. — 2010. – Vol. 38. — P. 50–53.

125. Anti-HIV-1 activity of resveratrol derivatives and synergistic inhibition of HIV-1 by the combination of resveratrol and decitabine / C.L. Clouser [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. — 2012. — Vol. 22, № 21. — P. 6642–6646.

126. An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus / M. Nakamura [et al.] // World J. Gastroenterol. — 2010. — Vol. 16, № 2. — P. 184–192.

## ANTIVIRAL PROPERTIES OF NATURAL ORIGIN SUBSTANCES

*Boreko E.I.*

*State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

A review of the world scientific periodicals data on antiviral properties of natural substances, mainly of plant origin is presented. Extracts and individual substances of many plants used in food have antiviral properties. Most of the substances of the plant chemical composition are complex polyphenolic compounds, are the predominant group of flavonoids. All of these substances are considered potentially have antioxidant properties, and this is due their multi-drug action. The antiviral properties of the most common compounds (quercetin, catechins, curcumin, caffeic acid, resveratrol) described in more detail.

**Keywords:** antiviral properties, flavonoids, quercetin, catechins, curcumin, caffeic acid, resveratrol

Поступила 01.09.2015

## КОЛЛЕКЦИЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ: НЫНЕШНЕЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

*Корень С.В., Кабанова Ю.А., Антоневич Н.Г., Дуж Е.В., Гончаров А.Е., Шиманович В.П., Горбунов В.А.*

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

**Реферат.** Представлена информация о коллекции культур клеток, созданной в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, принципах ее организации, исследованиях, методах контроля качества, перспективах развития

**Ключевые слова:** перевиваемые линии клеток, криоконсервация, видоспецифичность, кариотип.

**Введение.** Культуры клеток используются в различных областях биологии и медицины для диагностики вирусных инфекций, изучения процессов клеточного деления, дифференцировки и регуляции экспрессии генов, для выявления молекулярных механизмов канцерогенеза и наследственных заболеваний человека, а также для создания диагностических препаратов и вакцин и др.

Для получения культур клеток, изучения их морфофункциональных свойств, накопления биомассы и хранения, а также для обеспечения клеточным материалом учреждений здравоохранения, научных лабораторий и других учреждений создаются Национальные коллекции клеточных культур. Наиболее крупными мировыми коллекциями являются: ATCC — Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection) и ECACC — Европейская коллекция клеточных культур (European Collection of Cell Cultures). Существуют такие коллекции во многих странах Европы (Германия, Великобритания, Россия и др.) и Азии (Япония, Китай).

Как правило, Национальные коллекции получают целевое государственное финансирование или финансовую поддержку от крупных биотехнологических и фармацевтических компаний, использующих клеточные культуры для производства биологически активных соединений.

Неотъемлемой частью коллекции является криобанк эталонных культур клеток человека и животных. Депонированные в криобанк культуры должны быть паспортизованы, охарактеризованы кариологически, по культурально-морфологическим свойствам, отсутствию контаминации бактериями, дрожжеподобными грибами, микоплазмами, вирусами, чувствительности к вирусам, по продукции гормонов, ферментов и др. [1–4].

В государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии) при лаборатории иммунологии и клеточной биотехнологии создана «Коллекция перевиваемых клеток человека и животных для диагностики инфекционных заболеваний». Коллекция создана в соответствии с приказом РНПЦ эпидемиологии и микробиологии от 22.04.2015 № 26 «О создании коллекции культур клеток человека и животных». В данный момент коллекция насчитывает 55 линий клеток человека и животных (таблица 1).

Таблица 1. — Перечень линий клеток, входящих в «Коллекцию перевиваемых клеток человека и животных» при РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

| № | Наименование | Происхождение |
|---|---|---|
| 1 | 46-47 | Африканская зеленая мартышка, почка |
| 2 | A-172 | Человек, глиобластома |
| 3 | BGM | Африканская зеленая мартышка, почка |
| 4 | C6 | Крыса, глиома |
| 5 | C8166 | Человек, Т-лимфобластный лейкоз |
| 6 | CaCo-2 | Человек, аденокарцинома ободочной кишки |
| 7 | CCRF-SB | Человек, острый лимфобластный лейкоз (В-клетки) |
| 8 | CEM.NKR | Человек, Т-лимфобластный лейкоз |
| 9 | CEM-SS | Человек, Т-лимфобластный лейкоз |
| 10 | Daudi | Человек, лимфома Беркитта |
| 11 | EL-4 | Мышь, лимфома, индуцированная диметилбензантраценом |
| 12 | FL | Человек, амнион |
| 13 | FRhK-4 | Макака-резус, почка |
| 14 | HaCaT | Человек, иммортализованные кератиноциты |
| 15 | HEK-293 | Человек, почка эмбриона |
| 16 | Hela M | Человек, эпителиоподобная карцинома шейки матки |
| 17 | HEP-2 | Человек, эпидермоидная карцинома гортани |
| 18 | HL-60 | Человек, промиелоцитарный лейкоз |

Окончание таблицы 1

| № | Наименование | Происхождение |
|---|---|---|
| 19 | HuTu 80 | Человек, аденокарцинома двенадцатиперстной кишки |
| 20 | IM-9 | Человек, миелома |
| 21 | IMR-32 | Человек, нейробластома |
| 22 | Jurkat | Человек, Т-лимфобластный лейкоз |
| 23 | Jurkat-tat | Человек, Т-лимфобластный лейкоз |
| 24 | KG-1 | Человек, острый миелоидный лейкоз |
| 25 | L929 | Мышь, эмбрион |
| 26 | L1210 | Мышь, асцитная жидкость (лимфобластный лейкоз) |
| 27 | Ma-104 | Макака-резус, почка эмбриона |
| 28 | McCoy B | Мышь, клетки синовиальной жидкости |
| 29 | MDCK | Собака, почка |
| 30 | MDCK (NBL) | Собака, почка |
| 31 | Molt-3 | Человек, Т-лимфобластный лейкоз |
| 32 | Molt-4 | Человек, Т-лимфобластный лейкоз |
| 33 | Molt-4 Клон 8 | Человек, Т-лимфобластный лейкоз |
| 34 | MT-2 | Человек, Т-лимфобластный лейкоз |
| 35 | MT-4 | Человек, Т-лимфобластный лейкоз |
| 36 | NFS-60 | Мышь, миелоидный лейкоз |
| 37 | OKP-GS | Человек, карцинома почки |
| 38 | P388D1 | Мышь DBA/2, лимфоидная неоплазма |
| 39 | P3X63Ag8.653 | Мышь BALB/c, миелома, клон линии P3X63Ag8 |
| 40 | PA-1 | Человек, тератокарцинома яичника |
| 41 | Raji | Человек, лимфома Беркитта |
| 42 | RD | Человек, эмбриональная рабдомиосаркома |
| 43 | RPMI-1788 | Человек, лейкоциты периферической крови здорового донора |
| 44 | T24 | Человек, карцинома мочевого пузыря |
| 45 | U-2 OS | Человек, остеосаркома |
| 46 | U-251 | Человек, глиома |
| 47 | U-937 | Человек, гистиоцитарная лимфома |
| 48 | Vero | Африканская зеленая мартышка, почка |
| 49 | Vero (V) | Африканская зеленая мартышка, почка, сублиния Vero |
| 50 | ZR-75-1 | Человек, рак молочной железы |
| 51 | СПЭВ | Свинья, почка эмбриона |
| 52 | CV-1 | Африканская зеленая мартышка, почка |
| 53 | HCT-116 | Человек, карцинома толстой кишки |
| 54 | THP-1 | Человек, острый моноцитарный лейкоз |
| 55 | MDBK (NBL-1) | Бык домашний, почка |

Коллекция постоянно пополняется за счет новых поступлений. Так, с мая 2013 г. по июнь 2015 г. коллекция пополнилась 34 культурами клеток. Расширение коллекции определяется запросами фундаментальных исследований и практическими задачами здравоохранения. В коллекцию входят культуры клеток человека (перевиваемые, диплоидные, монослойные и суспензионные лимфобластоидные) и многих видов животных (обезьян, крысы, мыши, собаки, домашней свиньи, домашнего быка). Данные культуры клеток используются в вирусологии для диагностики вирусных инфек-

ций, в иммунологии, биотехнологии, иммунофармакологии, а также для фундаментальных и прикладных научных исследований в медицине и биологии.

Разработаны технологии формирования и поддержания эталонного коллекционного фонда путем исследования культур клеток человека и животных после их восстановления из условий глубокого замораживания по основным оценочным критериям их качества: жизнеспособности, пролиферативной активности и наличию контаминации микроорганизмами. Осуществляется разработка оптимальных методов хранения, стандартизации клеточных линий, включая определение их биологических свойств. Разработаны режимы криогенизации применительно к конкретным культурам. Особое внимание уделяется стабильности культурально-морфологических, кариологических и других свойств культур клеток, в частности чувствительности к вирусам и бактериям. У большинства культур охарактеризован иммунофенотип и экспрессия ряда транскрипционных факторов.

**Контроль жизнеспособности.** После размораживания культур может наблюдаться снижение жизнеспособности клеток или их полная гибель. Причиной могут служить один или несколько факторов, а именно: изначальное состояние клеток перед заморозкой, состав среды для криоконсервирования, условия замораживания, температурные условия хранения и др. Жизнеспособность клеток после разморозки, как правило, оценивают рутинной окраской витальным красителем (0,4%-м раствором трипанового синего), с использованием интеркалирующих красителей (пропидия иодид, 7-аминоактиномицин Д, To-Pro и пр.) и последующим учетом на проточном цитометре, а также по способности к формированию монослоя при пересевах. В дальнейшем при культивировании жизнеспособность подтверждается на основании высокой пролиферативной активности клеток (пролиферативную активность выражают индексом пролиферации — отношением количества выросших клеток к посеянным) в субпассажах, их способности к формированию монослоя в характерные сроки и наличия исходных морфологических данных, соответствующих их исконным первоначальным характеристикам.

Оценку апоптоза клеток осуществляют по связыванию аннексина V, конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом.

Все депонированные в криобанк линии клеток во время культивирования имели типичную морфологию, не проявляли признаков цитодеструкции, индекс пролиферации увеличивался в пассажах, что говорит об адаптации культур после хранения в жидком азоте и оптимальных культуральных условиях.

**Контроль контаминации.** Для исключения присутствия в культурах бактерий и дрожжеподобных грибов используют рутинные бактериологические методы, применяя следующие питательные среды: тиогликолевая среда, питательный бульон и питательный агар с 5%-й глюкозой, среда Сабуро твердая. Данный показатель постоянно контролируется и производится выбраковка культур не соответствующих данному оценочному критерию.

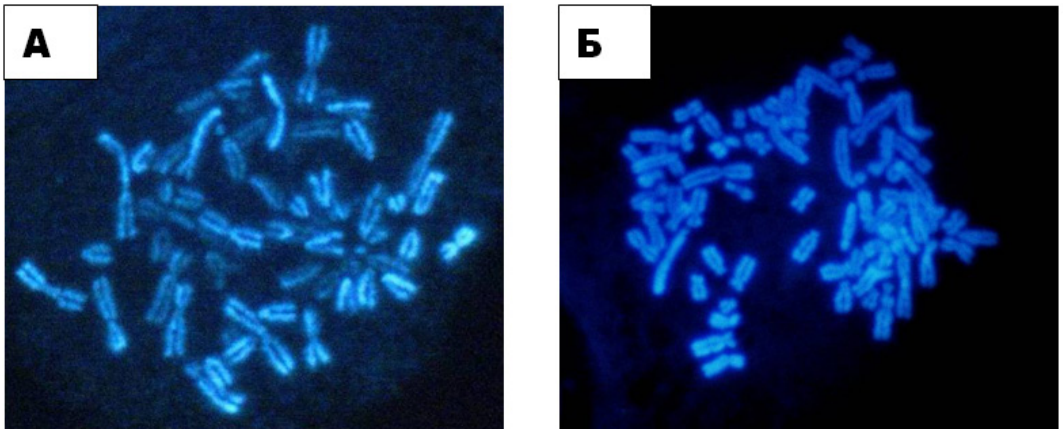
В рамках выполнения научных программ многие линии клеток были проверены на присутствие наиболее скрытого контаминанта клеточных культур — микоплазмы, которая в конечном счете приводит к гибели культуры при ее субпассировании и служит потенциальным источником артефактов в вирусологических, цитологических и биохимических исследованиях. Микоплазменная инфекция поражает как первичные (около 4%), так и перевиваемые (до 57-92%) культуры клеток. Зачастую при контаминации микоплазмами не выявляются видимые морфологические изменения, но происходит замедление роста клеток и ухудшение их адгезивной способности. При остром течении микоплазменной инфекции происходит резкое закисление среды, раннее отторжение от стекла с образованием дефектов монослоя уже на 3–4-е сут роста. Также наблюдается изменение морфологии клеток: зернистость цитоплазмы, кареорексис и пикноз ядер [5].

Одним из эффективных методов обнаружения микоплазм является экспресс-диагностика с применением красителя Hoechst 33342. В окрашенных препаратах при просмотре в люминесцентном микроскопе при наличии микоплазм над цитоплазмой и в межклеточных пространствах видны яркие точкоподобные образования, иногда в виде скоплений или нитевидных структур. При использования данного метода не выявлено присутствия микоплазм в исследуемых культурах.

**Кариологический контроль.** Анализ хромосомного набора клеток позволяет контролировать природу культивируемых клеток, что делает возможным обнаружение взаимной контаминации различных линий клеток. При длительном культивировании в условиях *in vitro* клетки могут изме-

нять свой хромосомный набор, могут возникнуть различные хромосомные нарушения, что также необходимо контролировать. Для анализа присутствующих в клетках хромосом (кариотипирование) в культуры добавляют колхицин, чтобы блокировать делящиеся клетки в стадии метафазы. В метафазных клетках достаточно легко выявить общую массу хромосом, но трудно различить индивидуальные хромосомы. Для лучшего расхождения хромосом клетки выдерживают в гипотоническом растворе, затем клетки снимают и фиксируют.

В результате исследований проанализированы кариотипы ряда клеток. Для каждой культуры анализировали не менее 30 метафаз. В результате исследований был подтвержден кариотип, присущий каждой культуре клеток, не выявлено каких-либо хромосомных нарушений (рисунок 1).




Люминесцентная микроскопия, ув. 1000×

**Рисунок 1. — Метафазные пластинки культур клеток McCoy B (А) и MA-104 (Б)**

**Контроль иммунофенотипа.** Для повышения эффективности иммунотерапии или научных исследований иногда необходимо применять определенные типы клеток, характеризующиеся высокой экспрессией определенных поверхностных и внутриклеточных маркеров. Поэтому контроль иммунофенотипа методом проточной цитофлуориметрии имеет большое значение для субклассифицирования типов клеток. В рамках исследований по тестированию лекарственных средств подгруппы иммуностимуляторов дана характеристика Т-клеточных (C8166, CEM-SS, CEM.NKR, Molt-3, Molt-4, Molt-4 клон 8, Jurkat, Jurkat-tat, MT-2 и MT-4) и В-клеточных культур (IM-9, Daudi и CCRF-SB) по экспрессии поверхностных маркеров, транскрипционных факторов, регуляторных белков и провоспалительных цитокинов. Для оценки иммунофенотипа анализировали экспрессию ряда молекул, наиболее важных для определения стадий дифференцировки Т- и В-клеток и оценки функционального потенциала.

**Контроль видовой принадлежности и кросс-контаминации.** Одной из серьезнейших проблем, с которой сталкиваются исследователи, является кросс-контаминация и неправильная идентификация клеточных линий, дающие, как правило, ложные результаты исследования. Наиболее известным и эффективным методом периодического контроля клеточных линий на предмет соответствия исходной видовой принадлежности и возможной контаминации клетками другого вида является ПЦР. На ее основе разработан ряд маркеров, которые в полной степени могут охарактеризовать отдельно взятый вид и популяцию.

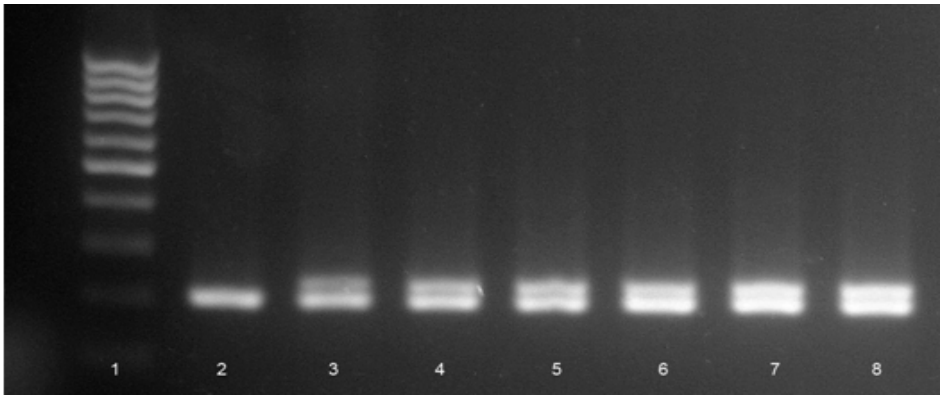
Нами оптимизированы условия постановки мультиплексной ПЦР для определения видовой принадлежности культур клеток и их межвидовой контаминации. Для разработки видоспецифичной ПЦР нами были выбраны участки гена cytb митохондриальной ДНК, кодирующие белки оксидазы цитохрома b, D-петлю и участок гена рибосомальной РНК 16S. Видовую принадлежность оценивали исходя из длин амплифицированных фрагментов ДНК после их визуализации в 2%-м агарозном геле.

На рисунке 2 показаны фрагменты, полученные при амплификации смесью видоспецифических праймеров ДНК, выделенных из 3 различных культур клеток: 2 — отрицательный контроль;

3–5 — ампликоны ДНК Hela-M (3), СПЭВ (4), MDCK (5); 6 — ДНК 3 культур, амплифицированная смесью видоспецифических праймеров к данным культурам

Для оценки чувствительности метода клетки Hela-M добавляли к клеткам MDCK в количестве 0; 1; 2; 5; 10; 25 и 50% соответственно.

На рисунке 2 показаны ампликоны длиной 196 п.о. (MDCK) и 228 п.о. (Hela-M).




1 — маркер 100 п.о.; 2 — 0%; 3 — 1%; 4 — 2%; 5 — 5%; 6 — 10%; 7 — 25%; 8 — 50%

**Рисунок 2. — Гель-электрофорез продуктов мультиплексной ПЦР, полученных при заражении культур клеток MDCK клетками Hela-M**

Показано, что для данных условий постановки полимеразной цепной реакции чувствительность составляла не менее 1000±50 кл/мл. При проведении реакции на определение межвидовой контаминации специфические фрагменты ДНК были детектированы во всех культурах, экспериментально контаминированных клетками Hela-M (1–50%).

**Криоконсервация.** Выживаемость клеток при криоконсервации зависит от их исходных физиологических свойств, состава консервирующей среды, а также режима замораживания. Поэтому для сохранения генофонда коллекционных клеточных линий были отработаны оптимальные условия их криоконсервации [6]. Для этого отбирают культуры в логарифмической фазе роста с сформированным монослоем с характерной для данных культур морфологией. Клетки снимают с флакона и переводят в суспензию общепринятым методом при помощи раствора трипсина-версена в соотношениях, указанных в паспортах. С целью сохранения наибольшей жизнеспособности клеток во время длительного хранения в жидком азоте в состав криосреды включают 8–10% высокоочищенного диметилсульфоксида (DMSO), необходимую для конкретной культуры клеток питательную среду, а также большое содержание сыворотки эмбрионов коров, которое составляло 30–70%.

Концентрацию клеток доводят до 3–5 млн/мл и разливают в специальные пробирки (виалы), предназначенные для хранения клеток в жидком азоте. Криоконсервацию клеток осуществляют с помощью программируемого замораживателя клеток Cryomed 7452 («Thermo Scientific», США), используя следующие временные и температурные режимы:

1. 10°/мин до +4°C;
2. 1°c/мин до -25°C,
3. 12°/мин до -90°C.

Затем помещают пробирки в криохранилище с жидким азотом (-196°C).

После восстановления культур их ультраструктура отличается от культур, не подвергшихся замораживанию. Наблюдаются образование хлопьев хроматина на фоне просветленного матрикса ядра, расслоение ядерной мембраны, вакуолизация цитоплазмы, набухание рибосом, фрагментирование крист и др. Однако при пассировании эти явления исчезают и культуры 3–5 пассажей не отличимы от клеток исходной культуры. От пассажа к пассажу увеличивается и индекс пролиферации, пока не достигнет исходного уровня, характерного для данной культуры.

**Достижения и перспективы развития.** Информация о Коллекции включена в сводный каталог Российской коллекции клеточных культур (ФГБУН Институт цитологии РАН) и доступна по адресу: http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/rkkk_ru.htm.

В настоящее время на 8 культур получены регистрационные удостоверения (таблица 2), в 2015 г. ожидается получение удостоверений еще на 5 культур клеток (Daudi, Jurkat-tat, MT-2, McCoy B, FRhK-4).

В лаборатории культуры клеток применяются как для научных исследований (в данный момент активно ведутся работы по применению лимфоидных и миелоидных линий клеток для тестирования лекарственных средств подгруппы иммуностимуляторов), так и для обеспечения учреждений здравоохранения и научных лабораторий клеточным материалом. Так, наиболее востребованными являются линии клеток: BGM, Fl, HeLa, Vero, СПЭВ, McCoy B.

В дальнейшем планируется расширение коллекции за счет новых поступлений клеток, регистрация востребованных культур, создание коллекции первичных культур и стволовых клеток, а также освоение, разработка, адаптация и внедрение новых методов контроля качества культур клеток.

Таблица 2. — Перечень культур клеток, имеющих регистрационное удостоверение

| Наименование | Номер регистрационного удостоверения |
|---|---|
| Культура клеток почечной ткани обезьяны BGM | № ИМ-7.97032 |
| Культура клеток почки собаки перевиваемая MDCK | № ИМ-7.94995/1407 |
| Культура клеток амниона человека перевиваемая FL | №ИМ-7.94993/1407 |
| Культура клеток легочной ткани кролика RL-33 | №ИМ-7.101886 |
| Культура клеток эпителиоидной карциномы шейки матки человека HeLa | №ИМ-7.101883 |
| Культура клеток почечной тканиэмбриона свиньи СПЭВ | №ИИМ-7.101885 |
| культура клеток почки эмбриона макаки-резуса МА-104 | №ИИМ-7.101865 |
| Культура клеток почки африканской зеленой мартышки Vero E6 | №ИИМ-7.101867 |

**Литература**

1. Применение культур клеток для вирусологических исследований / Р.Я. Подчерняева [и др.] // Клеточные культуры: информ. бюл. / Институт цитологии РАН. — СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2014. — Вып. 30. — С. 56–71.

2. Interlab cell line collection: bioresourse of established human and animal cell lines [Electronic resource] / B. Parodi [et al.] // Open J. Bioresour. — 2015. — Mode of access: http://doi.org/10.5334/ojb.ah. — Date of access: 19.06.2015.

3. Public biobanks: calculation and recovery of costs [Electronic resource] / B. Clement [et al.] // Sci. Transl. Med. — 2014. — Vol. 6. — P. 261fs45. — Mode of access: http://stm.sciencemag.org/content/6/261/261fs45.full. — Date of access: 19.06.2015.

4. Biomedical tissue culture / Eds.: L. Ceccherini-Nelli, B. Matteoli. — In Tech, 2012. — 248 p.

5. Young. L. Detection of Mycoplasma in cell cultures / L. Young // Nat. Prot. — 2010. — Vol. 5. — P. 929–934.

6. Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes / D. Lermen [et al.] // Mol. Ecol. — 2009. — Vol. 18, № 6. — P. 1030–1033.

## COLLECTION OF HUMAN AND ANIMAL CELL LINES OF REPUBLICAN RESEARCH & PRACTICAL CENTER FOR EPIDEMIOLOGY & MICROBIOLOGY: CURRENT STATE AND PROSPECTS

*Koran S.V., Kabanova Y.A., Antonevich N.G., Duzh E.V., Hancharou A.Y., Shimanovich V.P., Harbunou V.A.*

*State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

There is information concerning collection of cell cultures, organized in the RRPC for Epidemiology and Microbiology, the principles of its organization, conducted research, quality control methods, perspectives of development

**Keywords:** continuous cell lines, cryopreservation, species specificity, karyotype.

Поступила 16.09.2015

# ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ ЛИНИЯМИ КЛЕТОК МИЕЛОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*Дуж Е.В., Гончаров А.Е.*

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

**Реферат.** Проведен углубленный анализ экспрессии поверхностных маркеров клеточных линий миелоидного происхождения:HL-60 (человек, промиелоцитарный лейкоз), KG-1 (человек, острый миелоидный лейкоз), U-937 (человек, гистиоцитарная лимфома), THP-1 (человек, острый моноцитарный лейкоз). Для дальнейших экспериментов выбрана линия клеток THP-1, экспрессирующая наиболее полный набор молекул распознавания, адгезии и антигенпредставления.

**Ключевые слова:** иммуномодуляторы, миелоидные линии, перевиваемая культура клеток.

**Введение.** В настоящее время разработка и внедрение в производство лекарственных средств, обладающих иммуномодулирующим действием, осуществляется быстрыми темпами [1, 2]. Оценка биологической активности новых лекарственных средств с иммуномодулирующим действием является необходимой стадией их исследования на доклиническом этапе. Применение гемопоэтических перевиваемых клеточных линий человека является наиболее перспективным подходом для экспериментальных доклинических испытаний новых иммуномодуляторов [3]. Главное преимущество использования гемопоэтических линий заключается в высокой повторяемости и воспроизводимости результатов, возможности стандартизации и автоматизации условий проведения эксперимента [4].

Несмотря на то, что выбранные для исследования линии клеток хорошо известны, профиль экспрессии этими культурами ряда адгезивных, костимуляторных, коингибиторных молекул, рецепторов, опосредующих распознавание молекулярных структур, описан недостаточно.

**Цель** исследования — сравнительный анализ иммунофенотипа клеточных линий миелоидного происхождения HL-60,KG-1, THP-1 и U-937.

**Материалы и методы.** *Объекты исследований.* В качестве объектов *in vitro* исследований были использованы 4 перевиваемые клеточные линии миелоидного происхождения: HL-60 (человек, промиелоцитарный лейкоз), KG-1 (человек, острый миелоидный лейкоз), U-937 (человек, гистиоцитарная лимфома), THP-1 (человек, острый моноцитарный лейкоз). Все клеточные линии по характеру роста являются суспензионными культурами. Клетки растили на питательной среде RPMI-1640, содержащей 10–20%-ю эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота (FCS), L-глютамин и пируват натрия в стерильных пластиковых вентилируемых флаконах в $CO_2$-инкубаторе при 37°C с содержанием 5%-го углекислого газа и относительной влажности 90%.

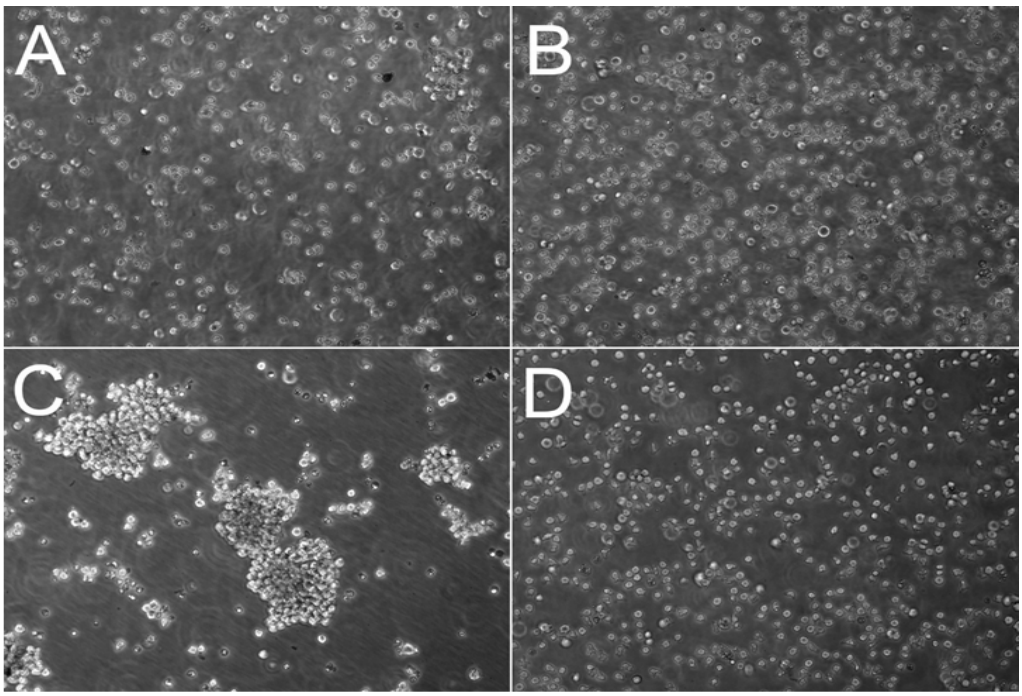
*Определение поверхностных молекул.* Иммунофенотип перевиваемых клеточных культур определяли методом проточной цитометрии. Для исследований были использованы моноклональные антитела к следующим антигенам человека: CD1a, CD1c, CD4, CD11b, CD11c,CD14,CD15,CD 16,CD31,CD32,CD34,CD36, CD40, CD45, CD54, CD64, CD80, CD83, CD86, CD106, CD123, CD205, CD206, CD209, CD273, CD274, CD282, CD284, HLA-DR и HLA-ABC. Клетки инкубировали с моноклональными антителами 15 мин при +4°C в темноте. Несвязавшиеся антитела отмывали путем центрифугирования в фосфатном буферном растворе. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в 300 мкл фосфатного буферного раствора и анализировали на проточном цитометре.

*Статистическая обработка данных* выполнена с использованием непараметрических методов статистики (критерий Шапиро–Вилка, Манна–Уитни). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

**Результаты и их обсуждение.** Микрофотографии исследованных линий клеток представлены на рисунке 1.

Все линии клеток имели типичную миелобластоидную или моноцитоподобную морфологию, из особенностей следует отметить склонность культуры клеток THP-1 к формированию микроколоний.

Был проведен сравнительный анализ антигенного профиля вышеуказанных линий клеток. Данные представлены в виде теплокарты с медианными значениями относительной интенсивности флуоресценции (рисунок 2).




A — HL-60; B — KG-1; C — THP-1; D — U937

**Рисунок 1. — Микрофотографии линий клеток (×100)**

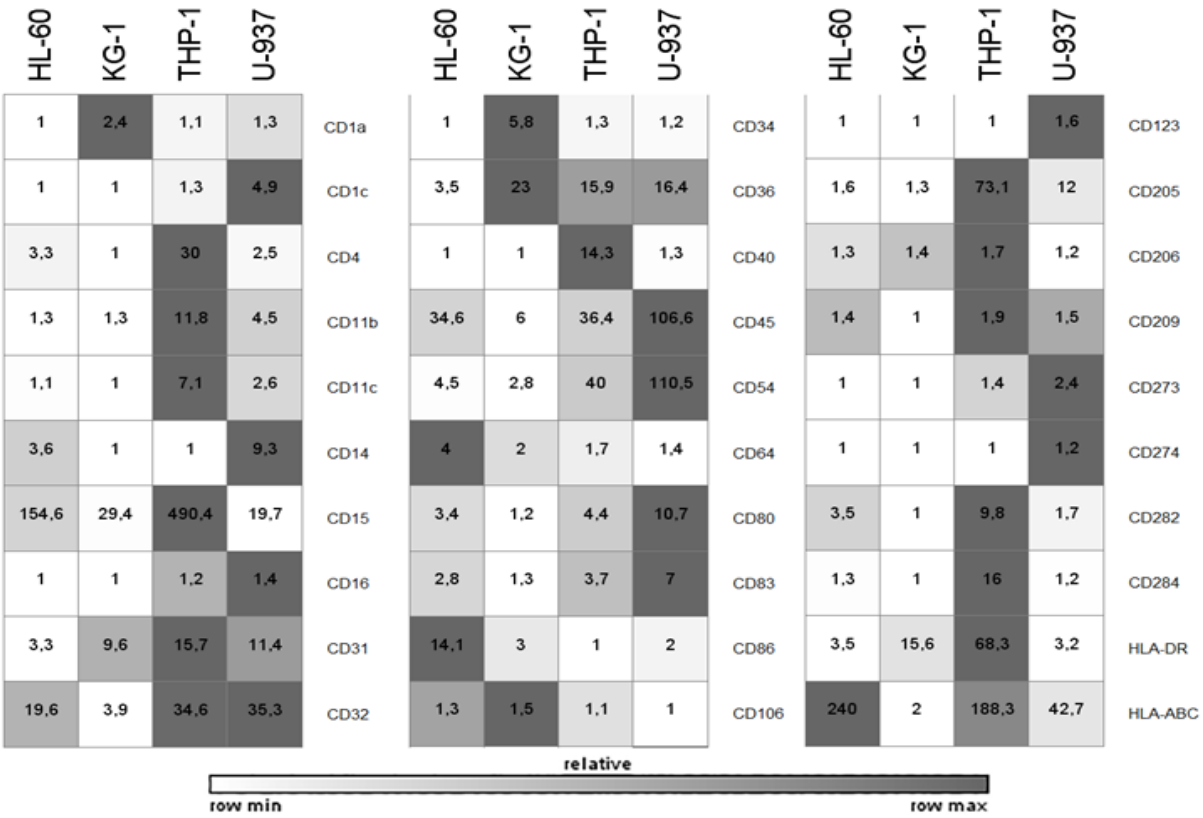



**Рисунок 2. — Теплокарта, иллюстрирующая сравнительную экспрессию поверхностных антигенов линиями клеток**

В процессе работы было установлено, что все исследуемые перевиваемые линии экспрессировали маркер гемопоэтических клеток — CD45. Линии клеток HL-60, THP-1 и U-937 экспрессировали молекулы HLA-ABC, что указывает на возможность иммунораспознавания и видовую специфичность. Экспрессия молекулы CD34, характеризующаяся как маркер стволовых клеток, в минимальном количестве присутствовала только на клеточной линии KG-1 (RFI = 5,8 усл. ед.), что может свидетельствовать о незрелости этой культуры. Экспрессия молекулы CD123 — рецептора к интерлейкину-3 — отсутствовала.

Принадлежность линий клеток к миелоидному ростку была подтверждена высокой экспрессией мембранного маркера CD15.

*Паттерн-ассоциированные рецепторы и схожие по функции молекулы.* К паттерн-ассоциированным рецепторам относятся белки, присутствующие на поверхности лейкоцитов, способные узнавать молекулярные структуры (паттерны), специфичные для больших групп патогенов [5].

Установлено, что всем исследованным клеточным линиям, кроме KG-1, присуща в разной степени экспрессия мембранных белков, относящихся к толл-подобным рецепторам CD282 (TLR2) и CD284 (TLR4) [6, 7]. При этом наиболее высокая экспрессия молекул CD272 и CD247 выявлена на клетках линии THP-1.

Экспрессия молекулы CD14 — корецептора к липополисахариду (вместе с TLR-4) — присутствовала только на клетках линий HL-60 и U-937.

Также следует отметить, что исследуемые линии имеют разную интенсивность экспрессии CD205 (DEC-205) — молекулы, осуществляющей распознавание клеток в стадии апоптоза, — RFI от 1,6 до 73,2 усл. ед.

Лишь на линии клеток THP-1 наблюдалась минимальная экспрессия маркера CD206 (MMR) — рецептора лектинового типа, который распознает концевые остатки маннозы на поверхности микроорганизмов. Схожий паттерн экспрессии выявлен также в отношении молекулы CD209 (DC-SIGN).

По представленным данным фенотипически клетки отличаются между собой и экспрессией мембранного белка CD36, который относится к классу B скэвенджер-рецепторов и представленный в основном на макрофагах [8]. Так, наименее интенсивно эту молекулу экспрессировали клетки линии HL-60 (3,5(2,2-4,1) усл. ед.), а экспрессия CD36 не отличалась достоверно между линиями клеток THP-1, KG-1 и U-937.

*FC-рецепторы.* FC-рецепторы — белки, экспрессируемые преимущественно клетками миелоидного происхождения, которые распознают иммуноглобулины одного или нескольких изотипов [9].

Поверхностная молекула CD32 (FcγRII), которая присутствует на всех антигенпрезентирующих клетках, характеризовалась достаточно высокой экспрессией представленными линиями клеток.

В то же время молекула CD64 (FcγRI) — высокоаффинный рецептор для мономерного IgG — присутствовала в значимом количестве только на мембране клеток линии HL-60 ($p < 0,01$), а низкоаффинный рецептор к IgG — CD16 (FcγRI) — не экспрессировался ни одной из исследованных линий клеток (RFI <1,5).

*Молекулы адгезии.* Молекулы адгезии представляют собой белки, связанные с поверхностной мембраной клетки, обеспечивающие взаимодействие клеток друг с другом [10].

Изученные нами линии характеризуются наличием адгезивных молекул CD11b, CD11c, CD54, характерных для всех лейкоцитов. В отличие от поверхностной молекулы CD106 (VCAM-1), которая экспрессируется на поверхности клеток в минимальных количествах, CD54 (ICAM-1) представлена в широком диапазоне (RFI от 2,8 до 110,5 усл. ед.). Наличие экспрессии CD11b (интегрин αM) и CD11c (интегрин αX) в миелоидных культурах наблюдалось только у THP-1 и U-937. Выявлена слабая экспрессия молекулы CD83 ——одного из важных маркеров созревания дендритных клеток [11].

Экспрессия мембранного белка CD31 (PECAM-1) — молекулы клеточной адгезии — наблюдалась на всех клеточных линиях в различном диапазоне их значений с максимумом 15,7 (14,1–17,5) усл. ед. на линии клеток THP-1 ($p <0,01$).

*Молекулы, участвующие в антигенпредставлении.* По нашим данным, изучаемые клетки миелоидных линий очень слабо экспрессировали MHC-подобные молекулы, такие как CD1a (HTA1) и CD1c (BDCA-1), которые играют существенную роль в презентации липидных антигенов. Так, выявлена лишь слабая экспрессия молекулы CD1a на линии KG-1 (RFI = 2,4) и CD1c на U-937 (RFI = 4,9).

Все линии клеток на своей поверхности экспрессировали молекулы ГКС II класса при максимальной экспрессии (RFI = 68,3 (62,1–72,9) усл. ед.) на клеточной линииTHP-1, что достоверно отличает эту линию клеток от других (HL-60 — 3,5 (3,1–3,9) усл. ед, KG-1 — 15,6 (14,8–16,1) усл. ед., U-937 — 3,2 (2,1–4,1) усл. ед, p <0,001).

*Костимуляторные и коингибиторные молекулы.* Костимуляторные молекулы входят в семейство B7, взаимодействие которых с молекулами CD28 и CD152 приводит к активации или торможению активности Т-хелперов [12]. Максимальная экспрессия молекулы CD80 установлена на клетках линии HL-60, а CD86 — клетками линии U-937.

В противоположность CD80 и CD86 молекулы CD273 (B7-DC) и CD274 (B7-H1), связываясь с PD-1, инициируют торможение функциональной активности клетки, в связи с чем получили название коингибиторные. Оценка иммунофенотипа исследуемых миелоидных культур показала практически полное отсутствие экспрессии коингибиторных молекул CD273 и CD274 на поверхностной мембране клеток.

Молекула CD40 (TNFRSF5) — рецептор CD154 — присутствовала исключительно на клетках линии THP-1 — 14,3 (12,7–15,1) усл. ед.

**Заключение.** Проведен сравнительный анализ иммунофенотипа 4 линий клеток, имеющих миелоидное происхождение, составлен профиль экспрессии поверхностных маркеров.

После исследований из всех миелоидных клеточных линий выбрана наиболее подходящая для изучения иммуномодулирующей активности лекарственных средств линия клеток — THP-1, экспрессирующая наиболее полный набор молекул распознавания, адгезии и антигенпредставления.

**Литература**

1.Лусс, Л.В. Место иммуномодуляторов в педиатрической практике / Л.В. Лусс // Педиатрия, приложение consilium medicum. — 2010. — № 3. — С. 72–76.

2.Synthetic and natural immunomodulators acting as interferon inducers / D. Silin [et al.] // Curr. Pharmaceut. Design. — 2009. — Vol. 15, № 3. — P. 1238–1247.

3.Руководство по проведению доклинических исследований / А.Н. Миронов [и др.]; под общ. ред. А.Н. Миронова. — М.: ГрифиК, 2012. — 944 с.

4.Marx, V. Models: stretching the skills of cell lines and mice / V. Marx // Nat. Meth. — 2014. — Vol. 11. — P. 617–620.

5.Taro, K. Review The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors / K. Taro // Nat. Immunol. — 2010. — Vol. 11. — P. 373–384.

6.TLR2 may influence the behavior of the malignant clone in B-CLL / H. Antosz [et al.] // Blood Cells Molec. Dis. — 2012. — Vol. 49, № 1. — P. 32–40.

7.Literatures Introducing of toll-like receptor 4 (TLR4), lipopolysaccharide (LPS) / M. Hongbao [et al.] // Rep. Opin. — 2014. — Vol. 6, № 11. — P. 26–37.

8.CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer / C. Stewart [et al.] // Nat. Immunol. — 2010. — Vol. 11, № 3. — P. 155–161.

9.Hogarth, P.M. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond / P.M. Hogarth // Nat. Rev. Drug Discov. — 2012. — Vol. 11. — P. 311–331.

10. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules / J. Calixto [et al.] // Planta Medica. — 2004. — Vol. 70, № 3. — P. 93–103.

11. Human dendritic cell line models for DC differentiation and clinical DC vaccination studies / J. Saskia [et al.] // J. Leukocyte Biol. — 2008. — Vol. 84, № 3. — P. 1364–1373.

12. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells / A. Nakazawa [et al.] // Gastroenterology. — 2004. — Vol. 126, № 5. — P. 1347–1357.

## CELL SURFACE MARKER EXPRESSION PROFILE OF MYELOID CELL LINES

*Duzh E.V., Hancharou A.Y.*

*State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

The myeloid lineage cell lines HL-60 (human, promyelocytic leukemia), KG-1 (human, acute myeloid leukemia), U-937 (human, histiocytic lymphoma), THP-1 (human, acute monocytic leukemia)

were subjected to comparative analysis of its phenotype profile. The results show that cell line THP-1 express the most comprehensive set of surface markers involved in molecular recognition, adhesion and antigen presentation. This line was selected for future studies.

**Keywords:** immunomodulators, myeloid line, continuous cell culture.

Поступила 22.09.2015

# РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ АПРОБАЦИИ АЛГОРИТМА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ПОЛИОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У РЕЦИПИЕНТОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

*Богуш З.Ф., Амвросьева Т.В., Дедюля К.Л., Поклонская Н.В., Лозюк С.К.*

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

**Реферат.** В статье представлены результаты апробации разработанного алгоритма генодиагностики полиомавирусной инфекции человека в отношении наиболее значимых ее возбудителей — ВК и JC вирусов на клиническом материале (моча, кровь) взрослых и детей — реципиентов гемопоэтических стволовых клеток.

**Ключевые слова:** полиомавирусная инфекция, ВК вирус, JC вирус, полимеразная цепная реакция, дифференциальная генодиагностика.

**Введение.** Среди 10 известных представителей рода *Poliomavirus* клинический интерес представляют ВК вирус и JC вирус, ассоциируемый с развитием прогрессивной мультифокальной лейкоэнцефалопатии. Это ДНК-содержащие вирусы, способные к интеграции в генетический материал клетки с последующей пожизненной персистенцией в них [1]. В нашей стране эпидемиологические аспекты циркуляции этих вирусных патогенов в человеческой популяции практически не изучены. По зарубежным данным, ВК и JC вирусы убиквитарны, ими инфицировано от 70 до 90% взрослого населения [2]. Первичное инфицирование происходит в молодом возрасте, протекает бессимптомно и переходит в латентную форму инфекции. Активация полиомавирусов наступает в условиях иммуннодефицита, в связи с чем вызванные ими инфекции относят к оппортунистическим. Данные инфекции особенно актуальны для пациентов с ослабленным иммунитетом. Так, при пересадке костного мозга они могут быть причиной развития геморрагического цистита, у реципиентов почечного аллографта — вызвать нефропатию и привести к потере трансплантата, у ВИЧ-инфицированных пациентов — вызвать энцефалит [3].

Настоящая работа содержит информацию о результатах обследования двух групп реципиентов гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) — детей и взрослых на предмет активации ВК и JC вирусных инфекций согласно разработанному нами алгоритму дифференциальной генодиагностики полиомавирусной инфекции (ПВИ).

**Материалы и методы.** Исследовано 367 образцов клинического материала (183 образца сыворотки крови и 184 образца мочи) от 32 реципиентов детского возраста, которые были получены из РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, и 262 образца клинического материала (131 образец сыворотки крови и 131 образец мочи) от 46 взрослых реципиентов ГСК, полученных из отделения пересадки костного мозга УЗ «9-я городская клиническая больница» и РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии.

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 «РИБОпреп» («Амплисенс», РФ).

Детекцию ДНК ВК и JC вирусов осуществляли с помощью ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени. Использовали реакционную смесь, содержащую 10х буфер для Taq-полимеразы, 6 mM $MgCl_2$, смесь дезоксинуклеоти-

дов 200 мкмоль, 2,5 ед. Taq-полимеразы («PrimeTech»,Беларусь), по 15 pmol прямого (PM2+) и обратного (PM2-) праймеров, по 10 pmol гибридизационных зондов (BKVp — FAM и JCVp — ROX) [4], синтезированных фирмой Sintol (РФ). В качестве положительного контроля для ПЦР детекции ДНК ВК вируса использовали плазмиду pUC18/BK в концентрации $7{,}65\times10^3$ копий/мл, для ПЦР детекции ДНК JC вируса — плазмиду pUC18/JC в концентрации 1×104 копий/мл. В качестве отрицательного контроля — ТЕ-буфер.

Температурный и временной профиль реакции: 45 циклов денатурации (95°С в течение 15 с) и объединенной стадии отжига-элонгации (55°С в течение 40 с).

Постановку ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторах RotorGene 3000 и 6000 (Corbett Life Sciences, Австралия) и CFX 96 Real-Time System (Bio-Rad, США).

**Результаты и их обсуждение.** С целью внедрения накопленного опыта лабораторной генодиагностики ПВИ при пересадке ГСК в практическое здравоохранение нами разработан алгоритм обследования пациентов в посттрансплантационном периоде, включающий 3 основных этапа, на каждом из которых используется свой комплекс методов и диагностических маркеров. Поскольку о начале активации ПВИ прежде всего свидетельствует репликация ее возбудителей в моче (вирурия), то на первом этапе генодиагностики ПВИ у реципиентов ГСК осуществляется скрининг на ВК и JC вирурию. Положительный результат, полученный на этом этапе, позволяет предположить наличие у данного пациента риска развития ассоциированных с ПВИ осложнений. В случае выявления вирурии проводится следующий этап — обследование на виремию (выявление ДНК полиомавирусов в сыворотке крови). Наличие виремии является основанием для определения вирусной нагрузки (3-й этап обследования) методом количественной ПЦР. В качестве порогового значения вирусной нагрузки принято значение, составляющее 10000 копий/мл, что соответствует данным зарубежных исследователей [4–6]. При достижении этого показателя рекомендуется коррекция применяемой схемы лечения (снижение доз иммуносупрессивных препаратов и/или включение в нее противовирусных средств). Данная коррекция проводится под контролем количественной ПЦР для мониторинга уровней ВК/JC вирусной нагрузки.

В соответствии с вышеуказанным алгоритмом диагностических исследований динамическое наблюдение за активацией возбудителей ПВИ (ВК и JC вирусов) у реципиентов ГСК в посттрансплантационном периоде проводили на ограниченном контингенте реципиентов ГСК, включающего 32 пациента детского возраста и 46 взрослых.

Взрослую группу реципиентов ГСК составили пациенты с клиническими диагнозами острого миелоидного лейкоза (10), лимфомы Ходжкина (11), множественной миеломы (8), миелоидной болезни (3), неходжкинской лимфомы (5), апластической анемии (2) и острого лимфоидного лейкоза (7). Доля реципиентов, у которых была зарегистрирована реактивация ВК и/или JC вирусов, определяемая по наличию вирусспецифической ДНК в сыворотке крови (виремия) и/или моче (вирурия) хотя бы однократно за весь период наблюдения, составила 39,1% (18/46). При этом у 17 из них (37,0%) регистрировались маркеры ВК вирусной инфекции, у 4 (8,7%) — маркеры JC вирусной инфекции. Представленные на рисунке 1 результаты дифференциальной генодиагностики ПВИ взрослых реципиентов ГСК демонстрируют выявление ВК вирурии у 28,3% из них (у 13 пациентов). В 4,3% случаев (у 2 обследованных) отмечалось одновременное выявление ВК и JC вирурии, по 2,2 % пришлось на выявление ВК вирурии + ВК виремии (1 пациент), ВК вирурии + ВК виремии + JC вирурии (1 пациент) и JC вирурии (1 пациент). Таким образом, маркеры ВК вирусной инфекции определялись у подавляющего большинства всех позитивных взрослых реципиентов, что сопровождалось как ВК вирурией, так и ВК виремией, в то время как маркеры JC вирусной инфекции обнаруживались лишь в моче. Они были выявлены у 3 пациентов в сочетании с маркерами ВК вирусной инфекции. JC-моноинфекция была зарегистрирована только у одного пациента.

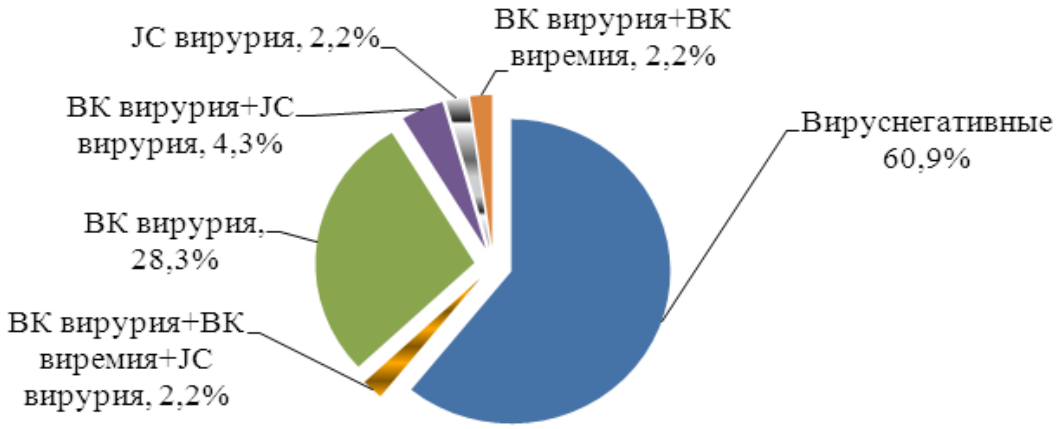



**Рисунок 1. — Результаты дифференциальной генодиагностики ПВИ у взрослых реципиентов ГСК**

Изучение кинетики ПВИ у взрослых реципиентов ГСК в течение 1 года после трансплантации осуществляли по следующей схеме: до 3 мес. — с интервалом в 2 недели (на 4, 14-е сут, через 1, полтора, 2, два с половиной и 3 мес.), с 3-го мес. и до 1 года — с интервалом в 3 мес. (6, 9, 12 мес.). До пересадки органа образцы крови и мочи отбирали однократно. Пик первичной реактивации ВК вирусной инфекции (рисунок 2А) в этой группе пациентов приходился на период 14 сут.–1 мес. после трансплантации (15,2–17,4% соответственно). При этом максимально поздние сроки выявления ВК вирурии не превышали 1,5 мес. В среднем сроки первичного обнаружения генетических маркеров ПВИ у взрослых реципиентов ГСК составили 21,4±10,3 сут. Регистрация ВК виремии отмечалась спустя 1,5–3,5 мес. после выявления ВК вирурии. Случаи первичной реактивации JC вирусной инфекции были немногочисленными, регистрировались как до трансплантации, так и в поздние (спустя 9 мес.) сроки после операции и носили транзиторный характер.

Кинетика развития ВК вирусной инфекции (рисунок 2Б) характеризовалась выраженным нарастанием к 1-му мес. посттрансплантационного периода (26,1%) и дальнейшим спадом ко 2-му мес. после операции (до 6,5%). ВК вирусная инфекция у 5,9% позитивных пациентов (1 из 17) была транзиторной, у 82,4% пациентов (14/17) — сохранялась в течение 2–2,5 мес., у 5,9% пациентов (1/17) — регистрировалась до 3 мес., у 5,9% пациентов (1/17) — отмечалась до полугода после пересадки ГСК.

У всех пациентов с выявленной ВК и JC вирурией и/или виремией были установлены уровни вирусной нагрузки путем определения количества ДНК вируса (копий/мл) методом количественной ПЦР. По современным представлениям предиктивную ценность имеет вирусная нагрузка в сыворотке крови, превышающая $10^4$ копий/мл, и в моче, превышающая $10^7$ копий/мл [4, 7]. Результаты анализа в отношении ВК вируспозитивных реципиентов показали, что доля пациентов со значениями вирусной нагрузки в моче, превышающими $10^7$ копий/мл, составила 23,5% (4 из 17 позитивных реципиентов). У остальных 76,5% позитивных реципиентов регистрировались более низкие значения вирусной нагрузки: у 17,6% (3/17) — от $10^6$ до $10^7$ копий/мл; у 17,6% (3/17) — от $10^5$ до $10^6$ копий/мл; у 5,9% (1/17) — от $10^4$ до $10^5$ копий/мл; у 35,3% (6/17) — от $10^3$ до $10^4$ копий/мл. При пересчете на всю группу обследованных взрослых реципиентов ГСК доля пациентов с показателями ВК вирусной нагрузки >$10^7$копий/мл (от $1{,}1\times10^7$ до $4{,}5\times10^7$копий/мл) составила 8,7% (4 из 46 обследованных). Случаев ВК виремии и JC вирурии с предиктивными значениями вирусной нагрузки выявлено не было.

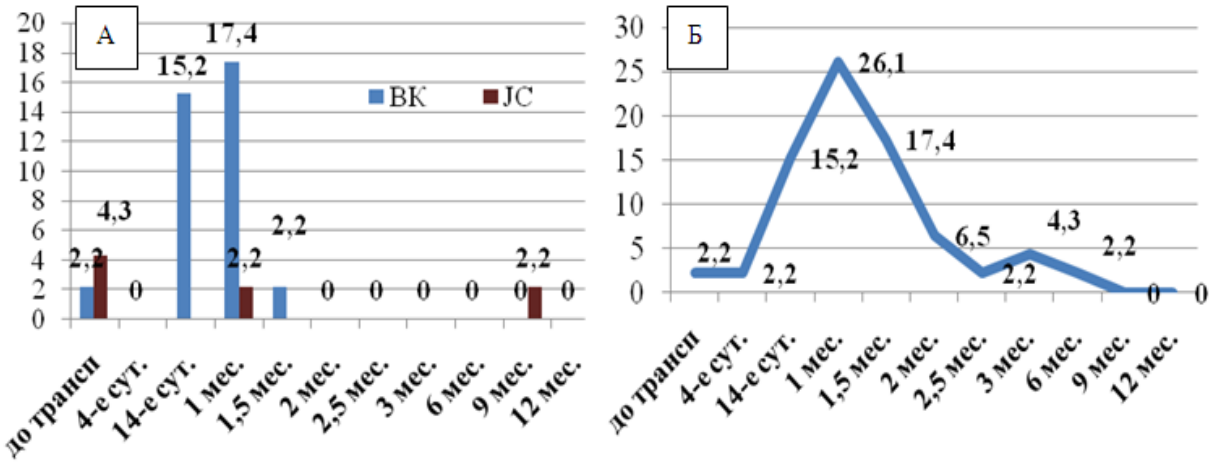



**Рисунок 2. — Динамика первичной реактивации ПВИ (А) и кинетика развития ВК вирусной инфекции у взрослых реципиентов ГСК (Б)**

Из 32 реципиентов ГСК детского возраста с клиническими диагнозами острый лимфоидный лейкоз (9 пациентов), острый миелоидный лейкоз (8), апластическая анемия (8), миелодисплазический синдром (3), тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (2), лимфома Ходжкина (1), тромбоцитопения (1) доля пациентов, у которых была зарегистрирована реактивация детектируемых полиомавирусов, составила 53,1% (17/32). При этом у 12 позитивных реципиентов имела место только ВК вирурия (37,5%, 12/32), у 5 — ВК вирурия + ВК виремия (15,6%, 5/32) (рисунок 3). ДНК JC вируса не было выявлена ни в одном из всех исследованных образцов.

**Рисунок 3. — Результаты дифференциальной генодиагностики ПВИ у детей-реципиентов ГСК**

Первичная реактивация ВК вирусной инфекции в этой группе возникала в посттрансплантационном периоде в достаточно короткие сроки (рисунок 4А) — в подавляющем большинстве случаев в течение первого месяца после операции (на 14-е сут — у 34,4% (12/32), спустя 1 мес. — у 9,4% (3/32)). В среднем первичное выявление ВК вирурии регистрировалось на 18,12±12,65 сут после трансплантации, ВК виремия развивалась спустя 1–3 недели после ВК вирурии.

Первые случаи ВК вирурии и/или виремии были зарегистрированы уже на 4-й день после пересадки ГСК (у 6,3%, 2/32). При этом максимальная доля пациентов, у которых имела место активная ПВИ, регистрировалась в период с 2-х недель (37,5%, 12/32) до 1 мес. (31,3%, 10/32) после трансплантации (рисунок 4Б). Затем доля пациентов с активной ВК инфекцией снижалась. В период 1,5–3 мес. инфекция выходила на плато и регистрировалась в пределах 12,5–18,8% с последующим постепенным снижением (до 3,1%) вплоть до 1 года от начала наблюдений. Из 17 позитивных детей у 11,8% (2/17) она была транзиторной (вирурия при повторных исследованиях не выявлялась), у 64,7% (11/17) вирурия длилась больше месяца, у 17,6% (3/17) она сохранялась до 3-х мес. и более, у 5,9% (1/17) пациентов — в течение 1 года после пересадки.

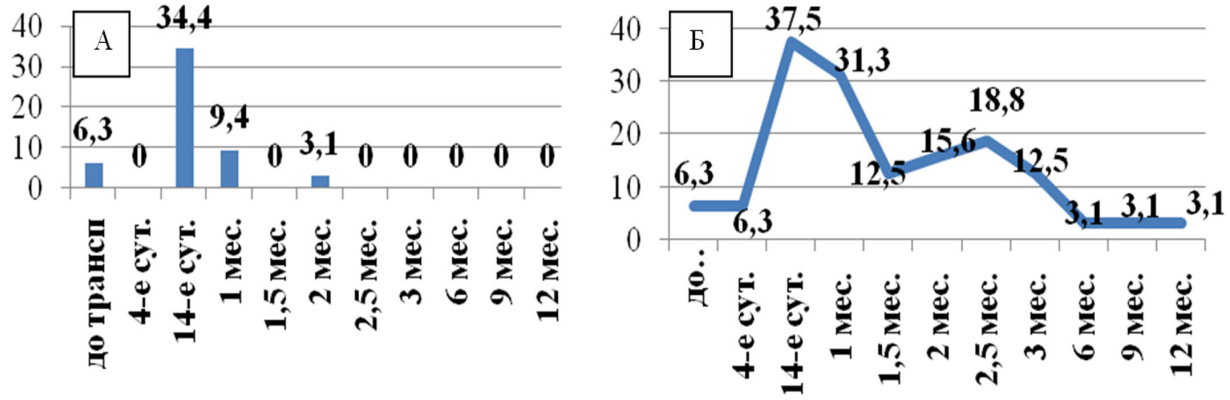



**Рисунок 4. — Динамика первичной реактивации ВК вирусной инфекции (А) и кинетика ее развития у детей в течение 1 года после трансплантации ГСК**

В наших исследованиях у большинства реципиентов детского возраста с ВК вирурией (13/17, 76,5%) регистрировались значения уровней вирусной нагрузки в моче <$10^7$копий/мл, и лишь у 4 пациентов (23,5%) уровень репликации ВК вируса был выше и колебался в пределах от $1{,}21\times10^7$ до $3{,}71\times10^7$ копий/мл. Из 5 позитивных на ВК виремию пациентов у 20,0% (1/5) значение вирусной нагрузки превышало пороговое и составило $1{,}92\times10^4$ копий/мл. При пересчете на всю группу обследованных детей доля пациентов с диагностически значимыми показателями ВК вирусной нагрузки в моче составила 12,5% (4 из 32 обследованных), в крови — 3,1% (1/32).

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о достаточно частой активации ВК и JC вирусной инфекции у взрослых и детей — реципиентов ГСК, что указывает на необходимость осуществления регулярного вначале качественного, а затем количественного мониторинга за возбудителями данных инфекций в посттрансплантационном периоде с целью анализа и адекватной оценки инфекционного статуса пациентов для своевременной коррекции применяемых схем лечения [8–10].

*Авторы статьи выражают благодарность Кишкурно Е.П. (к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней и детских инфекций Государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»), Миланович Н.Ф. (к.м.н., заведующая отделением трансплантации костного мозга Республиканского центра гематологии и трансплантации костного мозга на базе Учреждения здравоохранения «9-я городская клиническая больница» г. Минска) и Минаковской Н.В. (заведующая отделением трансплантации костного мозга, врач-гематолог, врач высшей категории Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» г. Минска) за предоставление клинического материала реципиентов ГСК.*

**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.The human polyomaviruses / S. Eash [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. — 2006. — Vol. 63, № 7–8. — P. 865–876.

3. Siguier, M. BK-virus infections: a literature review / M. Siguier, P. Sellier, J.F. Bergmann // Med. Mal. Infect. — 2012. — Vol. 42, № 5. — P. 181–187.

4. Полиомавирус (BKV) у реципиентов с трансплантированной почкой / Е.В. Горбатенко [и др.] // Нефропатия и диализ. — 2010. — Т. 12, № 3. — С. 164–173.

5.Dropulic, L.K. Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients / L.K. Dropulic, R.J. Jones // Bone Marrow Transplant. — 2008. — Vol. 41, № 1. — P. 11–18.

6. Dall, A. BK virus nephritis after renal transplantation / A. Dall, S. Hariharan // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. — 2008. — Vol. 3, № 2. — P. 68–75.

7.Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations / H.H. Hirsch [et al.] // Transplantation. — 2005. — Vol. 9, № 10. — P. 1277–1286.

8. Leflunomide therapy for BK virus allograft nephropathy after pediatric kidney transplantation / Y.H. Jung [et al.] // Pediatr. Transplant. — 2013. — Vol. 17, № 2. — P. 50–54.

9.Low-dose cidofovir treatment of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in recipients of hematopoietic stemcell transplant / M.R. Savona [et al.] // Bone Marrow Transplant. — 2007. — Vol. 39. — P. 783–787.

10. De Gascun, C.F. Human polyomavirus reactivation: disease pathogenesis and treatment approaches [Electronic resource] / C.F. De Gascun, M.J. Carr // Clin. Dev. Immunol. — 2013. — Vol. 2013. — Article ID 373579. — Mode of access: http://dx.doi.org/10.1155/2013/373579.

## RESULTS OF CLINICAL APPROBATION FOR ALGORITHM OF POLIOMAVIRUS INFECTION DIFFERENTIAL GENE DIAGNOSIS IN HEMATOPOIETIC STEM CELLS RECIPIENTS

*Bohush Z.F., Amvrosieva T.V., Dziadziulia K.L., Paklonskaya N.V., Lozuk C.K.*

*State Institution "Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

Article presents the results of the approbation of the developed of the poliomavirus infection diagnosis algorithm in relation to its most important pathogens — BK and JC virus on clinical material (blood and urine) of adult and pediatric hematopoietic stem cells recipients.

**Keywords:** poliomaviral infection, BK virus, JC virus, polymerase chain reaction, the differential diagnosis.

Поступила 02.09.2015

## ЗНАЧИМОСТЬ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ЭТИОЛОГИИ ОСТРЫХ ЭКЗАНТЕМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

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

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

*[2]Учреждение здравоохранения «Городская инфекционная клиническая больница», Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Для установления этиологической роли вирусов как возбудителей острой экзантемы проведено лабораторное обследование 658 пациентов, в т. ч. 527 — выявленных в рамках надзора за корью и краснухой и 131 — госпитализированных в диагностическое отделение городской инфекционной клинической больницы г. Минска. Обследование на корь, краснуху и парвовирусную инфекции позволило установить диагноз у 41,9% пациентов с подозрением кори и краснухи, 29,2% пришлось на парвовирусную инфекцию. При расширенном лабораторном обследовании госпитализированных пациентов инфекционная этиология была установлена в 66,4% случаев, в т. ч. в 51,1% диагностированы вирусные инфекции и 15,3% — бактериальные. Наиболее распространенными этиологическими агентами у госпитализированных пациентов являлись вирус Эпштейна–Барр (17,6%) и парвовирус B19 (10,7%).

**Ключевые слова:** острые экзантемные заболевания, корь, краснуха, вирус Эпштейна-Барр, парвовирус B19, этиология.

**Введение.** Макуло-папулезная сыпь и лихорадка присутствуют в клинической картине целого ряда инфекционных заболеваний. Среди возбудителей таких инфекций значительное место занимают вирусы кори и краснухи, парвовирус B19, адено-, энтеровирусы, вирус Эпштейна-Барр, вирус герпеса человека 6 типа [1–5]. Сходство симптомов создает значительные трудности для диагностики отдельных нозологических форм на основании только клинических данных.

Лабораторная дифференциальная диагностика заболеваний, протекающих с экзантемой и лихорадкой, является важным как с клинической, так и с эпидемиологической точек зрения. Установленный этиологический диагноз является основанием для назначения специфической терапии, позволяет исключить необоснованное применение антибиотиков в случае вирусных инфекций, а также определить необходимость проведения противоэпидемических мероприятий в очагах инфекции.

В настоящее время в рамках выполнения программы элиминации кори и краснухи во всех регионах Беларуси организовано выявление пациентов с подозрением на эти инфекции и обязатель-

ное лабораторное обследование в республиканской лаборатории для верификации диагноза [6]. Поскольку заболеваемость корью и краснухой в стране в настоящее время находятся на низком уровне, то значительная часть образцов при этом остается этиологически нерасшифрованной [7, 8].

Дальнейшее исследование клинического материала может предоставить важную информацию о том, какие из вирусных заболеваний, протекающих с экзантемой, являются актуальными для Республики Беларусь в условиях отсутствия эндемичной циркуляции вирусов кори и краснухи. Особенно тщательный подход к диагностике экзантемных заболеваний (забор различного вида материала, быстрая доставка в лабораторию, при необходимости — забор повторных образцов) может быть обеспечен при лабораторном обследовании лиц, госпитализированных в инфекционные стационары.

**Цель** исследования — дифференциальная лабораторная диагностика заболеваний, протекающих с экзантемой и лихорадкой, у лиц различного возраста, в т. ч. госпитализированных в городскую инфекционную клиническую больницу г. Минска.

**Материалы и методы.** В течение января 2014 г. — мая 2015 г. выполнено исследование клинического материала (сыворотка крови, носоглоточные мазки, моча) 658 пациентов с макулопапулезной сыпью и лихорадкой. Из них 131 человек в возрасте 18–68 лет был госпитализирован в диагностическое отделение городской инфекционной клинической больницы г. Минска (в т. ч. в 2014 г. — 80, в 2015 г. — 51). Остальные 527 пациентов (в т. ч. в 2014 г. — 438, в 2015 г. — 89) в возрасте 0–64 лет были выявлены во всех регионах страны при проведении надзора за корью и краснухой в соответствии с Санитарными нормами и правилами «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения кори и краснухи» от 26.12.2013 № 130.

Лабораторное обследование выполнялось в клинико-диагностической лаборатории городской инфекционной клинической больницы г. Минска и РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Забор крови проводили с 3 по 30-й день от появления сыпи, носоглоточных мазков и мочи — в течение 1–8 дней заболевания. Специфические IgM антитела к вирусам кори, краснухи, парво-, энтеро-, аденовирусу выявляли в иммуноферментном анализе с использованием коммерческих наборов «Enzygnost anti-measles virus IgM» (Siemens, Германия), «Enzygnost anti-rubella virus IgM» (Siemens, Германия), «Parvovirus B19 IgM» (Virion/Serion, Германия), «Enterovirus IgM» (Virion/Serion, Германия), «Adenovirus IgM ELISA» (DRG, Германия) согласно инструкциям производителей.

Выделение вирусной РНК и ДНК из клинического материала выполняли с использованием наборов QIAamp Viral RNA Mini Kit и QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия). Для выявления ДНК аденовируса применяли коммерческие ПЦР наборы «АмплиСенс Adenovirus-EPh», для детекции ДНК вируса Эпштейна–Барр — наборы «АмплиСенс EBV-скрин/монитор FL», для обнаружения РНК энтеровируса — наборы «Reverta-L» и «АмплиСенс Enterovirus-FL» (РФ). В тех случаях, когда ПЦР предполагала электрофоретическую детекцию продуктов амплификации, их анализировали методом электрофореза в 1,5%-м агарозном геле в трис-ацетатном буфере, pH 8,5 (0,04М трис-ацетат, 0,002М ЭДТА) с добавлением бромистого этидия.

**Результаты и их обсуждение.** *Дифференциальная диагностика острых экзантемных заболеваний у лиц, выявленных в рамках надзора за корью и краснухой.* За период январь 2014 г. — май 2015 г. на наличие лабораторных критериев кори и краснухи было обследовано 527 человек, выявленных в рамках надзора за этими инфекциями. Все пациенты с исключенным диагнозом кори и краснухи были обследованы на наличие IgM антител к парвовирусу B19. Проведение лабораторного обследования на три указанные инфекции позволило установить этиологию для 41,9% (221/527) заболевших. Доля расшифрованных случаев каждый год практически не изменялась и составляла 42,0% в 2014 г. и 41,6% в 2015 г. (5 мес.) (таблица 1).

В целом за период наблюдения (17 мес.) наибольшая доля случаев острой экзантемы была обусловлена парвовирусной инфекцией, на долю которой пришлось 29,2%. Второй по значимости являлась корь, которая составила 12,3% случаев. Краснуха оказалась крайне редкой находкой и была выявлена у 2 заболевших (0,4%).

Парвовирусная инфекция преобладала в этиологической структуре экзантем как в 2014 г., так и первые 5 мес. 2015 г., когда на ее долю приходилось 27,2 и 39,3% случаев соответственно. Аналогичная ситуация характерна и для других стран умеренного климата, отмечающих ведущую роль парвовирусной инфекции среди заболеваний с подозрением кори и краснухи [9, 10].

Значимость кори в разные периоды существенно различалась. В 2014 г. в Беларуси заносы вируса кори привели к ограниченному распространению этой инфекции [11]. В течение года было лабораторно подтверждено 64 случая кори, что составило 14,6% от всех обследованных лиц. В 2015 г. единственный завозной случай кори не получил распространения и, соответственно, на долю кори пришлось 1,1% случаев.

Таблица 1. — Результаты лабораторной диагностики заболеваний, выявленных в рамках надзора за корью и краснухой, январь 2014 г. — май 2015 г.

| Инфекция | 2014 г. | 2015 г. (5 мес.) | Всего (17 мес.) |
|---|---|---|---|
| | Количество случаев, %, n = 438 | Количество случаев, %, n = 89 | Количество случаев, % n = 527 |
| Корь | 64 (14,6) | 1 (1,1) | 65 (12,3) |
| Краснуха | 1 (0,2) | 1 (1,1) | 2 (0,4) |
| Парвовирусная | 119 (27,2) | 35 (39,3) | 154 (29,2) |
| Всего положительных образцов | 184 (42,0) | 37 (41,6) | 221 (41,9) |

Таким образом, в 2014 г. частота выявления парвовирусной инфекции в 1,9 раза превышала частоту выявления кори (P<0,05), в 2015 г. парвовирусная инфекция встречалась более чем в 35 раз чаще, чем корь. Представленные данные подтверждают, что парвовирусная инфекция оставалась доминирующей причиной экзантем не только в условиях отсутствия заболеваемости корью, но и в период ограниченной вспышки этой инфекции.

Из 527 лиц с подозрением кори и краснухи 289 были в возрасте 0–17 лет и 237 — в возрасте 18 лет и старше (P>0,05). В течение 17 мес. наблюдения парвовирусная инфекция была диагностирована у 114 детей до 18 лет и у 40 взрослых. Соответственно, частота ее выявления среди детей составила 39,5% (114/289), среди взрослых — 16,9% (40/237). Преимущественное распространение парвовирусной инфекции среди детей сохранялось как в 2014 г., так и в 2015 г., и составляло в сравнении со взрослыми 38,9% (84/216) против 15,8% (35/221) и 41,1% (30/73) против 31,2% (5/16) соответственно.

*Дифференциальная диагностика острых экзантемных заболеваний у пациентов городской клинической инфекционной больницы г. Минска.* За период январь 2014 г. — май 2015 г. при расширенном лабораторном обследовании 131 госпитализированного пациента инфекционную этиологию заболевания удалось подтвердить у 87 из них (66,4%). В 2014 г. доля инфекций с установленным диагнозом составила 62,5%, в 2015 г. (5 мес) — 72,5%, что статистически не различалось (P>0,05). Столь значительная доля этиологически расшифрованных случаев острой экзантемы свидетельствует о правильности выбранной тактики лабораторных исследований.

Вирусная этиология острой экзантемы, как это отмечается и в других исследованиях [12], являлась преобладающей и была установлена у 51,1% (67/131) пациентов, в т. ч. в 2014 г. у 53,8% (43/80) и в 2015 г. у 47,1% (24/51) (таблица 2). Инфекционные заболевания бактериальной природы как причина экзантемы встречались реже и составили 15,3% случаев (P<0,01).

Не удалось подтвердить инфекционную этиологию заболевания в 33,8% случаев (44 пациента). Из них в одном случае был выставлен диагноз «саркоидоз», в 24 — «острая токсикодермия» (при отрицательном результате полного лабораторного обследования, учитывая наличие связи между появлением сыпи и приемом нового лекарственного средства, а также полное купирование сыпи от назначения антигистаминных препаратов).

В целом за период наблюдения (17 мес.) наибольшее число случаев были обусловлены вирусом Эпштейна–Барр (23/131, 17,6%) и парвовирусом B19 (14/131, 10,7%). В то же время в разные годы этиологическая структура экзантем различалась.

Среди вирусных инфекций наиболее распространенным заболеванием в 2014 г. являлся инфекционный мононуклеоз, на долю которого пришлось 20,0% случаев госпитализации. Вспышка кори в стране явилась причиной того, что заболевание было диагностировано у 11% госпитализи-

рованных пациентов (9 случаев) и являлась второй по частоте после инфекционного мононуклеоза. На долю таких инфекций как парво-, энтеро-, аденовирусная пришлось 7,5; 5,0 и 5,0% соответственно. Краснуха и ЦМВ-инфекция были диагностированы лишь в одном случае каждая.

Таблица 2. — Этиологическая расшифровка диагноза у пациентов, госпитализированных в городскую клиническую инфекционную больницу г. Минска, 2014–2015 (5 мес.) гг.

| Инфекция | 2014 г. | 2015 г. (5 мес.) | Всего (17 мес.) |
|---|---|---|---|
| | Количество случаев, %, n = 80 | Количество случаев, %, n = 51 | Количество случаев, % n = 131 |
| **Вирусной этиологии:** | | | |
| энтеровирусная инфекция | 4 (5,0) | 5 (9,8) | 9 (6,9) |
| корь | 9 (11,25) | 1 (2,0) | 10 (7,6) |
| парвовирусная инфекция | 6 (7,5) | 8 (15,7) | 14 (10,7) |
| краснуха | 1 (1,25) | 0 | 1 (0,8) |
| инфекционный мононуклеоз | 16 (20,0) | 7 (13,7) | 23 (17,6) |
| аденовирусная инфекция | 4 (5,0) | 2 (3,9) | 6 (4,6) |
| острая ЦМВ-инфекция | 1 (1,25) | 1 (2,0) | 2 (1,5) |
| геморрагическая лихорадка с почечным синдромом | 1 (1,25) | 0 | 1 (0,8) |
| лихорадка Западного Нила | 1 (1,25) | 0 | 1 (0,8) |
| *Всего* | *43 (53,8)* | *24 (47,1)* | *67 (51,1)* |
| **Другой (невирусной) инфекционной этиологии:** | | | |
| микоплазменная инфекция | 0 | 10 (19,6) | 10 (7,6) |
| трихинеллез | 1 (1,25) | 0 | 1 (0,8) |
| иерсиниоз | 1 (1,25) | 3 (5,9) | 4 (3,1) |
| инфекционный эндокардит | 2 (2,5) | 0 | 2 (1,5) |
| лептоспироз | 1 (1,25) | 0 | 1 (0,8) |
| риккетсиоз | 2 (2,5) | 0 | 2 (1,5) |
| *Всего* | *7 (8,8)* | *13 (25,5)* | *20 (15,3)* |
| **Неинфекционной этиологии:** | | | |
| саркоидоз | 1 (1,25) | 0 | 1 (0,8) |
| токсикодермия | 15 (18,75) | 9 (17,6) | 24 (18,3) |
| Причина не установлена | 14 (17,5) | 5 (9,8) | 19 (14,5) |

В 2015 г. наибольшую долю острых экзантем составили случаи парвовирусной инфекции и инфекционного мононуклеоза — 15,7 и 13,7% соответственно. Энтеровирусная инфекция являлась причиной экзантемы в 9,8% случаев, что было практически в 2 раза выше, чем в 2014 г. Частота выявления аденовирусной инфекции соответствовала предыдущему году и составила 3,9%. Завозной случай кори был диагностирован лишь у одного заболевшего (2,0%).

Среди бактериальных инфекций наибольшее число было обусловлено микоплазменной инфекцией — 10/131 (7,6%). Все 10 случаев были выявлены в зимне-весенний период 2015 г. у заболевших из одного очага (курсанты академии МВД). Макуло-папулезная сыпь проявлялась на фоне острого поражения дыхательных путей. Еще одна бактериальная инфекция — иерсиниоз — была выявлена у 4 пациентов (3,1%), в т. ч. 3 случая в 2015 г. и 1 случай в 2014 г.

В 2014 г. у 1–2 заболевших были подтверждены такие инфекции, как геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, лептоспироз, инфекционный эндокардит, риккетсиоз, трихинеллез,

лихорадка Западного Нила. В 2015 г. (5 мес.) ни одного случая этих заболеваний у лиц с острой экзантемой выявлено не было.

Кроме кори и краснухи только парвовирусная инфекция была включена в число диагностируемых заболеваний как у лиц, выявленных в стране в рамках надзора за корью и краснухой, так и у госпитализированных пациентов инфекционного стационара. У лиц с подозрением кори и краснухи в возрасте 18 лет и старше это заболевание диагностировалось несколько чаще, чем у пациентов взрослого инфекционного стационара (16,9 против 10,7%), хотя это различие не было значимым (P = 0,1).

Полученные данные свидетельствуют о том, что хотя парвовирусная инфекция преимущественно встречается в детском возрасте, она является нередкой и у взрослых. В большинстве случаев заболевание протекает в легкой форме, что отражается в более редком его выявлении у госпитализированных лиц. В то же время стабильное выявление парвовирусной инфекции у взрослых свидетельствует о том, что обследование на эту инфекцию должно проводиться всем лицам с острой экзантемой независимо от возраста, в т. ч. и в стационарах.

Инфекционный мононуклеоз, который являлся одной из основных причин острой экзантемы у госпитализированных взрослых, в настоящее время не включен в протокол обследования всех лиц с подозрением кори и краснухи. Учитывая результаты, полученные среди пациентов инфекционного стационара г. Минска, обследование на вирус Эпштейна–Барр может быть рекомендовано для увеличения доли расшифрованных случаев у лиц с исключенными диагнозами кори и краснухи.

**Заключение.** Как показали результаты исследования, случаи острых экзантемных заболеваний, выявляемые в рамках надзора за корью и краснухой, могут быть вызваны целым рядом этиологических агентов. Лабораторное обследование на корь, краснуху и парвовирусную инфекцию обеспечило постановку диагноза в 41,9% случаев с преобладанием среди них парвовирусной инфекции, на долю которой пришлось 29,2% всех обследованных, или 33,5% случаев, классифицированных как «ни корь, ни краснуха».

Благодаря расширенному лабораторному обследованию госпитализированных пациентов инфекционную этиологию острой экзантемы у них удалось подтвердить в 66,4% случаев. Основная роль в развитии экзантемы принадлежала вирусным инфекциям, которые обусловили 51,1% случаев, бактериальные инфекции составили 15,3%.

Наиболее часто этиологическими агентами у госпитализированных пациентов являлись вирус Эпштейна–Барр (17,6%) и парвовирус B19 (10,7%). Менее значимую роль играли энтеровирусная и аденовирусная инфекции, диагностированные у 5–7% заболевших. Цитомегаловирусная инфекция, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, лихорадка Западного Нила выявлялись у лиц с макуло-папулезной сыпью в единичных случаях.

Среди бактериальных инфекций причиной острой экзантемы чаще являлись микоплазменная инфекция и иерсиниоз (7,6 и 3,1%), однако в единичных случаях у заболевших диагностировались лептоспироз, риккетсиоз, стрептококковая инфекции.

Представленные данные свидетельствуют о широком спектре вирусных и бактериальных инфекций, одним из проявлений которых может являться макуло-папулезная сыпь, и подтверждают исключительно важную роль лабораторных исследований в их дифференциальной диагностике.

**Литература**

1.Causes of morbilliform rash in a highly immunized English population / M. Ramsay [et al.] // Arch. Dis. Child. — 2002. — Vol. 87, № 3. — P. 202–206.

2.Etiology of measles- and rubella-like illnesses in measles, mumps, and rubella-vaccinated children / I. Davidkin [et al.] // J. Infect. Dis. — 1998. — Vol. 178, № 6. — P. 1567–1570.

3.Wananukul, S. Human herpesvirus infection in children with fever and maculopapular rash / S. Wananukul, V. Nopponpunth, Y. Poovorawan // Asian Pac. J. Allergy Immunol. — 2003. — Vol. 21, № 4. — P. 217–221.

4.Infection and immunity for human parvovirus B19 in patients with febrile exanthema / M.S. Pedranti [et al.] // Epidemiol. Infect. — 2012. — Vol. 140, № 3. — P. 454–461.

5.Role of human herpesvirus 6 infection in young Brazilian children with rash illnesses / R.A. Vianna [et al.] // Pediatr. Infect. Dis. J. — 2008. — Vol. 27, № 6. — P. 533–537.

6.WHO. Surveillance guidelines for measles, rubella and congenital rubella syndrome in the WHO Europe region. — Copenhagen, 2012.

7. Самойлович, Е.О. Ситуация по кори в Республике Беларусь в 2013 г. / Е.О. Самойлович // Воен. медицина. — 2014. — № 2. — С. 48–51.

8. Самойлович, Е.О. Надзор за корью в Республике Беларусь: подготовка к верификации элиминации инфекции / Е.О. Самойлович // Мед. журн. — 2014. — № 2. — С. 94–99.

9.Etiologies of rash and fever illnesses in Campinas, Brazil / J.C. de Moraes [et al.] // J. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 204, suppl. 2. — P. 627–636.

10. Etiology of measles suspect cases reported in 2006–2007 in Poland / J. Siennicka [et al.] // Przegl. Epidemiol. — 2011. — Vol. 65, № 1. — P. 39–44.

11. Распространение завозного вируса кори в Минске / И.Н. Глинская [и др.] // Здравоохранение. — 2014. — № 10. — С. 44–48.

12. High frequency, diversity and severity of skin diseases in a paediatric emergency department / N. Kramkimel [et al.] // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. — 2010. — Vol. 24, № 12. — P. 1468–1475.

## IMPORTANCE OF VIRUS INFECTIONS IN ETIOLOGY OF ACUTE EXANTHEMATOUS DISEASES

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

*[1]State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;*

*[2]Healthcare Institution "Municipal Infectious Diseases Hospital", Minsk, Republic of Belarus*

To confirm virus etiology in exanthematous diseases a total of 658 patients were laboratory investigated, including 527 persons reveled during measles and rubella surveillance and 131 hospitalized in diagnostic department of Minsk city infectious disease hospital. Testing for measles, rubella and parvovirus infection allow diagnosing 41.9% of measles/rubella suspected cases, where 29.2% were parvovirus infection. Expanded investigation of hospitalized patient shown infectious etiology in 66.4% of acute exanthema, including 51.1% of cases caused by virus infections and 15.3% by bacterial ones. Most common etiology in hospitalized patients were Epstein-Barr virus (17.6%) and parvovirus B19 (10.7%).

**Keywords:** acute exanthematous diseases, measles, rubella and parvovirus B19, Epstein–Barr virus, etiology.

Поступила 16.09.2015

## РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОБРАЗЦА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ЭНТЕРОВИРУСОВ МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

*Поклонская Н.В., Дедюля К.Л., Амвросьева Т.В., Землянский В.А., Лозюк С.К.*

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

**Реферат.** В ходе исследований разработан экспериментальный образец тест-системы для индикации энтеровирусов в клиническом материале и объектах окружающей среды, его аналитические характеристики: чувствительность — $10^3$ ГЭ/мл, специфичность — 100%. Полевые испытания экспериментального образца проводили в сравнении с набором «Enterovirus-FL» (АмплиСенс, РФ) на 56 клинических образцах и пробах из объектов окружающей среды. Полученные результаты показали, что совпадение было получено в 89% проб (50 из 56), в т. ч. в отношении 34 проб, содержащих и 16 не содержащих ЭВ. Дискордантные результаты были получены в 11% проб (6 образцов). Дискордантные результаты были получены для образцов, содержащих количество РНК на уровне или ниже порогового значения чувствительности тест-системы.

**Ключевые слова:** энтеровирус, лабораторная диагностика, ПЦР.

**Введение.** Энтеровирусы (ЭВ) — многочисленный и широко распространенный во всех странах мира род кишечных вирусов. Вызываемые ими инфекции, кроме полиомиелита, являются вак-

цинонеуправляемыми, а их возбудители относятся к инфекционным агентам с высоким риском массового инфицирования населения, особенно детей. Для ЭВ характерен эпидемический тип распространения, сопровождающийся частым развитием вспышек и даже эпидемий, наносящих серьезный экономический и социальный ущерб.

По статистическим данным и нашим многолетним наблюдениям [1–5], ЭВ относятся к наиболее актуальным возбудителям инфекционных болезней в Республике Беларусь. Так, только за последние несколько лет предметом нашего изучения было более десяти эпизодов вспышечной энтеровирусной заболеваемости, регистрируемой в разных регионах нашей страны.

Широкая распространенность и эпидемическая значимость энтеровирусных инфекций (ЭВИ), в механизме реализации которых особая роль принадлежит внешнесредовым факторам, определяют актуальность регулярного лабораторного контроля за циркуляцией ее возбудителей. Для этого необходимы эффективные диагностические средства, позволяющие оперативно установить этиологию инфекции, а также пути и факторы передачи возбудителей.

В настоящее время на белорусском рынке среди современных диагностикумов, предназначенных для индикации ЭВ, представлена тест-система российского производства на основе ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией. В данной тест-системе в качестве контроля используется рекомбинантная ДНК-конструкция, содержащая вставку региона-мишени для ПЦР. Для РНК-содержащих вирусов такой подход не является оптимальным, т. к. положительный контроль не проходит все те стадии (выделение, обратная транскрипция), что и исследуемые пробы. Кроме того, российская тест-система имеет достаточно высокую стоимость, что делает ее мало доступной для практического здравоохранения.

**Цель** исследования — разработка технологии производства и создание экспериментального образца отечественной ПЦР тест-системы с гибридизационно-флюоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени на основе использования реагентов и комплектующих белорусского производства.

**Материалы и методы.** Испытания эффективности праймеров и зондов проводили с использованием кДНК, обратно транскрибированной с РНК штамма ECHO 30 F-366/1260 из музея РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, с РНК бактериофага MS2, с армированной РНК внутреннего и положительного контрольных образцов, с ДНК рекомбинантного вектора *pEV*321-1056, представляющего собой плазмиду pUC18, содержащую вставку, включающую фрагмент 5'НТР, ген VP4 и фрагмент гена VP2 генома ЭВ. Аналитическую специфичность проверяли с использованием проб клинического материала и образцов, полученных из объектов окружающей среды (вода, смывы с поверхностей). Бактериофаг MS2 был получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов при Государственном научном центре Российской Федерации ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика). Клонирование ПЦР-фрагментов осуществляли в вектор Pet20b(+) (Novagen, США). Для накопления плазмид использовали линии бактериальных клеток *E. coli* DH-5α и BL21(DE3). Армированную РНК для внутреннего контрольного образца получали с использованием рекомбинантного вектора pET20b(+), бактериофага MS2 (из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов при ГосНИИгенетика), линий *E. coli* DH-5α и BL21(DE3).

Выделение РНК из проб проводили с помощью набора «Рибосорб», производства «Амплисенс» (РФ). Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием коммерческого набора «GenElute™ Plasmid Miniprep Kit», производства Sigma-Aldrich. Выделение РНК бактериофага MS2 и РНК из образцов суспензий бактериальных клеток, содержащих «армированную» РНК (АР), выделяли реагентом «TRI Reagent» (Sigma-Aldrich, США).

Постановку реакции обратной транскрипции осуществляли с использованием набора «РЕВЕРТА», производства «Амплисенс» (РФ).

Амплификацию фрагментов генома бактериофага MS2 осуществлялась в ПЦР со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) при помощи коммерческого набора «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen, Германия).

Результаты амплификации анализировали с помощью гель-электрофореза при силе тока 60–80 мА. Подвижность, определяющую длину ампликонов, сравнивали с подвижностью стандартных фрагментов ДНК-маркеров в 1,5%-х агарозных гелях при окрашивании бромистым этидием (10 мкг/мл).

В качестве маркера использовали ДНК-маркер «2-Log DNA Ladder 0.1-10.0 kb» (NEB, Англия). Документирование результатов проводили при помощи молекулярного имиджера «Tiphoon trio+», производства «GE Healthcare» (США).

Для клонирования ПЦР-фрагментов использовали рестриктазы «FastDigest BamHI» и «FastDigest HindIII» (Thermo Scientific, США), а также лигазу «T4 DNA ligase» (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Трансформацию бактериальных клеток проводили по стандартной методике с использованием хлорида кальция [6]. Селекцию трансформированных бактериальных клеток проводили на среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Экспрессию армированных РНК (АР) осуществляли в клетках *E. coli* BL21.

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программ MEGA 6.0 [7], Primer Premier 5.1.

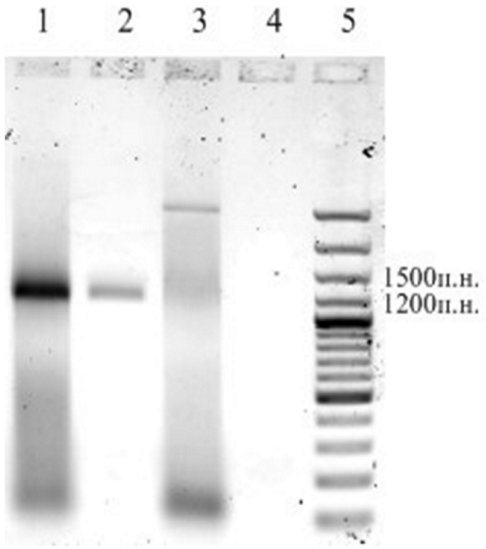
**Результаты и их обсуждение.** Для разработки комплекта диагностических праймеров и зондов с целью амплификации фрагмента кДНК ЭВ при помощи программы «MEGA» построено 2 выравнивания: одно включало 107 наиболее распространенных серотипов рода *Enterovirus*, а второе — 4 консенсусные последовательности вирусов, принадлежащих к видам *Human Enterovirus A*, *B*, *C* и *D*. На основании этих выравниваний определен наиболее консервативный фрагмент генома ЭВ, который включал участок генома с 467 по 584 н.о. Для разработки комплекта праймеров и зондов для амплификации кДНК ВКО было построено выравнивание, включающее фрагмент нуклеотидной последовательности, содержащий последовательности генов матуразы и белка оболочки 13 различных штаммов и изолятов фага MS2. Поиск праймеров осуществлялся внутри выбранных фрагментов с использованием автоматического (программой Primer Premier) и ручного поиска. В результате оценки основных параметров (вырожденность, Tm, GC%, ΔG, GC клэмп, образование димеров, шпилек и наличие сайтов неспецифического связывания) с целью последующей экспериментальной оценки их свойств были выбраны и синтезированы 3 прямых праймера, 2 обратных праймера и 4 гибридизационных зонда для специфической диагностической ПЦР в отношении ЭВ и 3 прямых, 3 обратных праймера и 7 зондов для амплификации ВКО. Каждый из зондов был синтезирован в 2 вариантах: с FAM и ROX флюоресцентной меткой (для ЭВ) и с FAM и HEX флюоресцентной меткой (для ВКО).

После того, как экспериментальным путем были определены оптимальные условия реакции (94°С — 5 мин, 45 циклов, состоящих из денатурации 94°С в течение 15 с и отжига-элонгации при 60°С в течение 40 с) и оптимизирован состав реакционной смеси (10 пмоль праймеров, 5 пмоль зонда на реакцию, буфер, содержащий 65 мМ Трис-HCl, 16,6 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 7 мМ $MgCl_2$, 0,02% Твин 20, по 200 мкМ дНТФ, 2,5 ед. Taq-полимеразы), была определена чувствительность всех возможных сочетаний праймеров и зондов (таблица 1).

Из таблицы 1 видно, что для 4 сочетаний праймеров и зондов она составила $10^3$ ГЭ/мл ДНК *pEV*321-1056, что достаточно для их эффективного использования в целях индикации ЭВ. Далее были получены препараты ВКО и ПКО, для чего была использована технология АР на основании пакующей системы РНК-содержащего фага MS2 [8]. Данная технология предполагает получение рекомбинантной векторной конструкции, содержащей гены матуразы и белка оболочки фага MS2. Трансформация этой плазмидой экспрессирующей линии *E. coli* позволяет получить экспрессию рекомбинантной РНК с последующей ее упаковкой в белковую оболочку из протеина фага MS2. Полученный по технологии «армированной РНК» контрольный образец устойчив к РНКазам, стабилен, неинфекционен для людей и проходит все те же стадии, что и исследуемые образцы. Для создания векторной конструкции, экспрессирующей матуразу и капсидный белок бактериофага MS2, была разработана пара праймеров, содержащих сайты рестрикции для последующего клонирования фрагмента в вектор pET20b(+). Полученной конструкцией, обозначенной как pET20b/MS2, трансформировали клетки *E. coli* DH-5α и BL21(DE3). Для подтверждения сборки и упаковки транскрибированной РНК в оболочку бактериофага проводили обработку суспензии разрушенных клеток РНКазой и ДНКазой (рисунок 1).

Таблица 1. — Определение чувствительности различных сочетаний праймеров и зондов для амплификации кДНК ЭВ

| Сочетание праймеров/ зондов | Концентрация *pEV*321-1056, ГЭ/мл | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $10^7$ | $10^6$ | $10^5$ | $10^4$ | $5\times10^3$ | $10^3$ |
| Среднее значение порогового цикла (± квадр. откл.) | | | | | | |
| F1-Pr5-PanEVr | 24,8±0,12 | 28,5±0,18 | 31,6±0,03 | 34,8±0,1 | 36,3* | – |
| F1-Pr10-PanEVr | 23,9±0,07 | 26,4±0,08 | 29,7±0,06 | 32,6±0,1 | 33,8±0,01 | 37,2* |
| F1-PrPanEVpr-PanEVr | 23,4±0,05 | 26±0,02 | 29,8±0,01 | 32,2±0,02 | 34,0±0,02 | – |
| F1/Pr5/R1 | 22,3±0,01 | 24,8±0,8 | 28,4±0,04 | 31,4±0,01 | 32,2±0,03 | 34,6±0,04 |
| F1/Pr10/R1 | 23,7±0,13 | 26,2±0,05 | 29,5±0,03 | 32,0±0,1 | 33,0±0,1 | 36,55* |
| F1/EVProbe2rox/R1 | 22,4±0,002 | 24,4±0,005 | 29,2±0,2 | 32,2±0,2 | 33,7±0,01 | 35,5±0,1 |
| F3/Pr10/ PanEVr | 24,3±0,07 | 26,6±0,2 | 30,0±0,01 | 33,0±0,1 | 34,0±0,01 | 38,7* |
| EVF2K/Pr10/R1 | 28,4±0,07 | 31,8±0,05 | 34,8±0,08 | 38,6* | 38,8* | – |
| EVF1K/ EVPrK2/K1 | 22,3±0,06 | 24,2±0,02 | 28,6±0,01 | 31,3±0,1 | 32,5±0,01 | 34,3±0,05 |
| EVF2K/ EVPrK1/K1 | 22,6±0,08 | 24,5±0,05 | 28,5±0,2 | 31,7±0,1 | 32,9±0,04 | 35,3±0,2 |
| EVF2K/ EVPrK2/K1 | 27,4±0,23 | 31,3±0,2 | 34,3±0,2 | 37,3±1,0 | – | – |




1 — культура, содержащая плазмиду pET20b/MS2 без обработки; 2 — культура, содержащая плазмиду pET20b/MS2 обработанная ДНКазой и РНКазой; 3 — культура с вектором pET20b(+) без обработки; 4 — культура с вектором Pet20b(+) обработанная ДНКазой и РНКазой; 5 — 100-3000 п.н. ДНК-маркер

**Рисунок 1. — Результаты электрофореза клеточных культур, обработанных нуклеазами**

Таким образом, было получено подтверждение накопления в культуре АР, которая была защищена от обработки нуклеазами. Очищенный лизат, содержащий АР, использовали в дальнейшем как препарат ВКО.

С целью получения препарата ПКО специфический фрагмент-мишень для диагностической ПЦР в отношении ЭВ был также клонирован в pET20b/MS2. Полученной конструкцией, обозначенной как pET20b/MS2/EV, трансформировали клетки *E. coli* DH-5α и BL21(DE3). Наработку АР осуществляли путем экспрессии в бактериальных клетках *E. coli* BL21(DE3). Подтверждение наработки АР осуществляли так же, как и для препарата АР ВКО, эффективность использования в качестве ПКО была подтверждена с разработанными комплектами праймеров и зондов для диагностической ПЦР.

После того, как предварительные испытания показали, что все разработанные сочетания праймеров и зондов позволяют эффективно детектировать его присутствие, различные сочетания

праймеров и зондов были использованы в мультиплексной ПЦР для одновременного выявления фрагмента-мишени ЭВ и ВКО (рисунок 2). Полученные результаты показали, что использование ВКО и всех сочетаний праймеров/зондов для его выявления было эффективно при постановке мультиплексной ПЦР и не приводило к снижению эффективности амплификации специфического фрагмента кДНК ЭВ.

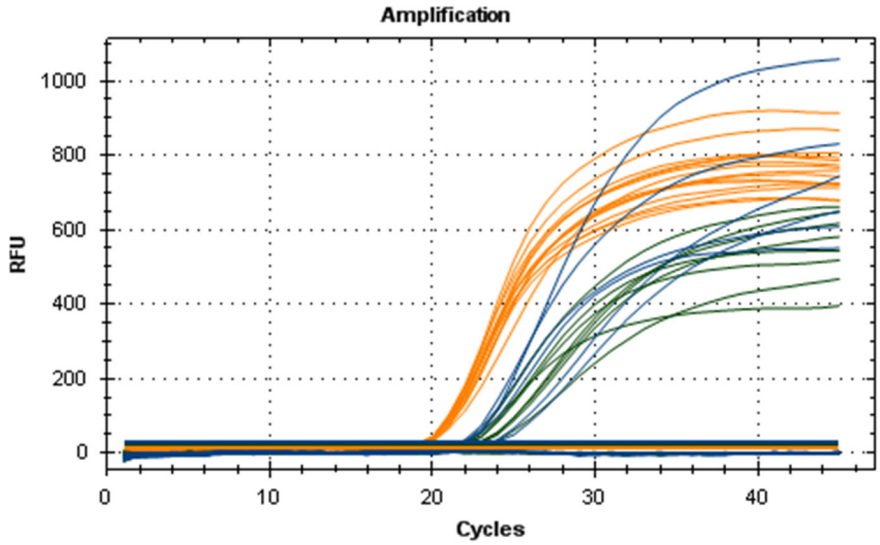



**Рисунок 2. — Результат мультиплексной ОТ-ПЦР для одновременной детекции РНК ЭВ и РНК ВКО**

Далее были проведены испытания по одновременному выявлению ВКО и кДНК ЭВ с использованием вируса ECHO 30 (лабораторный штамм № 1993 в концентрации $10^6$ ТЦД/мл из коллекции РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Для этого были приготовлены 5 последовательных 10-кратных разведений вируса ($10^5$–$10^1$ ТЦД/мл), в которые перед выделением РНК было внесено по 10 мкл ВКО, после чего была проведена процедура выделения и ОТ-ПЦР. Для детекции ВКО в ПЦР использовали все 3 разработанных набора праймеров и зондов, меченных FAM. Зонды, меченные HEX, не использовали, так как они давали более низкий уровень флюоресценции. Параллельно проводили ОТ-ПЦР без внутреннего контроля для сравнения эффективности мультиплексной ПЦР ВКО+ЭВ и моноплексной ПЦР ЭВ. Результаты амплификации представлены в таблице 2.

Таблица 2. — Результат амплификации кДНК вируса ECHO 30 в мультиплексной ПЦР с одновременным выявлением кДНК ВКО

| Сочетание праймеров | $10^5$ ТЦД/мл ECHO30+ ВКО | $10^4$ ТЦД/мл ECHO30+ ВКО | $10^3$ ТЦД/мл ECHO30+ ВКО | $10^2$ ТЦД/мл ECHO30+ ВКО | $10^1$ ТЦД/мл ECHO30+ ВКО | ВКО | ОКО |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Пороговые циклы (Ct) амплификации кДНК ЭВ/кДНК ВКО | | | | | | |
| EVfK1/EVr/EVPrKr | 20,5/– | 22,5/– | 26,9/– | 30,0/– | 34,0/– | – | – |
| MS2F1/ MS2R1/ MS2Z1f/ EVfK1/EVr/ EVPrK | 19,5/25,2 | 23,5/26,2 | 27,5/27,3 | 30,3/28,1 | 33,2/27,2 | –/24,4 | –/26,8 |
| MS2F2/ MS2R2/ MS2Z2f/ EVfK1/EVr/ EVPrK | 19,8/23,2 | 23,1/23,0 | 27,3/24,0 | 32,1/25,1 | 36,4/23,9 | –/22,0 | –/24,3 |
| MS2F3/ MS2R3/ MS2Z3f/ EVfK1/EVr/ EVPrK | 19,6/24,0 | 22,8/24,2 | 27,2/25,0 | 30,4/25,5 | 32,8/24,2 | –/22,1 | –/25,1 |

Из таблицы 2 видно, что в диапазоне концентраций кДНК ЭВ, соответствующих от $10^5$ до $10^1$ ТЦД/мл вируса ECHO 30, внесение ВКО и проведение мультиплексной ПЦР с 1 и 3 вариантами сочетаний праймеров для детекции ВКО не приводило к снижению эффективности выявления кДНК ЭВ и повышению пороговых циклов реакции.

Результаты изучения стабильности компонентов тест-системы показали, что хранение их в виде готовых растворов для компоновки тест-системы (раствор № 1, содержащий буфер для Taq-полимеразы, $MgCl_2$ и dNTP, раствор № 2, содержащий праймеры и зонды, раствор № 3 — Taq-полимераза) при -18ºС в течение 6 мес. не приводило к потере их активности и снижению эффективности ПЦР (рисунок 3).

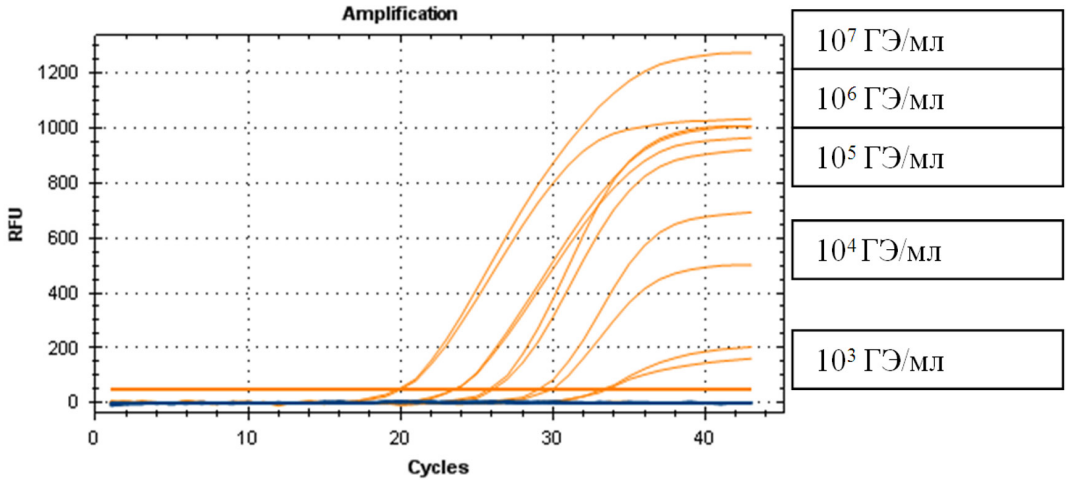



**Рисунок 3. — Детекция различных концентраций ДНК *pEV*321-1056 в ПЦР с использованием ПЦР-смеси 1 и ПЦР-смеси 2 (вариант № 2) после 6 мес. хранения при -18ºС**

Далее была подтверждена стабильность препаратов ВКО и ПКО после 6 мес. хранения при +4–7ºС.

Для создания экспериментального образца тест-системы на следующем этапе были проведены исследования, направленные на выбор производителя ключевых компонентов набора — ДНК-полимеразы, праймеров и гибридизационных зондов, которыми будет комплектоваться набор. Результаты сравнительных испытаний ДНК-полимераз 4 различных производителей и олигонуклеотидов 2 производителей позволили выбрать оптимальных для производства набора. Следует отметить, что чувствительность реакции при использовании полимераз и олигонуклеотидов различных производителей варьировала в пределах 2 lg ГЭ/мл.

**Заключение.** В результате исследований был разработан экспериментальный образец тест-системы, включающий: ПЦР-смесь 1 (универсальная смесь, содержащая ПЦР-буфер для Taq-полимеразы, $MgCl_2$, и дНТФ); ПЦР-смесь 2 (специфическая ПЦР-смесь, включающая праймеры и зонды для детекции кДНК ЭВ и ВКО); раствор Taq-полимеразы; ПКО (армированная РНК, содержащая фрагмент-мишень для детекции ЭВ); ОКО (буферный раствор, не содержащий ДНК); ВКО (армированная РНК, содержащая фрагмент-мишень для детекции ВКО). Общий объем реакции составляет 25 мкл. Тест-система предназначена для проведения 60 реакций, включая контроли. Она адаптирована для использования на приборах роторного (Rotor Gene, Corbett) и планшетного (CFX, BioRad) типа.

В качестве полевых испытаний были проведены параллельные исследования с использованием разработанного экспериментального образца тест-системы и коммерческого набора «Enterovirus-FL» (АмплиСенс, РФ) 56 проб клинического материала и окружающей среды, переданных в лабораторию для лабораторной диагностики ЭВИ и санитарно-вирусологических исследований. Полученные результаты показали, что совпадение результатов было получено в 89% проб (50 из 56), в т. ч. в отношении 34 проб, содержащих и 16 не содержащих ЭВ. Дискордантные результаты были получены в 11% проб (6 образцов), в т. ч. 7% (4 пробы) были положительными в постановке с использованием экспериментального образца тест-системы и отрицательными — с использованием

«Enterovirus-FL», а 4% (2 пробы) — положительными в постановке с использованием «Enterovirus-FL» и отрицательными — с использованием экспериментального образца. Следует отметить, что все дискордантные результаты были получены для проб из объектов окружающей среды (вода, смывы с поверхностей), содержащих крайне низкое количество РНК ЭВ (пороговые циклы от 37 и выше, что соответствует менее $10^3$ ГЭ/мл РНК вируса). Для подтверждения того, что пробы положительные с использованием экспериментального образца тест-системы действительно содержали РНК ЭВ, было проведено накопление фрагмента ДНК для молекулярного типирования. Полученные результаты показали, что в 1 из 4 исследуемых образцов содержалась РНК вакцинного полиовируса 2 типа, для остальных проб накопить достаточное для секвенирования количество ДНК не удалось. Таким образом, результаты полевых испытании свидетельствовали о том, что дискордантные результаты были получены для образцов, содержащих количество РНК на уровне или ниже порогового значения чувствительности тест-системы.

В настоящее время проводится работа по подготовке комплекта научно-технической документации для освоения производства тест-системы, которое запланировано на 2016 г.

**Литература**

1.Молекулярно-эпидемиологический анализ возбудителей энтеровирусной инфекции в Республике Беларусь / Т.В. Амвросьева [и др.] // Здравоохранение. — 2007. — № 11. — С. 33–36.

2.Молекулярно-эпидемиологический анализ неполиомиелитных энтеровирусов, циркулирующих в водных объектах Республики Беларусь / А.А. Безручко [и др.] // Здравоохранение. — 2008. — № 11. — С. 23–28.

3.Генетическое разнообразие эпидемически значимых возбудителей энтеровирусной инфекции / Н.В. Поклонская [и др.] // Молекулярная медицина. — 2011. — № 3. — С. 48–53.

4.Особенности первичной структуры капсидных белков возбудителей энтеровирусного миокардита / К.Л. Дедюля [и др.] // Воен. медицина. — 2010. — № 3. — С. 51–54.

5.Генетические характеристики регионов, кодирующих капсидные белки вируса ECHO 30 и его потенциальные детерминанты кардиовирулентности / К.Л. Дедюля [и др.] // Мед. панорама. — 2008. — № 5. — С. 28-30.

6.Трансформация бактерий [Электронный ресурс] // Классическая и молекулярная биология. — 2005. — Режим доступа: http://molbiol.ru/protocol/03_04.html. — Дата доступа: 11.07.2012.

7.MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. — 2013. — Vol. 30. — P. 2725–2729.

8.Construction of armored RNA containing long-size chimeric RNA by increasing the number and affinity of the pac site in exogenous rna and sequence coding coat protein of the MS2 bacteriophage / B. Wei [et al.] // Intervirology. — 2008. — Vol. 51, № 2. — P. 144–150.

## ENTEROVIRUS PCR KIT: DEVELOPMENT, ANALYTICAL CHARACTERISTICS AND FIELD TRIALS

*Paklonskaya N.V. Dziadzulia K.L, Amvrosieva T.V, Zemlianski V.A., Loziuk S.K.*

*State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology and Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

As a result of the studies we developed an experimental model of the PCR kit for the detection of enterovirus in clinical specimens and environmental samples with the following analytical characteristics: sensitivity — $10^3$ GE/ mL, specificity — 100%. Field trials of the experimental sample were carried out in comparison with "Enterovirus-FL" kit (AmpliSens, Russia) on 56 clinical and environmental samples. The results showed that in 89% of the samples was obtained the same results, in 11% of samples — discordant results. Discordant results were obtained for samples containing RNA at or below the threshold sensitivity of the kit.

**Keywords:** enterovirus, laboratory diagnosis, PCR.

Поступила 16.09.2015

# О ПРОФИЛАКТИКЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ ПРИ ОКАЗАНИИ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

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

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

**Реферат.** При оказании медицинской помощи, проведении медицинских процедур и манипуляций, переливании донорской крови и ее препаратов существуют реальные риски передачи ВИЧ-инфекции. Благодаря реализуемым профилактическим мероприятиям удалось предотвратить возникновение случаев инфицирования ВИЧ через донорскую кровь и ее компоненты. Значительное внимание уделяется профилактическим мероприятиям по предупреждению профессиональных случаев заражения ВИЧ среди медработников. Согласно имеющимся данным, ежегодно в медицинских учреждениях области имеют место аварийные ситуации. Наибольшие риски возникновения аварий существуют в операционных и процедурных кабинетах.

**Ключевые слова:** ВИЧ, СПИД, доноры, постконтактная профилактика, аварийные ситуации.

Вопросы профилактики передачи ВИЧ-инфекции при оказании медицинской помощи находятся под пристальным контролем санитарно-эпидемиологической службы. В официальной структуре профессиональной заболеваемости медицинских работников ведущим фактором, вызывающим профзаболевания, является биологический.

Биологический фактор может обусловливать передачу группы гемоконтактных инфекций, в числе которых наиболее опасной является ВИЧ-инфекция. Риски ее передачи существуют при осуществлении ряда медицинских процедур и манипуляций, переливании донорской крови и ее препаратов.

Одной из приоритетных задач, поставленных Государственной программой профилактики ВИЧ-инфекции на 2011–2015 гг., планом Брестского областного исполнительного комитета по ее реализации является обеспечение безопасных условий работы в медицинских учреждениях, связанной с проведением медицинских манипуляций с нарушением целостности кожных покровов и слизистых оболочек, а также обеспечение безопасности применения донорской крови, ее компонентов и препаратов для переливания пациентам.

Благодаря реализуемым мероприятиям удалось предотвратить возникновение случаев инфицирования ВИЧ через донорскую кровь и ее компоненты за счет использования современных методов. К ним относятся:

- закупка современных тест-систем для «двойного тестирования» донорской крови (антиген/антитело);
- организация 4–6-месячной карантинизации донорской плазмы;
- приобретение за счет областного бюджета для ГУ «Брестская областная станция переливания крови» ПЦР-лаборатории для тестирования донорской крови и ее компонентов на ВИЧ;
- приобретение оборудования для замораживания эритроцитов для ГУ «Брестская областная станция переливания крови». Предполагается в 2015 г. завершить поставку низкотемпературных морозильников (-86°С) для хранения замороженных эритроцитов.

За весь период наблюдения выявлено 28 ВИЧ-инфицированных доноров. В 2013 г. выявлен 1 кадровый ВИЧ-инфицированный донор, который не послужил источником заражения для реципиентов.

В 2014 г. выявлено 2 случая ВИЧ-инфекции у доноров (рисунок 1) (г. Барановичи, Пружанский район). Заготовленные продукты крови были утилизированы и не послужили источником заражения ВИЧ реципиентов. Случаев заражения реципиентов через донорскую кровь и ее компоненты за весь период наблюдения не зарегистрировано.

В учреждениях службы переливания крови осуществляется систематический контроль выполнения требований директивных и нормативных правовых документов по отбору доноров, обследованию донорской крови и ее применению в клинической практике. В областной станции переливания крови в целях обеспечения безопасного производства препаратов крови из плазмы, не прошедшей карантинизацию, внедрен метод тестирования в ПЦР образцов плазмы, пулируемой при каждой загрузке для фракционирования.

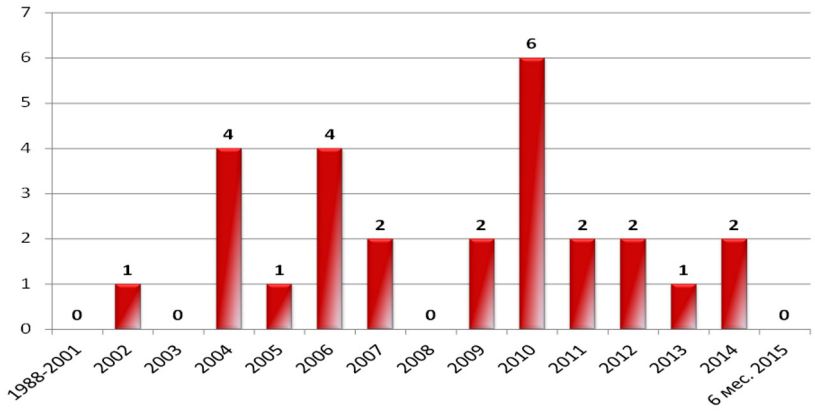



**Рисунок 1. — Динамика регистрации ВИЧ-инфекции среди доноров**

Внедряются безопасные технологии оказания медицинской помощи, утилизации и обеззараживания отработанных материалов, инструментов. С этой целью для учреждений здравоохранения согласно госпрограмме осуществляется закупка средств индивидуальной защиты.

Территориальными центрами гигиены и эпидемиологии осуществляется плановый контроль выполнения требований действующих нормативно-распорядительных документов по соблюдению санитарно-эпидемиологического режима, правилам отбора доноров, профилактике профессиональных заражений гемоконтактными инфекциями и др. в учреждениях службы переливания крови.

Значительное внимание уделяется профилактическим мероприятиям по предупреждению профессиональных случаев заражения ВИЧ среди медработников.

В соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 № 351 «Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД», приложение № 5 «Инструкция по профилактике внутрибольничного заражения ВИЧ-инфекцией и предупреждению профессионального заражения медицинских работников», клиническими стандартами (протоколами) проведения антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекции, раздел 10 «Постконтактная профилактика», утвержденных Министерством здравоохранения Республики Беларусь от 25.03.2005 регистрационный № 42-035 во всех медицинских учреждениях налажена ежегодная плановая спецучеба с медперсоналом с обязательными итоговыми зачетными занятиями. Все вновь принятые на работу медицинские работники по роду своей деятельности, имеющие контакт с биологическими жидкостями пациентов, прежде чем приступить к исполнению своих обязанностей проходят специальное обучение по безопасным методам работы. После обучения они сдают под роспись в журнале по охране труда и технике безопасности зачет, затем получают допуск к работе.

В УО «Брестский медицинский колледж» ежегодно организуется и проводится специальный тематический курс повышения квалификации для средних медицинских работников по проблеме ВИЧ-инфекции. Практикуется проведение тематических лекционных занятий по мерам профессиональной безопасности, профилактике внутрибольничных заражений ВИЧ-инфекцией для различных категорий медицинских сестер. Практическое обучение необходимым навыкам работы с демонстрацией положительного опыта работы проводится на базе наиболее современных и соответственно полно оснащенных областных и городских медицинских учреждений. Ежегодно проходят переподготовку по данной тематике более 500 средних медицинских работников.

Также отделом профилактики ВИЧ/СПИД ГУ «Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» ежегодно проводятся областные семинары для врачей-эпидемиологов, инфекционистов, лаборантов с обсуждением наиболее значимых и актуальных проблем по ВИЧ/СПИД.

Очевидна актуальность постконтактной профилактики (ПКП), являющейся необходимой мерой защиты медперсонала в случае возникновения аварийных ситуаций, при которых вероятность проникновения биологической жидкости, содержащей ВИЧ, достаточно велика:

- случайная травма иглой или хирургическим инструментом;
- попадание биологической жидкости на поврежденную кожу или слизистые;

- переливание зараженной ВИЧ крови и ее препаратов;
- использование загрязненных биологическими жидкостями инструментов.

На протяжении 72 ч распространение вируса можно предотвратить с помощью ПКП, представляющей из себя назначение краткосрочного курса приема антиретровирусных препаратов.

Тем не менее ПКП не является эффективной на 100%, даже если она была начата через очень короткое время после контакта, т. е. в первую очередь жизненно важно применить все меры профилактики передачи ВИЧ.

В целом ВИЧ характеризуется низкой контагиозностью. Частота развития ВИЧ-инфекции после контакта, связанного с высоким риском заражения, составляет от 1:1000 до 1:100. Для сравнения вирус гепатита *С* заразнее в 10 раз, а вирус гепатита *В* в 100 раз. Вероятность заражения ВИЧ напрямую зависит от длительности контакта с зараженной биологической жидкостью. Теоретически вероятность заражения при контакте с содержащей ВИЧ биологической жидкостью более высока при высокой вирусной нагрузке. Быстрое удаление заразной биологической жидкости с поврежденной кожи или слизистой оболочки путем промывания и дезинфекции предположительно уменьшает риск заражения.

Анализ ретроспективных исследований «случай–контроль» показал, что профилактический прием даже одного антиретровирусного препарата после контакта уменьшает риск развития инфекции примерно на 80%. Комбинированная медикаментозная профилактика носит еще более эффективный характер.

По литературным данным, были зарегистрированы случаи заражения ВИЧ, несмотря на проведение ПКП. При заражении ВИЧ от пациентов, получающих антиретровирусную терапию, могут передаваться резистентные к препаратам ПКП штаммы ВИЧ.

В организациях здравоохранения Брестской области, согласно имеющимся учетным данным, имели место аварийные ситуации с биологическим материалом пациентов.

В настоящее время организация ПКП настойчиво внедряется в медицинских учреждениях. К сожалению, допускается недостаточная оценка значимости ПКП. Журналы регистрации аварийных ситуаций заведены практически во всех медицинских учреждениях, однако не всегда и не везде они с должной ответственностью заполняются. Допускаются элементы формального отношения к их ведению, что требует в свою очередь изменения психологического отношения к данной проблеме. Зачастую медицинские работники недооценивают значимость существующих рисков инфицирования ВИЧ при выполнении медицинских процедур, связанных с нарушением целостности кожных покровов и слизистых оболочек, предпочитают умалчивание вместо регистрации аварийной ситуации и проведения ПКП.

Вместе с тем наиболее важный фактор для начала ПКП — время. Вероятность предотвратить ВИЧ-инфекцию максимальна, если ПКП начата в первые 24 ч после контакта с ВИЧ. Лучше всего начинать ПКП в первые 2 ч после контакта. Чем позже начата ПКП, тем выше риск диссеминации вируса. Начинать ПКП через 72 ч после контакта бессмысленно.

В случаях, когда в этот промежуток времени получить консультацию специалиста по лечению ВИЧ-инфекции невозможно, лучше сразу начать ПКП. Ее можно будет отменить в любой момент, если окажется, что в ней нет необходимости (рисунок 2).

Согласно имеющимся неполным данным (т. к. не все аварии регистрируются) ежегодно в медицинских учреждениях области имеют место аварийные ситуации.

Анализ аварийных ситуаций (рисунок 3) по подразделениям свидетельствует о том, что наибольшие риски возникновения аварий существуют в операционных и процедурных кабинетах.

Риску заражения ВИЧ-инфекцией при аварийных ситуациях были подвержены все категории медицинского персонала, но наибольшую часть (51,6%) из них составляли врачи, 44,2% — средний медперсонал, 4,2% — младший медицинский персонал (рисунок 4).

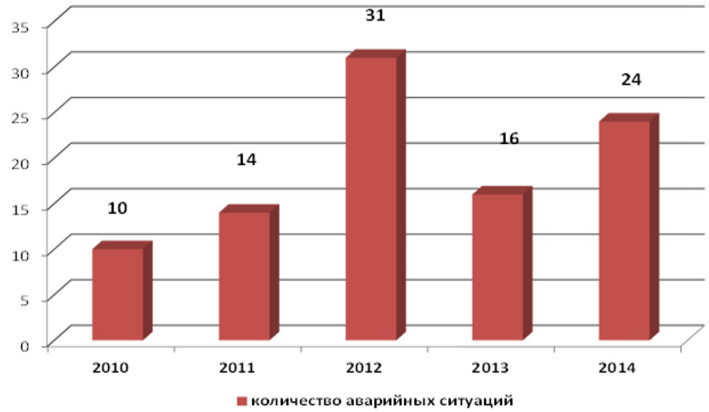



**Рисунок 2. — Регистрация аварийных ситуаций с биологическим материалом пациентов в учреждениях здравоохранения Брестской области**

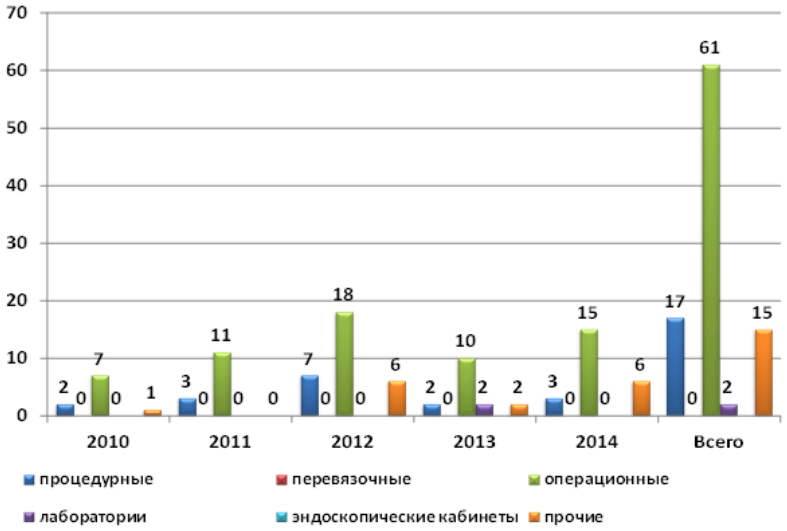



**Рисунок 3. — Регистрация аварийных ситуаций среди медицинских работников по подразделениям в организациях здравоохранения**

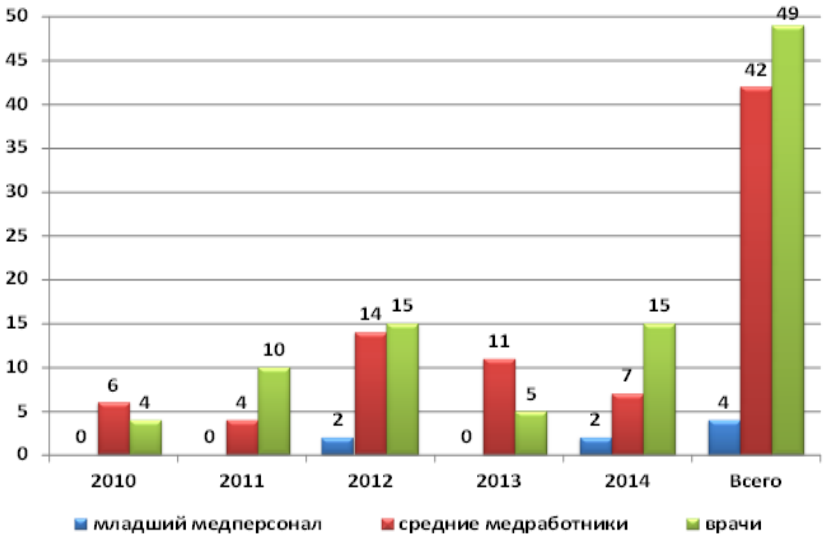



**Рисунок 4. — Регистрация аварийных ситуаций среди различного медперсонала в организациях здравоохранения**

В Брестской области не зарегистрировано случаев профессиональных заражений ВИЧ-инфекцией среди медицинских работников.

Вместе с тем из числа медицинских работников выявлено 15 ВИЧ-инфицированных лиц, в т. ч. 5 при прохождении профилактических медицинских осмотров. Во всех случаях обозначен гетеросексуальный путь передачи ВИЧ-инфекции. Зарегистрирован летальный исход у медработника, заболевание у которого было выявлено в терминальной стадии СПИДа. Следовательно, можно предположить, что при возникновении аварийных ситуаций медицинские работники в силу длительного асимптомного периода могут послужить источником инфицирования ВИЧ для пациента.

Анализ регистрации случаев ВИЧ-инфекции у медицинских работников за весь период наблюдения (с 1988 по 2014 гг. и 6 мес. 2015 г. включительно) представлен на рисунке 5.

**Рисунок 5. — Регистрация случаев ВИЧ-инфекции среди медицинских работников**

**Заключение.** Защита донорства от проникновения ВИЧ-инфекции является одним из приоритетных направлений в системе здравоохранения и требует постоянного контроля и неукоснительного выполнения существующих директивно-распорядительных документов.

Существуют реальные риски инфицирования ВИЧ при проведении медицинских манипуляций с повреждением целостности кожных покровов и слизистых оболочек. Наибольшее число аварий регистрируется в операционных и процедурных кабинетах. Риску заражения ВИЧ-инфекцией при аварийных ситуациях были подвержены все категории медицинского персонала, но наибольшую часть (51,6%) из них составляют врачи и средний медперсонал (44,2%). В связи с чем необходимо работать над исключением формального отношения медицинских работников к экстренной профилактике ПКП в случае аварийных ситуаций, что в свою очередь обязывает их изменить психологическое отношение к данной проблеме.

При осуществлении контроля специалистами санитарно-эпидемиологической службы за профилактикой внутрибольничных инфекций в организациях здравоохранения следует усилить внимание к проблеме экстренной и постконтактной профилактики ВИЧ-инфекции при аварийных ситуациях.

**Литература**

1. Лоренсен, Т. Постконтактная профилактика (ПКП) [Электронный ресурс] / Т. Лоренсен, К. Грефе / Американский международный союз здравоохранения; Инфосеть «Здоровье Евразии». — М., 2005. — Режим доступа: http://www.tokb.ru/elibrary/book/aids/files/27_Post-Exposure_Prophylaxis_(PEP).pdf. — Дата доступа: 01.09.2015.

2. Постконтактная профилактика [Электронный ресурс] / И.А. Карпов [и др.] // Клинические стандарты (протоколы) проведения антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекции. Диагностика, лечение и профилактика оппортунистических заболеваний у ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом взрослых и подростков. — Минск: Белсэнс, 2005. — С. 100–112. — Режим доступа: http://www.aids.by/upload/iblock/da6/protokol_parent.pdf. — Дата доступа: 01.09.2015.

3. Батанова, Е.В. Профилактика профессионального инфицирования вирусом иммунодефицита человека медицинских работников в лечебно-профилактических учреждениях [Электронный ресурс] / Е.В. Батанова, Т.В. Русова, А.П. Щуренков / ОБУЗ «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» Ивановской обл.; М-во здравоохр. Рос. Федерации. — Режим доступа: http://ivspeedcentr.ru/files/docs/stat.doc. — Дата доступа: 01.09.2015.

## ON THE PREVENTION OF HIV INFECTION IN HEALTH CARE

*Gindiuk N.T., Sadovnikova G.V., Glebko L.V., Rudaya L.N.*

*State Institution "Brest Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health", Brest, Republic of Belarus*

There are real risks of HIV transmission when medical care, medical procedures and manipulations, transfusion of blood and its products are used. Due to implemented preventive measures it was managed to prevent HIV infections through blood and its components. Considerable attention is paid to preventive measures for the prophylaxis of occupational HIV infections among health care workers. According to available data annually in medical institutions of the region there are emergencies. The greatest risk of accidents exists in the operating and treatment rooms.

**Keywords:** HIV, AIDS, donors, postexposure prophylaxis, emergency situations.

Поступила 09.09.2015

## РОЛЬ ТРОМБОЦИТОВ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ВИЧ-СТАТУСА У ВИЧ-ЭКСПОНИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ

*Анищенко Е.В, Красавцев Е.Л.*

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

**Реферат.** Проанализированы лабораторные показатели периферической крови при рождении у ВИЧ-инфицированных и ВИЧ-экспонированных детей. На первом году жизни диагноз ВИЧ-инфекции был установлен только 22 детям (19%). Статистически достоверными оказались более низкие показатели уровня тромбоцитов в периферической крови у ВИЧ-инфицированных детей. Рекомендуется при уровне тромбоцитов в периферической крови при рождении ниже $286\times10^9$/л провести ПЦР-диагностику ВИЧ-инфекции, что позволит установить диагноз ВИЧ-инфекции в более ранние сроки, назначить антиретровирусную терапию, избежать прогрессирования заболевания, развития оппортунистисческих заболеваний и смерти.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, ВИЧ-экспонированные дети, уровень тромбоцитов.

**Введение.** Наиболее значимая причина заражения ВИЧ-инфекции у детей до 15 лет — это вертикальная передача ВИЧ от матери к ребенку. Частота перинатальной трансмиссии ВИЧ в развитых странах составляет около 15–25% в год, в развивающихся — 25–45%. У большинства ВИЧ-инфицированных детей при рождении отсутствуют клинические проявления ВИЧ. Однако у 78% ВИЧ-инфицированных детей первые симптомы ВИЧ-инфекции появляются уже на 1 году жизни [1]. В Республике Беларусь самым неблагополучным в плане ВИЧ-инфекции регионом является Гомельская область [2]. По данным отдела профилактики ВИЧ/СПИД ГУ «Гомельский областной ЦГЭиОЗ», на 01.03.2015 от ВИЧ-инфицированных матерей в области родилось 1394 ребенка. На учете состоит 126 ВИЧ-инфицированных детей.

Все дети, рожденные ВИЧ-инфицированными матерями, обследуются согласно протоколам «Оптимизация подходов к наблюдению и лечению детей с ВИЧ/СПИДОМ (инструкция по применению)» [3]. Согласно данному документу для установления ВИЧ-статуса ребенку, рожденному ВИЧ-инфицированной матерью, проводят специальные лабораторные исследования:

- качественное определение ДНК ВИЧ методом ПЦР в 2 и 4 мес.;
- определение антител к ВИЧ в ИФА/ИБ в возрасте 9, 12 и 18 мес.

Несмотря на то, что современные методы диагностики ВИЧ-инфекции позволяют достоверно исключить ее в ранние сроки жизни ребенка, окончательное решение об отсутствии ВИЧ-инфекции может быть принято только на основании отрицательных результатов определения антител к ВИЧ. Ребенок может быть снят с учета при отсутствии ВИЧ-инфекции в возрасте не менее 18 мес. В случае обследования детей по контакту с матерью, которой диагноз ВИЧ-инфекции установили после рождения ребенка, по клиническим показаниям, по причине отказа родителей от обследования ребенка, отсутствия диагностикумов для постановки лабораторных исследований ВИЧ-статус устанавливается в более старшем возрасте [3].

Согласно клиническому протоколу для европейского региона ВОЗ «Лечение и помощь при ВИЧ/СПИДе у детей» (2012) каждому младенцу, рожденному ВИЧ-позитивной или необследованной на ВИЧ женщиной, необходимо определить ВИЧ-статус как только он попадет в поле зрения системы здравоохранения — при рождении или после рождения, но не позже достижения им возраста 6 недель. Первое вирусологическое исследование следует провести примерно через 48 ч после рождения ребенка. Следующее вирусологическое исследование должно быть выполнено в возрасте 4–6 недель. Оно позволяет выявить более 95% младенцев, зараженных внутриутробно или во время родов. Задержка с исследованием приводит к поздней диагностике и создает у ребенка, живущего с ВИЧ-инфекцией, угрозу прогрессирования болезни и смерти. Второй положительный результат исследования в возрасте 4–6 недель указывает на необходимость начала АРТ. Вирусологическое исследование в возрасте 3 мес. можно считать подтверждающим тестом на ВИЧ-инфекцию [4].

**Цель** исследования — усовершенствование тактики обследования для установления ВИЧ-статуса у ВИЧ-экспонированных детей.

**Материалы и методы.** Проведен анализ установления ВИЧ-статуса и лабораторного обследования 117 ВИЧ-инфицированных детей, родившихся в Гомельской области и состоящих на учете в КДК ВИЧ/СПИД ГОИКБ. Антиретровирусная профилактика для снижения перинатальной передачи ВИЧ-инфекции от матери к плоду применялась только у 62 детей (53%). Она включала полную профилактику (и матери, и ребенку, проведена в 21 случае, 18%) и неполную профилактику (или только матери, или только ребенку в 41 случае, 35%). Также сравнивались параметры физического развития и некоторых лабораторных показателей у 117 ВИЧ-инфицированных детей, родившихся в Гомельской области и состоящих на учете в консультативном кабинете ВИЧ/СПИД Гомельской областной инфекционной больницы, 106 ВИЧ-экспонированных детей. Проанализированы протоколы патологоанатомических вскрытий перинатальных и младенческих вскрытий 25 детей в возрасте до 1 года, умерших в период с сентября 1998 г. по январь 2010 г., матери которых были ВИЧ-инфицированы.

Статистический анализ данных проводился с применением пакета прикладных программ Statistica 6,0 с использованием данных непараметрической статистики. Для количественных показателей рассчитывались медиана (Me) и интерквартильный размах (ИКР, 25%–75%). Качественные показатели представлялись в виде абсолютного числа наблюдений и доли (%) от общего числа пациентов в соответствующей группе. Значимость различий оценивалась критерием Манна–Уитни, статистически значимыми считались различия при $p<0,05$.

Прогностическую значимость показателей периферической крови, статистически достоверно отличных у ВИЧ-инфицированных и ВИЧ-экспонированных оценивали с помощью модуля ROC анализа программы MedCalc v.7.4.4.1. Строили характеристическую кривую (ROC-curve). По оси ординат для каждой точки отсечения откладывали значение чувствительности, по оси абсцисс — долю ложноположительных результатов (100% минус специфичность). Вычисляли площадь под характеристической кривой (AUC-AreaUndeCurve). Оптимальную точку отсечения (optimalcutoffvalue) определяли по максимальному значению суммы чувствительности и специфичности. Статистически значимой считалась 95% вероятность различий ($\alpha = 0,05$).

**Результаты и их обсуждение.** С 1995 г. наблюдается тенденция к уменьшению количества ВИЧ-инфицированных детей.

Выявление детей и установление диагноза ВИЧ-инфекции в Гомельской области началось с 1999 г., когда диагноз ВИЧ-инфекции был установлен 2 детям. В таблице 1 представлены данные о количестве ВИЧ-инфицированных детей по годам установления ВИЧ-статуса.

Таблица 1. — Количество детей с установленным диагнозом ВИЧ-инфекции по годам установления

| Год установления диагноза ВИЧ-инфекции | Количество детей с установленным диагнозом ВИЧ-инфекции | Количество детей с установленным диагнозом ВИЧ-инфекции на первом году жизни, n (%) | Количество детей с установленным диагнозом ВИЧ-инфекции после первого года жизни, n (%) |
|---|---|---|---|
| 1999 | 2 | 0 | 2 (100%) |
| 2000 | 3 | 0 | 3 (100%) |
| 2001 | 3 | 0 | 3 (100%) |
| 2003 | 3 | 1 (33%) | 2 (66%) |
| 2004 | 17 | 2 (12%) | 15 (88%) |
| 2005 | 13 | 0 | 13 (100%) |
| 2006 | 8 | 0 | 8 (100%) |
| 2007 | 15 | 2 (13%) | 13 (87%) |
| 2008 | 7 | 1 (14%) | 6 (86%) |
| 2009 | 9 | 2 (22%) | 7 (78%) |
| 2010 | 11 | 4 (36%) | 7 (64%) |
| 2011 | 11 | 5 (45%) | 6 (55%) |
| 2012 | 6 | 2 (33%) | 4 (67%) |
| 2013 | 8 | 3 (38%) | 5 (62%) |
| 2014 | 1 | 0 | 1 (100%) |

На первом году жизни диагноз ВИЧ-инфекции впервые был установлен ребенку только в 2003 г. Несмотря на регламентирующие сроки установления ВИЧ-статуса у детей («Оптимизация подходов к наблюдению и лечению детей с ВИЧ/СПИДОМ (инструкция по применению)» на первом году жизни диагноз ВИЧ-инфекции был установлен только 22 детям (19%). Диагноз у них установлен на основании клинических данных и двух положительных результатов ПЦР. В возрасте после одного года диагноз установлен 95 (81%) детям.

Параметры физического развития (масса и длина тела, окружность грудной клетки, окружность головы) у детей сравниваемых групп были в пределах возрастной нормы. При анализе параметров физического развития ВИЧ-экспонированнных и ВИЧ-инфицированных детей при рождении существенных отличий не наблюдалось. Лабораторные показатели периферической крови в сравниваемых группах были в пределах нормы (таблица 2).

Таблица 2. — Показатели лабораторных исследований периферической крови новорожденных в первые сутки жизни

| Лабораторные показатели | ВИЧ-инфицированные дети Me (25; 75%) | ВИЧ-экспонированные дети Me (25; 75%) | Уровень p |
|---|---|---|---|
| Эритроциты,$10^{12}$/л | 5,4 (5; 6) | 5 (4,5; 5,6) | 0,008 |
| Гемоглобин, г/л | 186 (170; 200) | 184 (174; 205) | 0,5 |
| Лейкоциты, $10^{9}$/л | 17 (11; 20) | 18 (12; 21) | 0,6 |
| Тромбоциты,$10^{12}$/л | 245 (208; 270) | 297 (225; 319) | 0,04 |

Статистически достоверными оказались более низкие показатели уровня тромбоцитов в периферической крови у ВИЧ-инфицированных детей при сравнении с группой ВИЧ-экспонированных новорожденных, количество тромбоцитов у последних было большим (245 (208; 270) и 297 (225;319) соответственно, уровень P = 0,04).

Анализ прогностической значимости показателей уровня тромбоцитов при рождении оценивали на основе сравнения площади под характеристической кривой (AUC). Оценивались площадь под кривой, 95% доверительный интервал (ДИ) оценки площади, находилась точка разделения, оценивалась чувствительность и специфичность данного параметра при использовании найденной точки разделения. Данные представлены на рисунке.

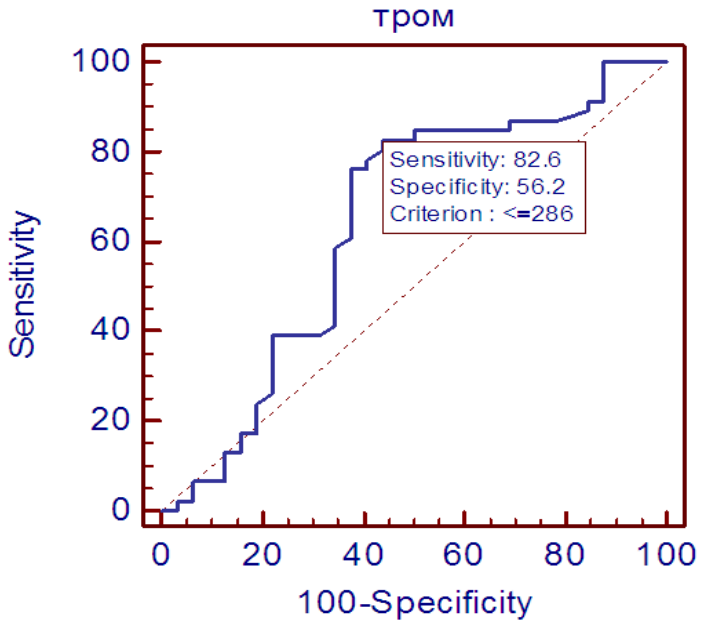



**Рисунок — Прогностическая значимость уровня тромбоцитов при рождении для установления ВИЧ-статуса у ВИЧ-экспонированных детей**

При изучении площади под характеристической кривой установлено, что для уровня тромбоцитов показатель AUC составил 0,6 (ДИ 0,5–0,7). Проанализированы чувствительности и специфичности различных точек отсечения для исследуемого показателя. Установлено, что оптимальной точкой отсечения явился уровень тромбоцитов, равный $286\times10^9$/л. Чувствительность этого значения составила 82,6%, специфичность — 56,2%, сумма чувствительности и специфичности — 138, 8% (ОШ 1,6 раза, ДИ 0,07–0,38; p<0,001;  +LR = 1,89; -LR = 0,31).

Этот анализ показал, что при уровне тромбоцитов в периферической крови при рождении ниже $286\times10^9$/л (чувствительность — 82,6%, специфичность — 56,2%) можно прогнозировать установление ВИЧ-инфекции.

При ROC-анализе прогностическая значимость уровня эритроцитов у новорожденных детей для определения ВИЧ-статуса оказалась мало чувствительной (53%) и недостаточно специфичной (71%), при точке разделения $5\times10^{12}$/л.

**Заключение.** На первом году жизни диагноз ВИЧ-инфекции был установлен только 22 детям (19%).При сравнении лабораторных данных при рождении статистически достоверно более низкими оказались показатели уровня тромбоцитов в периферической крови у ВИЧ-инфицированных при сравнении с группой ВИЧ-экспонированных  детей. Анализ прогностической значимости показателей уровня тромбоцитов для установления ВИЧ-статуса при рождении показал, что при уровне тромбоцитов в периферической крови при рождении ниже $286\times10^9$/л этим детям необходимо провести ПЦР-диагностику ВИЧ-инфекции, что позволит установить диагноз ВИЧ-инфекции, назначить антиретровирусную терапию, избежать прогрессирования заболевания, развития оппортунистических заболевания и смерти.

**Литература**

1. ВИЧ-инфекция у взрослых и детей / Н.В. Матиевская [и др.] // Оппортунистические инфекции и заболевания: пособие для студентов. — Гродно: ГрГМУ, 2011. — 400 с.

2. Рытик, П.Г. ВИЧ-инфекция в Беларуси / П.Г. Рытик // Здравоохранение. — 2015. — № 2. — С. 18–25.

3. Оптимизация подходов к наблюдению и лечению детей с ВИЧ/СПИДом: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 20.09.2008. — Минск, 2008. — 100 с.

4. Клинические протоколы по лечению и помощи при ВИЧ/СПИДе для Европейского региона ВОЗ [Электронный ресурс] / Европейское региональное бюро ВОЗ, 2006. — Режим доступа: http://www.euro.who.int/aids/treatment/20060801 1?language=Russian. — Дата доступа: 01.03.2015.

## THE ROLE OF THROMBOCYTES IN DETERMINATION OF HIV STATUS IN HIV-EXPOSED CHILDREN

*Anischenko E.V., Krasavtsev E.L.*

*Educational Establishment "Gomel State Medical University", Gomel, Republic of Belarus*

The HIV status determination analysis and laboratory examination of 117 HIV-infected children which were born in Gomel region were done. The parameters of physical development and some laboratory parameters in 117 HIV-infected children in Gomel region were compared with the data of 107 HIV-exposed children.

Despite the accepted terms of HIV status in children determination (age 2 and 4 months), within the first year of life HIV diagnosis was confirmed only in 22 children (19%) based on clinical data and two positive PCR results. We analyzed the available autopsy protocols of HIV-exposed children. Of these, only two were diagnosed with HIV infection in infancy and the cause of their death was a viral infection. In other children due to various reasons HIV status until death has not been recognized.

Laboratory indicators of peripheral blood in the two groups were within normal limits. The platelet counts in peripheral blood of HIV-infected newborns (median 245) were significantly lower vs. HIV-exposed (median 297, $p = 0.04$). The level of platelets in the peripheral blood at birth below $286 \times 10^9$/L (sensitivity 82.6%, specificity 56.2%) can predict HIV infection.

**Keywords:** HIV- infection, HIV-exposed children, platelet count.

Поступила 08.09.2015

## ЭКСПРЕССИЯ CCR5 И CXCR4 ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТРОПИЗМА ВИРУСА

*Матиевская Н.В.[1], Киреев Д.Е.[2], Токунова И.О.[1], Гончаров А.Е.[3]*

*[1]Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Республика Беларусь;*

*[2]Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», Москва, Российская Федерация;*

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

**Реферат.** Установлено различие в экспрессии CCR5 и CXCR4 на разных стадиях ВИЧ-инфекции в зависимости от тропизма ВИЧ. У пациентов на стадии СПИД, инфицированных R5-тропным вариантом вируса, выявлено значимое снижение экспрессии CXCR4 на лимфоцитах крови и Т-хелперах, в то время как у пациентов, инфицированных не R5-тропным вариантом вируса, установлено снижение экспрессии CCR5 при сравнении с пациентами без СПИДа. Обнаруженные закономерности могут свидетельствовать о разных механизмах формирования иммуносупрессии в зависимости от характера тропизма вируса.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, СПИД, тропизм, CCR5, CXCR4, иммунокомпетентные клетки.

**Введение.** Репликация ВИЧ в различных клетках человека инициируется связыванием поверхностных рецепторов вируса и клетки: gp120 и CD4+ соответственно. Далее происходят конформационные изменения в оболочке вируса, благодаря чему возникает возможность связывания региона V3 gp120 с одним из основных ко-рецепторов: CCR5 или CXCR4, что детерминировано после-

довательностью аминокислот в данном регионе. Тропизм ВИЧ определяется характером используемых вирусом ко-рецепторов. Выделяют CCR5/R5-тропные вирусы, CXCR4/X4-тропные и вирусы с двойным тропизмом, которые могут использовать оба ко-рецептора. С течением ВИЧ-инфекции у части пациентов происходит переключение тропизма ВИЧ и появление не R5-тропных вариантов вируса, которые используют либо оба ХР для входа в клетки человека (ВИЧ с двойным тропизмом), либо ко-рецептор CXCR4 (X4-тропные ВИЧ) [1, 2]. Принято считать, что переключение тропизма ВИЧ свидетельствует о прогрессировании заболевания, поскольку X4-тропный ВИЧ обладает более выраженной цитопатогенностью, способен индуцировать образование гигантских многоядерных клеток (синцития) в инфицированных клетках, в связи с чем он получил название синцитий индуцирующего (SI) ВИЧ. В то время как R5-тропный вирус называют не синцитиций индуцирующий (NSI) [1, 3]. Вирулентные свойства R5 и X4 вирусов в условиях *in vivo*, главным образом, связаны с экспрессией ко-рецепторов на разных клетках хозяина. CXCR4 экспрессируются на CD4+ клетках, в т. ч. гемопоэтических клетках-предшественниках, клетках тимуса, naive Т-лимфоцитах и моноцитах, в то время как CCR5 встречаются в основном на клетках памяти — Т-лимфоцитах и макрофагах. Таким образом, переключение тропизма и использование CXCR4 ко-рецепторов обеспечивает доступ вируса к пулу важных целевых клеток, участвующих в онтогенезе Т-лимфоцитов, что может привести к ускоренному снижению содержания CD4+ Т-клеток и прогрессированию заболевания [4, 5]. В связи с этим смена тропизма и появление CXCR4-тропного вируса имеет значение для прогнозирования и мониторинга заболевания, решения вопроса о присоединении антиретровирусной терапии, для оптимального использования антагонистов CCR5-рецепторов, применение которых эффективно только при условии наличия доминирующей популяции R5-тропного вируса в организме инфицированного пациента [6–8].

Установлено, что с прогрессированием ВИЧ-инфекции и формированием СПИДа имеет место противоположно направленная динамика экспрессии CCR5 и CXCR4 на лимфоцитах крови у ВИЧ-инфицированных пациентов: экспрессия CXCR4 снижается, в то время как экспрессия CCR5 увеличивалась, что связано с активацией иммунитета на стадии СПИД, с одной стороны, и гибели пула Т-лимфоцитов, конституционно экспрессирующих CXCR4 — с другой стороны [1, 4].

**Цель** исследования — выявление особенностей экспрессии CXCR4 и CCR5 на лимфоцитах крови и Т-хелперах у ВИЧ-инфицированных пациентов на разных стадиях ВИЧ-инфекции в зависимости от тропизма вируса.

**Материалы и методы.** Иммунологические исследования были выполнены у 29 ВИЧ-инфицированных пациентов (средний возраст составил 33,5±7,2 года; мужчин — 13; женщин — 16), которые не получали АРВТ. Клинические стадии ВИЧ (ВОЗ, 2012) были следующими: 1-я — 17 (58,6%); 2-я — 6 (20,7%); 3-я — 5 (17,2%); 4-я — 1 (3,5%). Среди пациентов 17 были инфицированы R5-тропным вариантом ВИЧ и 12 — не R5-тропным вариантом. Стадия СПИД диагностировалась при наличии у пациента 4-й клинической стадии ВИЧ-инфекции или содержания CD4+Т-лимфоцитов менее 200 кл/мкл. Определение тропизма ВИЧ проводилось путем секвенирования V3 петли гена gp120 с помощью набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии (РФ) согласно инструкции производителя. Показатель FPR был принят за 20%. Иммунофенотип клеток крови определяли на проточном цитофлюориметре «FACSCalibur» («BectonDickenson», США) с использованием программного обеспечения «CellQuest» 3.3 и «Weasel» версия 3.1 (WEHI, Австралия). Для определения показателей иммунитета в работе использованы моноклональные антитела производства BectonDickinson (США) и ExBio (Чехия): CD3 (SK7), CD16 (B73.1), CD56 (NCAM 16.2), CD45 (2D1), CD19 (SJ25C1), CD4 (SK3), CD8 (SK1), CD184 (12G5), CD195 (2D7/CCR5).

Данные представлены в виде Me (min–max). Статистический анализ проводили с помощью пакета Statistica 10.

**Результаты и их обсуждение.** Распределение пациентов по стадиям ВИЧ-инфекции в группах исследования представлено в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, в обеих группах были пациенты на стадии СПИД, что указывает на отсутствие переключения тропизма вируса с прогрессированием ВИЧ-инфекции у 17,6% пациентов 1-й группы. В то же время во 2-й группе у 66,7% ВИЧ-инфицированных пациентов отсутствовали клинико-лабораторные признаки СПИДа, несмотря на установленную инфекцию не R5-тропным вариантом вируса.

Таблица 1. — Распределение пациентов по стадиям ВИЧ-инфекции

| Показатель | 1-я группа, n = 17 | 2-я группа, n = 12 | P* |
|---|---|---|---|
| СПИД | 3 (17,6%) | 4 (33,3%) | >0,05 |
| Не СПИД | 14 (82,4%) | 8 (66,7%) | >0,05 |

Экспрессия хемокиновых рецепторов на лимфоцитах крови и Т-хелперах у пациентов изучаемых групп при разных стадиях ВИЧ-инфекции представлена в таблице 2.

Таблица 2. — Экспрессия хемокиновых рецепторов CCR5 и CXCR4 на клетках крови в зависимости от тропизма ВИЧ

| Показатель | 1-я группа, n = 17 | | p* | 2-я группа, n = 12 | | p* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Не СПИД, n=14 | СПИД, n=3 | | Не СПИД, n=8 | СПИД, n=4 | |
| CXCR4, % | 15,71 (5,0–35,6) | 4,48 (2,1–14,3) | 0,04 | 11,64 (0,0–28,4) | 8,73 (6,0–33,0) | 0,93 |
| CXCR4, кл/мкл | 293,60 (101,5–863,0) | 53,92 (31,9–135,1) | 0,01 | 206,89 (0,7–672,7) | 68,20 (41,3–973,9) | 0,40 |
| CCR5, % | 32,86(13,3–6,7) | 42,58 (33,8–61,4) | 0,2 | 34,52 (5,9–45,7) | 36,60 (21,0–52,0) | 0,50 |
| CCR5, кл/мкл | 664,26 (259,0–1555,7) | 512,43 (505,2–579,5) | 0,2 | 561,14 (132,7–33,1) | 462,60 (110,2–1099,9) | 0,87 |
| CD4CXCR4, % | 5,71 (1,5–13,7) | 0,59 (0,07–8,3) | 0,2 | 3,76 (0,0–14,1) | 3,14 (0,8–17,3) | 0,87 |
| CD4CXCR4, кл/мкл | 107,43 (30,7–331,7) | 7,10 (1,1–78,4) | 0,02 | 60,60 (0,0–166,3) | 16,94 (10,6–510,0) | 0,40 |
| CD4CCR5, % | 2,73 (0,8–4,0) | 2,62 (0,7–3,3) | 0,5 | 3,29 (0,6–7,2) | 1,98 (0,6–4,2) | 0,17 |
| CD4CCR5, кл/мкл | 54,84 (21,9–84,6) | 31,36 (10,6–31,5) | 0,06 | 61,90 (13,3–129,0) | 20,81 (8,5–32,6) | <0,03 |
| Примечание — * — тест Манна–Уитни. | | | | | | |

Как видно из таблицы 2, в обеих группах пациентов на стадии СПИД отмечена тенденция к снижению экспрессии XP CCR5 и CXCR4 на лимфоцитах крови и на Т-хелперах по сравнению с пациентами без СПИДа. Однако статистически достоверное снижение экспрессии CXCR4 на лимфоцитах крови и Т-хелперах при сравнении с пациентами без СПИДа установлено у пациентов, инфицированных R5-тропным вариантом ВИЧ. У пациентов, инфицированных не R5-тропным вариантом ВИЧ, при наличии СПИДа установлено значительное снижение экспрессии CCR5 на Т-хелперах. В то время как экспрессия CXCR4, который в данном случае является одним из основных ко-рецепторов ВИЧ, не различалась достоверно на разных стадиях ВИЧ-инфекции при инфекции не R5-тропным вирусом.

**Заключение.** Установлено различие в экспрессии CCR5 и CXCR4 при формировании СПИДа в зависимости от тропизма ВИЧ. У пациентов, инфицированных R5-тропным вариантом вируса, выявлено значимое снижение экспрессии CXCR4 на лимфоцитах крови и Т-хелперах, в то время как у пациентов, инфицированных не R5-тропным вариантом вируса, установлено снижение экспрессии CCR5 на Т-хелперах при сравнении с пациентами без СПИДа. Обнаруженные закономерности могут свидетельствовать о разных механизмах формирования иммуносупрессии в зависимости от характера тропизма вируса. Для выполнения окончательных выводов и расшифровки патогенетических механизмов формирования СПИДа при разном тропизме вируса требуются исследования в более обширных группах пациентов.

**Литература**

1. Матиевская, Н.В. Ко-инфекция ВИЧ/ВГС: этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение / Н.В. Матиевская. — Гродно: ГрГМУ, 2013. — 352 с.

2.Mosier, D.E. How HIV changes its tropism: evolution and adaptation? / D.E. Mosier // Curr. Opin. HIV AIDS. — 2009. — Vol. 4, № 2. — P. 125–130.

3.Affinofile profiling: how efficiency of CD4/CCR5 usage impacts the biological and pathogenic phenotype of HIV / K. Chikere [et al.] // Virology. — 2013. — Vol. 435, № 1. — P. 81–91.

4.V3 loop sequence space analysis suggests different evolutionary patterns of CCR5- and CXCR4-tropic HIV / K. Bozek [et al.] // PLoS One. — 2009. — Vol. 4, № 10. — e7387.

5.Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage: application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients / L.C. Swenson [et al.] // J. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 203, № 2. — P. 237–245.

6.Fuse, S. Immune responses against persistent viral infections: possible avenues for immunotherapeutic interventions / S. Fuse, M.J. Molloy, E.J. Usherwood // Crit. Rev. Immunol. — 2008. — Vol. 28, № 2. — P. 159–183.

7.Matsiyeuskaya, N. Activation of blood T-cells in HIV/HCV co-infected patient / N. Matsiyeuskaya, V. Tsyrkunov // Sanamed. — 2013. — Vol. 8, № 1. — P. 11–18.

8.Activation and cell cycle antigens in CD4+ and CD8+ T cells correlate with plasma human immunodeficiency virus (HIV-1) RNA level in HIV-1 infection / J.M. Orendi [et al.] // J. Infect. Dis. — 1998. — Vol. 178, № 5. — P. 1279–1287.

## CCR5 AND CXCR4 EXPRESSION BY IMMUNOCOMPETENT CELLS IN HIV-INFECTED PATIENTS DEPENDING ON VIRUS TROPISM

*Matsiyeuskaya N.V.[1], Kireev D.E.[2], Tokunova I.O.[1], Hancharou A.Y.[3]*

*[1]Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Republic of Belarus;*
*[2]Federal Budget Scientific Institution "Central Research Institute for Epidemiology", Moscow, Russian Federation;*
*[3]State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

Different pattern of CCR5 and CXCR4 expression on blood lymphocytes and T helpers in AIDS formation has been established depending on HIV tropism. In patients infected by R5 tropic viruses significant decreasing of CXCR4 on blood lymphocytes and T helpers were established. In the same time in patients infected by non R5 tropic viruses significant decreasing of CCR5 onT helpers were established. These data may reflect the different mechanism of immunosupression formation depending on HIV tropism.

**Keywords:** HIV-infection, AIDS, tropism, CCR5, CXCR4, immunocompetent cells/

Поступила 23.09.2015

## ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-28В СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ *С*, ИМЕЮЩИХ 1 ГЕНОТИП ВИРУСА ГЕПАТИТА *С*

*Мицура В.М.[1], Воропаев Е.В.[1], Жаворонок С.В.[2], Осипкина О.В.[1], Терешков Д.В.[3]*

*[1]Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь;*
*[2]Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;*
*[3]Учреждение «Гомельская областная инфекционная клиническая больница», Гомель, Республика Беларусь*

**Реферат.** Обследовано 80 пациентов с хроническим гепатитом *С* (66% мужчин; все с генотипом 1 вируса гепатита *С*) с известным результатом лечения пегилированным интерфероном или стандартным интерфероном в сочетании с рибавирином. Методом ПЦР определялись единичные нуклеотидные полиморфизмы (SNP) гена интерлейкина-28В: rs8099917, rs12979860, rs12980275. Определены частота встречаемости различных аллельных вариантов полиморфизма и их прогностическое значение для оценки эффективности лечения.

**Ключевые слова:** полиморфизм гена интерлейкина-28В, хронический гепатит *С*, интерферонотерапия.

**Введение.** Стандартом помощи пациентам с хроническим гепатитом *С* (ХГС) до настоящего времени являлась комбинированная терапия пегилированным интерфероном альфа и рибавирином (ПЭГ-ИФН/РБВ) [1, 2]. Противовирусная терапия на основе ПЭГ-ИФН/РБВ либо стандартного интерферона с рибавирином (ИФН/РБВ) все еще широко используется в странах СНГ в силу ее

большей доступности. Ведущим предиктором эффективности лечения считается генотип вируса гепатита *С* (ВГС). Эффективность лечения в настоящее время достигает 54–56% в общем, составляя 40–50% для пациентов с генотипом 1 ВГС [1]. Особое внимание уделяется прогнозированию результатов лечения у пациентов с генотипом 1 ВГС, т. к. они хуже отвечают на ПЭГ-ИФН/РБВ [1, 2].

Как показали исследования последних лет, определенное влияние на результат лечения и его побочные эффекты, а также возможность самостоятельного выздоровления при заражении ВГС оказывают генетические факторы [3]. Фармакогенетика — наука на стыке медицинской генетики и клинической фармакологии, изучающая значение наследственности в реакции организма на медикаменты. С позиций фармакогенетики восприимчивость пациентов с ХГС к интерферонотерапии зависит от экспрессии в ткани печени стимулированных интерфероном генов, которые в результате и оказывают противовирусный эффект на ВГС [4, 5].

Полиморфизм гена интерлейкина 28В (ИЛ-28В) активно изучается в последние годы, т. к. было показано, что единичные нуклеотидные замены (SNP) в гене ИЛ-28В значительно коррелировали с ответом на лечение пациентов препаратами ПЭГ-ИФН/РБВ. Более высокую прогностическую ценность для пациентов с генотипом 1 ВГС имеют SNP: rs12979860, rs8099917, rs12980275 [6–9]. Аллель С в rs12979860 ассоциируется с повышенной вирусной нагрузкой, со спонтанным клиренсом ВГС и с вирусологическим ответом во время лечения [8, 9]. На основе этих SNP разрабатываются подходы к персонифицированной терапии [10].

**Цель** исследования — определение частоты встречаемости и прогностического значения полиморфизма гена интерлейкина-28В по трем локусам (rs8099917, rs12979860, rs12980275) среди белорусских пациентов с ХГС, имеющих 1 генотип ВГС.

**Материалы и методы.** Было обследовано 80 пациентов с ХГС (66% мужчин, средний возраст составил 41 год, у всех был 1 генотип ВГС), которые получали противовирусную терапию (ПВТ) с использованием стандартного или пегилированного интерферона в сочетании с рибавирином (ПЭГ-ИФН/РБВ, 55% или ИФН/РБВ, 45%). Полиморфизм трех локусов гена ИЛ-28В (rs8099917, rs12979860, rs12980275) определялся с помощью метода ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы Statistica 6.0. Использовались критерий $\chi^2$ или точный критерий Фишера для сравнения частот в квадратах 2×2. Статистически значимой считалась 95% вероятность различий ($p<0,05$). Для расчета 95% доверительного интервала (95% ДИ) в оценке долей использован откорректированный метод Вальда.

**Результаты и их обсуждение.** При анализе полиморфизма rs8099917 установлена частота встречаемости аллельных вариантов TT (36,3%; 95% ДИ 26,6–47,2), TG (56,3%; 45,3–66,6) и GG (7,5%; 3,2–15,7). Среди лиц с генотипом TT ответили на терапию 58,6% (95% ДИ 40,7–74,5), а среди лиц с генотипами TG/GG — 17,7% (95% ДИ 9,3–30,5), что статистически значимо ($\chi^2 = 12,3$; $p<0,001$), отношение шансов (ОШ) = 6,6 (95% ДИ 2,4–18,5).

Частота встречаемости аллельных вариантов полиморфизма rs12979860: CC — 21,3% (95% ДИ 13,6–31,5), CT — 63,8% (52,8–73,5), TT — 15% (8,6–24,6). Ответили на терапию 82,4% (58,2–94,6) лиц с генотипом CC и 19,1% (11,1–30,6) лиц с генотипами CT/TT ($p<0,001$, точный критерий Фишера), ОШ = 19,8 (4,9–80,1).

Полиморфизм rs12980275 представлен генотипами AA (23,8%; 15,7–34,2), AG (58,8%; 47,8–68,9) и GG (17,5%; 10,6–27,4). На терапию ответили 63,2% (40,9–81,0) лиц с генотипом AA и 23,0% (14,1–35,0) лиц с генотипами AG/GG ($\chi^2=8,9$; $p = 0,003$), ОШ = 5,8 (1,9–17,4).

Терапия ИНФ/РБВ или ПЭГ-ИНФ/РБВ является длительной, затратной, сопряженной с побочными эффектами, малоэффективной для пациентов с 1 генотипом ВГС, однако все еще широко применяется в странах СНГ. Среди пациентов с ХГС в белорусской популяции, имеющих 1 генотип ВГС, частота носительства «прогностически благоприятных» аллельных вариантов полиморфизма гена ИЛ-28В сравнительно невысока (36, 21 и 24%). Для прогнозирования ответа на ПВТ следует использовать тестирование на полиморфизмы гена интерлейкина-28В (rs12979860, rs8099917, rs12980275), поскольку они являются хорошими предикторами ответа на терапию, наибольшей прогностической значимостью обладает rs12979860. У лиц с «благоприятными» аллельными вариантами TT (rs8099917) CC (rs12979860) AA (rs12980275) следует ожидать достаточно высокой частоты ответа на терапию не только пегилированными, но и «стандартными» («короткими») интерферонами, что оправдано с позиций фармакоэкономики. Пациентам, имеющим прогностически неблаго-

приятные варианты SNP гена ИЛ-28В, следует предлагать другие варианты лечения ХГС: «тройная» терапия с ингибиторами вирусной протеазы или безинтерфероновые схемы.

**Заключение.** По результатам исследований можно сделать следующие выводы:

1. У белорусских пациентов с хроническим гепатитом *С*, имеющих 1 генотип ВГС, частота носительства «благоприятных» аллельных вариантов гена ИЛ-28В сравнительно невысока: ТТ (rs8099917) — 36,3%, СС (rs12979860) — 21,3%, АА (rs12980275) — 23,8%.

2. Для носителей «благоприятных» аллельных вариантов SNP показана более высокая результативность лечения ИФН/РБВ или ПЭГ-ИФН/РБВ среди обследованных пациентов, наибольшую прогностическую ценность имеет rs12979860 (ОШ = 19,8), менее значимы rs8099917 (ОШ = 6,6) и rs12980275 (ОШ = 5,8).

3. Тестирование трех SNP гена ИЛ-28В (rs12979860, rs8099917, rs12980275) оправдано у пациентов с 1 генотипом ВГС, т. к. обнаружение прогностически благоприятных вариантов SNP позволит назначить менее затратные схемы лечения на основе ИФН/РБВ или ПЭГ-ИФН/РБВ.

**Литература**

1.An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases / M.G. Ghany [et al.] // Hepatology. — 2011. — Vol. 54, № 4. — P. 1433–1444.

2.EASL clinical practice guidelines: management of hepatitis C virus infection // J. Hepatol. — 2011. — Vol. 55. — P. 245–264.

3.Rau, M. Host genetic variants in the pathogenesis of hepatitis C / M. Rau, K. Baur, A. Geier // Viruses. — 2012. — Vol. 4. — P. 3281–3302.

4.Clark, P.J. IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies / P.J. Clark, A.J. Thompson, J.G. McHutchison // Am. J. Gastroenterol. — 2011. — Vol. 106, № 1. — P. 38–45.

5.Hepatitis C pharmacogenetics: state of the art in / N.H. Afdhal [et al.] // Hepatology. — 2011. — Vol. 53, № 1. — P. 336–345.

6.Genetic variation in IL28b is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study / A. Rauch [et al.] // Gastroenterology. — 2010. — Vol. 138. — P. 1338–1345.

7.Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C / Y. Tanaka [et al.] // Nat. Genet. — 2009. — Vol. 41. — P. 1105–1109.

8.Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus / A.J. Thompson [et al.] // Gastroenterology. — 2010. — Vol. 139. — P. 120–129.

9.Potential role for interleukin-28B genotype in treatment decision-making in recent hepatitis C virus infection / J. Grebely [et al.] // Hepatology. — 2010. — Vol. 52. — P. 1216–1224.

10. Slev, P. Host genomics and HCV personalized medicine / P. Slev // Ann. Clin. Lab. Sci. — 2012. — Vol. 42, № 4. — P. 363–369.

## THE SIGNIFICANCE OF INTERLEUKIN 28B GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C HAVING HEPATITIS C VIRUS GENOTYPE 1

*Mitsura V.M.[1], Voropaev E.V.[1], Zhavoronok S.V.[2], Osipkina O.V.[1], Tereshkov D.V.[3]*

*[1]Educational Establishment "Gomel State Medical University", Gomel, Republic of Belarus;*
*[2]Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus;*
*[3]Institution "Gomel Regional Infectious Clinical Hospital", Gomel, Republic of Belarus*

The study involved 80 patients with chronic hepatitis C (CHC) (66% men, all with hepatitis C virus genotype 1) with the known result of treatment with pegylated interferon (PEG-IFN) or standard interferon (IFN) and ribavirin (RBV). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the gene IL-28B (rs8099917, rs12979860, rs12980275) were determined by polymerase chain reaction. The frequency of occurrence of these SNPs' different genotypes and their predictive value for evaluating the effectiveness of treatment were determined.

**Keywords:** IL28B gene polymorphism, chronic hepatitis C, interferon therapy.

Поступила 10.09.2015

# МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЕ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ КОЖИ

*Злотникова М.В.*

*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Республика Беларусь*

**Реферат:** Метаболическая активность нейтрофилов была изучена у 42 пациентов с тяжелой формой рецидивирующей герпетической инфекцией кожи. У пациентов наблюдалась выраженная базальная активация кислородпродуцирующей активности нейтрофилов и снижение индекса респираторного резерва. Данные изменения наблюдаются как в обострении, так и в ремиссии заболевания.

**Ключевые слова:** герпетическая инфекция, нейтрофилы, НСТ-тест.

**Введение.** Наиболее распространенной формой герпетической инфекции является поражение кожи, которое в ряде случаев сочетается с различными проявлениями аногенитального герпеса [1]. В настоящее время отмечается тенденция к возрастанию частоты и тяжести герпетической инфекции, увеличению хронических форм и учащению случаев рецидивирования. Отмечается высокая инфицированность взрослого населения различных стран (80–90%) вирусом простого герпеса 1 типа [2]. Реактивации вируса и переходу инфекции из латентного состояния в манифестное способствует ослабление контролирующих механизмов хозяина под действием различных провоцирующих факторов (переохлаждение, стресс, травма, сопутствующие заболевания, лечение глюкокортикоидами и иммунодепрессантами, радиоактивное облучение, различные иммунодефицитные состояния и др.) [1].

В настоящее время доказано, что рецидивирование заболевания и дальнейшее его прогрессирование напрямую связано с нарушениями иммунной реактивности организма [1, 2]. При рецидивирующей герпетической инфекции (РГИ) описаны различные изменения в системе иммунитета: снижение общего количества Т- и В-лимфоцитов, угнетение их функциональной активности в пролиферативном тесте, разнонаправленные сдвиги количества иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов и NK-клеток, различного рода дисфункции гуморального специфического и неспецифического иммунитета [1, 3]. Имеется информация о способности вирусов герпеса напрямую поражать В- и Т-лимфоциты, NK-клетки, моноциты/макрофаги и изменять их геном и функциональную активность [2].

Несмотря на интенсивные исследования механизмов противовирусного иммунитета, многие его стороны (как в случаях других самолимитирующих, персистентных и хронических вирусных инфекций) до настоящего времени не разрешены.

Общепризнанным является существование двух основных типов защитных реакций: врожденного и адаптивного иммунитета. Среди врожденных факторов противовирусной защиты показано важное значение интерферонов, интерлейкинов, хемокинов, системы комплемента, естественных антител [1, 3, 4]. Клеточное звено врожденного противовирусного иммунитета включает NK-клетки, моноциты и макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы. В последние годы получены доказательства существования на этих клетках молекулярных структур для распознавания различных типов микроорганизмов, в т. ч. вирусов. Эти структуры получили название toll-like receptors — TLR по аналогии с Toll-белками насекомых, ответственными за защиту их организма от инфекции. Взаимодействие TLR с различными вирусными структурами обеспечивает формирование и проведение в ядро клеток макроорганизма стимулирующего сигнала, запускающего каскад провоспалительных реакций, направленных на блокирование жизнедеятельности патогена. Кроме активации факторов врожденного иммунитета это же взаимодействие способствует формированию начальных этапов реакций приобретенного иммунитета и определяет тип иммунного ответа. Толл-подобные рецепторы для вирусов экспрессированы в значительном количестве на моноцитах, макрофагах, NK-клетках, дендритных клетках, нейтрофилах. Среди перечисленных клеток в наименьшей степени изучена роль нейтрофилов при герпетических поражениях, т. к. эти клетки считаются ключевым звеном при инфекциях бактериальной этиологии. В то же время открытие TLR-9, способных распознавать ДНК вирусов герпеса, в т. ч. на нейтрофильных гранулоцитах, позволило по-новому взглянуть на их участие в формирования и регуляции защитных реакций при вирусных инфекция и обусловило интерес исследователей к изучению функций этих клеток при заболеваниях вирусной эти-

ологии. Важнейшая роль нейтрофилов при вирусных инфекциях связана с их способностью продуцировать ряд цитокинов — ИЛ-1β, ИЛ-8, ФНОα, ГМ-КСФ, ТФРβ, ИФНα, а также ИЛ-12, регулирующего пролиферацию Т-лимфоцитов и NK-клеток, их цитотоксическую активность и продукцию ими ИФНγ. Кроме того, секретируя ИЛ-4 и ИФНγ нейтрофилы регулируют селекцию Th1 и Th2-лимфоцитов [4, 5].

**Цель** исследования — изучение особенностей кислородпродуцирующей активности нейтрофилов у пациентов с рецидивирующей герпетической инфекциеи кожи.

**Материалы и методы.** Обследовано 42 пациента (6 мужчин и 36 женщин в возрасте от 19 до 43 лет) с тяжелой формой рецидивирующей герпетической инфекции, проходивших лечение в Республиканском научно-практическом центре радиационной медицины и экологии человека (г. Гомель). Критериями тяжелого течения считали более 6 рецидивов в год, эпизоды рецидивов до 2 раз в месяц, длительность рецидивов более 14 дней, распространенный характер высыпаний, наличие симптомов общей интоксикации [1, 2]. Продолжительность заболевания варьировала от 3 до 16 лет. На момент обследования 18 пациентов находилось в обострении, 24 пациента — в стадии ремиссии заболевания. У всех обследованных отмечались сопутствующие хронические воспалительные заболевания: поражения респираторного тракта — у 25 человек, урогенитального тракта — у 23, желудочно-кишечного тракта — у 17 пациентов. Однако на момент обследования обострений сопутствующих заболеваний не отмечалось. Пациенты с тяжелой патологией сердечно-сосудистой системы и сахарным диабетом в исследование не включались. Группу сравнения составили 25 практически здоровых лиц.

Материалом для исследования служила периферическая кровь, взятая из кубитальной вены в пробирку с гепарином (10 Ед./мл). Исследование проводили до назначения медикаментозной терапии.

Кислородпродуцирующую активность нейтрофилов оценивали в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) в спонтанном (НСТ-базальный, НСТб.) и стимулированном (НСТ-стимулированный, НСТст.) вариантах теста с микроскопической оценкой результатов. Дополнительно рассчитывали индекс респираторного резерва (ИРР = НСТ ст. – НСТ баз. / НСТ ст.).

Статистическая обработка результатов проводилась с применением пакета прикладных программ Statistica 6.1. Для оптимального представления о центральной тенденции, ширине и асимметрии показателей результаты выражали в виде Me (25%; 75%), где Me — медиана, 25% — нижний квартиль, 75% — верхний квартиль. С помощью рангового критерия Манна–Уитни оценивали достоверность различий независимых групп. За диапазон нормальных значений показателей принимали интервал 25–75-й перцентили показателей группы здоровых лиц.

**Результаты и их обсуждение.** Показатели кислородпродуцирующей активности нейтрофилов представлены в таблице.

Таблица — Показатели кислородпродуцирующей активности нейтрофилов у пациентов с РГИ кожи

| Показатель, ед. измерения | Группа сравнения n = 25 | Пациенты с РГИ | |
|---|---|---|---|
| | | Стадия обострения, n =1 8 | Стадия ремиссии, n = 24 |
| НСТб, % | 10 (8; 18) | 16 (9; 23)* | 18 (12; 24) |
| НСТст, % | 57 (48; 62) | 48 (43; 58) | 53 (48; 57) |
| ИРР | 0,77 (0,73; 0,84) | 0,59 (0,54; 0,79)* | 0,63 (0,56; 0,80)* |
| Примечание — * – различия достоверны в сравнении с группой доноров (p <0,05). | | | |

Как видно из таблицы, у пациентов, обследованных в период обострения, выявлено увеличение базального уровня активации нейтрофилов крови на 57% (p = 0,014), показатели стимулированного НСТ-теста имели тенденцию к снижению (p = 0,09). Вышеописанные изменения приводили к уменьшению индекса респираторного резерва (ИРР), который представляет собой расчетный показатель: ИРР = (НСТст. – НСТбаз.) / НСТст., p = 0,003.

У пациентов, обследованных в период ремиссии РГИ, также наблюдалось повышение базального уровня кислородпродуцирующей активности (на 71% по отношению к группе сравнения,

p = 0,005), показатели стимулированного НСТ-теста не изменялись, а значение ИРР снижалось (p = 0,031) (таблица).

Базальный НСТ-тест, как известно, характеризует исходную степень функционального раздражения нейтрофилов, и его повышение свидетельствует о сдвиге во внутренней среде организма, общей стимуляции нейтрофилов в результате таких процессов как инфекция, воспаление, неоплазия, повреждение тканей. Повышение его значений в период обострения процесса кажется вполне логичным, тогда как в период ремиссии заболевания причина повышенного базального НСТ-теста, не ясна. Возможно, сохранение повышенных значений базальной активности нейтрофилов у пациентов с РГИ в период клинической ремиссии свидетельствует о незавершенности патологического процесса при тяжелом течении заболевания, что отмечают некоторые исследователи, указывшие на дисбаланс между клинической и лабораторной ремиссией [2].

Следует отметить, что уровень НСТбаз. выше интерквартильного размаха наблюдался не у всех пациентов как в обострении РГИ, так и в ремиссии, а лишь у 38 и 34% пациентов соответственно. Однако значимых клинических различий между ними мы не выявили, в связи с чем данные не приведены.

**Заключение.** Результаты работы свидетельствуют, что у пациентов с РГИ тяжелого течения наблюдается выраженная базальная активация кислородпродуцирующей активности нейтрофилов, которая сохраняется в период ремиссии заболевания. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят решить вопрос о механизмах такой активации, а также представляют интерес в плане возможностей использования пара-метров НСТ-теста для мониторинга заболевания.

**Литература**

1. Каримова, И.Н. Герпесвирусная инфекция. Диагностика, клиника, лечение / И.Н. Каримова. — М.: Мед. информ. агентство, 2004. — С. 44–72.

2. Кудин, А.П. Роль Herpes simplex в патологии человека. Часть I. Этиология, патогенез, состояние иммунитета / А.П. Кудин, И.Г. Германенко // Мед. новости. — 2004. — № 5. — С. 11–14.

3. Дидковский, Н.А. Герпетическая инфекция тяжелого течения / Н.А. Дидковский, И.К. Малашенкова // Терапевт. архив. — 2007. — № 11. — С. 52–57.

4. Симбирцев, А.С. Толл-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета / А.С. Симбирцев // Иммунология. — 2005. — № 6. — С. 368–377.

5. Сабанчева, Ж.Х. Клинико-прогностическое значение оценки функционально-метаболической активности лейкоцитов, среднемолекулярных пептидов и системы проантиоксидантной защиты крови у больных ВИЧ-инфекцией: автореф. дис. … д-ра мед. наук: 14.00.10 / Ж.Х. Сабанчева. — М., 2007.

## FUNCTIONAL NEUTROPHILS ACTIVITY IN PATIENTS WITH SEVERE FORM OF HERPES INFECTION OF SKIN

*Zlotnikova M.V.*

*State Institution "Republican Scientific & Practical Center for Transfusiology & Medical Biotechnologies", Minsk, Republic of Belarus*

The functional activity of neutrophils was studied in 42 patients with severe form of herpes infection of skin. The oxygen production of neutrophils was increased in the periods of remission and exacerbation of the disease, was studed by levels of basal NBT-test.

**Keywords:** neutrophils, herpes infection, NBT-test.

Поступила 10.09.2015

# ПРЕДИКТОРЫ ЗАТЯЖНОГО ТЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА

*Гончаров А.Е.[1], Давидович Г.М.[2], Карпов И.А.[2], Романова И.В.[1], Гуцалюк И.Я.[3]*

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

*[2]Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;*

*[3]Учреждение здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница», Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Несмотря на то, что изучение заболеваний человека, вызванных вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), проводится многочисленными группами ученых в разных странах мира, до сих пор не были известны четкие критерии, которые позволили бы прогнозировать исход острой ВЭБ-инфекции. Нами выполнено иммунологическое и клинико-лабораторное обследование 33 взрослых пациентов с острой ВЭБ-инфекцией. У 12 пациентов установлено затяжное течение инфекционного мононуклеоза. Логистический регрессионный анализ показал, что предикторами затяжного течения инфекционного мононуклеоза являются: 1) содержание $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов ниже $1{,}9\times10^6$/мл и/или 2) содержание $CD39^+$ Т-регуляторных клеток ниже $0{,}008\times10^6$/мл и/или 3) содержание $CD28^+$ Т-лимфоцитов ниже $1{,}4\times10^6$/мл. Установлена чувствительность и специфичность прогнозирования затяжного течения ИМ по вышеперечисленным показателям, а также определена точка диагностически значимого уровня для каждого из показателей.

**Ключевые слова:** инфекционный мононуклеоз, предикторы затяжного течения, Т-клетки, Т-регуляторные клетки.

**Введение.** Инфекционный мононуклеоз (ИМ) — острое доброкачественное лимфопролиферативное заболевание человека, вызванное вирусом Эпштейна–Барр, характеризующееся наличием у пациента лихорадки, лимфоаденопатии, поражения селезенки и печени, характерными изменениями гемограммы [1].

ВЭБ способен вызывать значительные нарушения в иммунном статусе человека: изменение количества и свойств отдельных популяций лимфоцитов и гранулоцитов, нарушение функциональной активности моноцитов, дисбаланс продукции интерферонов и других цитокинов. В результате развивается вторичная иммунная недостаточность с выраженной депрессией клеточного иммунитета [1–3].

Несмотря на то, что изучение ВЭБ-ассоциированных заболеваний проводится многочисленными группами ученых в разных странах мира, до сих пор не известны четкие критерии, которые позволили бы прогнозировать исход острой ВЭБ-инфекции.

**Цель** исследования — выявление предикторов затяжного течения ИМ [1–4].

**Материалы и методы.** *Объекты исследований.* Объектами для *in vitro* исследований служили 62 образца периферической крови 31 пациента с ИМ (УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска). Пациентов обследовали дважды: на момент поступления в стационар (группа П1) и спустя 2–3 мес. после выписки (группа П2). Для получения контрольных значений ряда показателей использовали 22 образца крови доноров (группа сравнения, ГС), сопоставимых по возрасту и полу с пациентами. Медианный возраст пациентов составил 20,0 (19,0–25,0) лет, а здоровых добровольцев — 24 (26,0–28,0) года.

*Определение иммунофенотипа клеток крови.* Иммунофенотип лейкоцитов определяли методом проточной цитометрии с использованием 3–8 цветовых меток.

Учет проводили на проточных цитофлюориметрах «FACSCalibur» и «FACSCantoII». Данные анализировали при помощи программного обеспечения Weasel версии 3.0.2 и FACSDiva версии 7.

*Статистический анализ.* Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Statistica 10, StatPlus 4.9 (AnalystSoft, Канада) и SPSS 22 (IBM, США). Значения показателей представлены в виде медианы с интерквартильным размахом в виде 25-й и 75-й процентилей. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро–Вилка и критерия Колмогорова–Смирнова/Лиллиефорса. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. Для поиска предикторов за-

тяжного течения был применен логистический регрессионный анализ. Для всех изучаемых факторов вычисляли коэффициент логистической регрессии, стандартную ошибку коэффициента, отношение рисков (ОР), 95% доверительные интервалы (ДИ) и статистическую значимость (p). Для определения диагностической ценности показателей был использован метод ROC-анализа с расчетом площади под рабочей характеристической кривой (AUROC). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p<0,05$.

**Результаты и их обсуждение.** *Характеристика пациентов, страдающих инфекционным мононуклеозом.* Пациенты поступали в стационар с 4 по 26-й день болезни, медиана приходилась на 9-й день. Заболевание начиналось остро с появления фебрильной температуры у 27 пациентов, постепенное начало заболевания отмечено у 4 пациентов. Интоксикационный синдром присутствовал у всех пациентов и проявлялся умеренной слабостью, бледностью кожных покровов, головной болью и тошнотой. Лихорадка присутствовала у всех обследованных пациентов. У 5 пациентов на коже туловища или конечностей была выявлена пятнисто-папулезная сыпь. Все пациенты с экзантемой на амбулаторном этапе принимали антибиотики, преимущественно аугментин.

Аденопатия была выявлена в 96,8% случаев. В патологический процесс вовлекались преимущественно подчелюстные (74,2%) и шейные лимфоузлы (90,3%). Реже наблюдалось увеличение других групп лимфоузлов: подмышечных (35,5%), затылочных (22,6%), паховых (3,2%), углочелюстных (6,5%) и околоушных (3,2%). У пациентов чаще всего были увеличены 2 (51,5%) и 3 (32,3%) группы лимфоузлов, реже — 4, 5 групп лимфоузлов одновременно (по 3,2%). Увеличение одной группы лимфоузлов выявлено у 2 пациентов из 33. Болезненность лимфоузлов наблюдалась у 54,5% пациентов. У 6 пациентов (19,5%) заболевание протекало в желтушной форме. Заболевание имело среднетяжелое течение у всех обследованных.

У пациентов в периферической крови определяли относительное и абсолютное содержание субпопуляций лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии: Т-клеток с разным типом Т-клеточного рецептора, Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток, субпопуляций Т-клеток памяти, Т-регуляторных клеток, естественных киллерных клеток, В-лимфоцитов, а также пДК и $CD1c^+/CD141^+$ субпопуляций мДК, $CD14^+/CD16^+$ моноцитов крови, М-МЛСК и $CD15^+/CD33^+$ Г-МЛСК. Исследовали цитокиновый статус — продукцию цитокинов ИНФ-γ и ФНО-α, а также содержание Т-клеток, специфичных к ВЭБ.

При клиническом обследовании пациентов через 2–3 мес. после выписки из стационара установлено клиническое выздоровление у 22 пациентов (71%). У 12 пациентов имелись клинико-лабораторные признаки заболевания: увеличение лимфоузлов — 6 пациентов, гепатомегалия — 8 пациентов, спленомегалия — 3 пациента, фарингит, гипертрофия миндалин — 5 человек, наличие ДНК ВЭБ в плазме крови — 8 пациентов, увеличение числа $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ клеток свыше 20% — 7 пациентов, наличие атипичных мононуклеаров — у 2 человек, усиление активности АЛТ более, чем в 2 раза — у 6 пациентов.

*Предикторы затяжного течения инфекционного мононуклеоза.* Для поиска предикторов затяжного течения был применен логистический регрессионный анализ. Для всех изучаемых факторов (клинико-лабораторные и иммунологические показатели) вычисляли коэффициент логистической регрессии, стандартную ошибку коэффициента, отношение рисков, 95% доверительные интервалы и статистическую значимость.

Анализ результатов исследования показал, что предикторами затяжного течения инфекционного мононуклеоза являются:

1) низкое абсолютное содержание $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов;

2) низкое абсолютное содержание $CD39^+$ Т-регуляторных клеток;

3) низкое абсолютное содержание $CD28^+$ Т-лимфоцитов (таблица).

Полученные результаты указывают, что нормальное течение ИМ с значительной пролиферацией цитотоксических $CD8^+$Т-клеток и в противовес повышенному содержанию $CD39^+$Т-регуляторных клеток и $CD28^+$ Т-лимфоцитов в большинстве случаев заканчивается клиническим выздоровлением. В то же время наибольший риск затяжного течения ИМ наблюдается у пациентов, иммунная система которых изначально слабо реагировала на ВЭБ, т. е. фактически развивалась анергия.

Таблица — Результаты моновариантного логистического регрессионного анализа и ROC-анализа

| Показатель | ОР | 95% ДИ | p | Площадь под ROC-кривой | cut-offpoint | Чувствительность,% | Специфичность, % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $CD3^+CD8^+$ (абс. значения) | 0,71 | 0,62–0,85 | 0,013 | 0,824±0,094 | 1,865 | 84,6 | 71,4 |
| $CD39^+$ Т-рег. клетки (абс. значения) | 0,93 | 0,87–0,99 | 0,034 | 0,956±0,043 | 0,0082 | 92,3 | 85,7 |
| $CD28^+$ Т-клетки (абс. значения) | 0,85 | 0,73–0,99 | 0,003 | 0,901±0,077 | 1,415 | 92,3 | 85,7 |

Уменьшение числа Т-регуляторных клеток, казалось бы, должно приводить к усилению противоинфекционного иммунитета. В то же время, как видно из представленных данных, невысокое содержание Т-регуляторных клеток не позволяет полноценно контролировать избыточную пролиферацию Т-цитотоксических лимфоцитов. Снижение содержания Т-клеток, экспрессирующих костимуляторную молекулу CD28, также уменьшает резервы противоинфекционного иммунитета, что проявляется в неспособности иммунной системы противодействовать репликации вируса.

Следует также отметить, что в процессе анализа была также выявлена тенденция ($p<0,1$) в отношении содержания общей фракции $CD4^+CD127^-CD25^{hi}$ Т-регуляторных клеток, активированных $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ Т-клеток, Т-клеток, экспрессирующих молекулу PD-1.

Методом ROC-анализа установлена чувствительность и специфичность выявления затяжного течения ИМ по вышеперечисленным показателям, а также определена точка диагностически значимого уровня (cut-offpoint) — величина, используемая для разделения ряда значений на две части (т. е. пациенты с риском затяжного течения и таковые без риска).

Графически результаты представлены на рисунке.

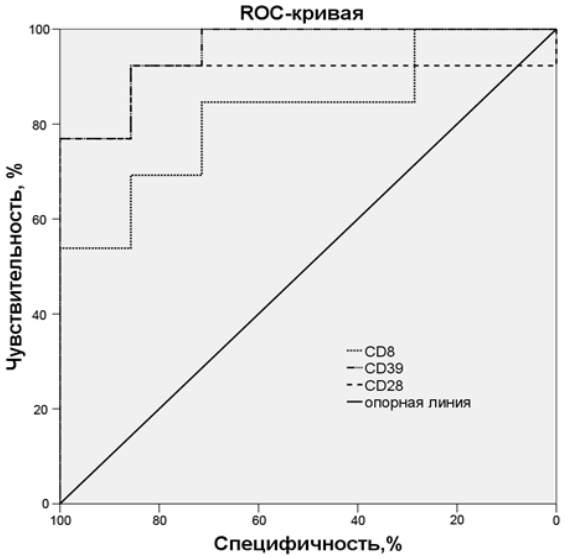



**Рисунок — ROC-кривая вероятности развития затяжного течения ИМ в зависимости от содержания ряда субпопуляций Т-клеток в крови**

Полученные результаты позволили подготовить проект инструкции по применению «Метод определения маркеров инфекционного мононуклеоза» (регистрационный № 061-0615, утверждена 04.09.2015). Инструкция предназначена для врачей-лаборантов и врачей-инфекционистов учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим инфекционным мононуклеозом.

**Заключение.** Выполнено иммунологическое и клинико-лабораторное обследование 33 взрослых пациентов с острой ВЭБ-инфекцией (ИМ), которые лечились на базе УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска. У 12 пациентов установлено затяжное течение инфекционного

мононуклеоза. Логистический регрессионный анализ показал, что предикторами затяжного течения инфекционного мононуклеоза являются: 1) содержание $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов ниже $1{,}9\times10^6$/мл и/или 2) содержание $CD39^+$ Т-регуляторных клеток ниже $0{,}008\times10^6$/мл и/или 3) содержание $CD28^+$ Т-лимфоцитов ниже $1{,}4\times10^6$/мл. Установлена чувствительность и специфичность выявления затяжного течения ИМ по вышеперечисленным показателям, а также определена точка диагностически значимого уровня для каждого из показателей

Таким образом, результаты исследования указывают возможность использования установленных предикторов затяжного течения ИМ в рутинной клинической практике.

**Литература**

1. 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.

2. Predictors of fatigue following the onset of infectious mononucleosis / B. Candy [et al.] // Psychol. Med. — 2003. — Vol. 33, № 5. — P. 847–855.

3. 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.

4. Chronic fatigue syndrome following infections in adolescents / B.Z. Katz [et al.] / Curr. Opin. Pediatr. — 2013. — Vol. 25, № 1. — P. 95–102.

## PREDICTORS OF PROLONGED ILLNESS IN PATIENTS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

*Hancharou A.Y.[1], Davidovich G.M.[2], Karpov I.A.[2], Ramanava I.U.[1], Gutsaluk I.Y.[3]*

*[1]State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;*

*[2]Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus;*

*[3]Healthcare Institution "Municipal Clinical Infectious Diseases Hospital", Minsk, Republic of Belarus*

The prolonged illness was diagnosed in 12 of 27 patients with infectious mononucleosis (IM). Logistic regression analysis revealed 3 statistically significant predictors of prolonged illness: $CD3^+CD8^+$ T-cell count lower 1.865 cells per ul ($p = 0.0013$), $CD39^+$ T-regs count lower 8.2 cells per ul ($p = 0.034$) and $CD28^+$ T-cell count lower 1.415 cells per ul ($p = 0.003$). The results of our investigation demonstrate that the prolonged illness in the patients with IM is related to the decrease of both pro-inflammatory ($CD3^+CD8+$, $CD3^+CD28^+$) and anti-inflammatory (CD39+ T-regs) subsets, while patients with robust increase of $CD8^+$ T-cells and T-regs in the onset of the disease tend to fast and complete recovery. The sensitivity and specificity of the predictors described in the prognosis of prolonged illness was calculated: $CD3^+CD8^+$ — 84.6 and 71.4%, $CD39^+$ T-regs and $CD28^+$ T-cells — 82.3 and 85.7% correspondingly.

**Keywords:** infectious mononucleosis, immune status, T-cells, T-regulatory cells, prolonged illness.

Поступила 16.09.2015

## ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В БЕЛАРУСИ В 2010–2014 гг.

*Самойлова Т.И.[1], Красько А.Г.[1], Колтунова Ю.Б.[1], Яшкова С.Е.[2], Карпук Л.И.[3], Веденьков А.Л.[2]*

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

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

*[3]Минситерство здравоохранения Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** В статье представлены данные о зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита в Беларуси за 2010–2014 гг.

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

**Введение.** Среди вирусов, переносимых иксодовыми клещами, наибольшее значение для Беларуси имеет вирус клещевого энцефалита (КЭ). Природные очаги этого вируса выявляются на территории республики, начиная с 1940-х гг., когда вирус впервые был выделен из иксодовых клещей *Ixodes ricinus*, собранных на территории Беловежской пущи. Заболевания, вызываемые вирусом КЭ у человека, могут иметь острое или хроническое течение, характеризуются волнообразными вспышками и имеют симптоматику, сходную с ОРВИ и ОРЗ, что создает затруднения для дифференциальной диагностики. В последние годы в связи с климатическими изменениями наблюдается расширение ареала распространения иксодовых клещей, увеличение их численности, а также зараженности до 10–15% и выше [1].

В настоящее время в Республике Беларусь проводятся ежегодные мероприятия по исследованию иксодовых клещей на зараженность их вирусом КЭ с целью уточнения эпидситуации [2]. Для изучения вирусофорности клещей в природных очагах используется экспресс-метод иммуноферментного анализа (ИФА), имеющий высокую чувствительность и специфичность [3].

В статье приведены данные по исследованию клещей, собранных на территории республики в 2010–2014 гг., на наличие антигена вируса КЭ с использованием иммуноферментного метода.

**Цель** исследования — выявление антигена вируса КЭ в иксодовых клещах, собранных на территории Республики Беларусь в 2010–2014 гг.

**Материал и методы.** Материалом для исследования являлись иксодовые клещи двух видов: *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus*, собранные на территории всех областей республики специалистами санитарно-гигиенических служб в 2010–2014 гг. В общей сложности за пять лет было исследовано 4346 экземпляров (557 биопроб) *I. ricinus* и 1231 экземпляр (161 биопроба) *D. reticulatus*. Доставленных 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. Перед постановкой ИФА клещей подвергали первичной биологической обработке. Членистоногих отмывали фосфатным буферным раствором (pH = 7,0), растирали в фарфоровой ступке до получения суспензии. Приготовленные суспензии исследовали методом ИФА для выявления в них антигена вируса КЭ с использованием диагностических наборов фирмы Вектор-БЕСТ согласно инструкции производителя. Биопробы, давшие положительный результат в ИФА на наличие антигена вируса КЭ, были впоследствии использованы для выделения возбудителя на лабораторных животных и культуре клеток.

**Результаты и их обсуждение.** В результате исследований иксодовых клещей в ИФА, собранных в природных очагах, антиген вируса КЭ в целом по республике за 2010–2014 гг. выявляли в клещах *I. ricinus* в 19,9% случаев, а в *D. reticulatus* — в 18,0% (таблица).

Таблица — Данные по выявлению антигена вируса КЭ в клещах методом ИФА (2010–2014 гг.)

| Области | Клещи по видам | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *I. ricinus* биопроб/экз. | кол-во полодительных, % | % положительных | *D. reticulatus* биопроб/экз. | кол-во полодительных, % | % положительных |
| Витебская | 116/893 | 20 | 17.2 | 0/0 | 0 | 0 |
| Могилевская | 70/603 | 12 | 17.1 | 12/107 | 2 | 16,7 |
| Гродненская | 82/655 | 28 | 34.1 | 56/426 | 10 | 17,9 |
| Минская | 120/861 | 19 | 15.8 | 13/79 | 3 | 23,1 |
| Брестская | 90/785 | 24 | 26.7 | 3/22 | 1 | 33,3 |
| Гомельская | 36/311 | 18 | 50 | 37/422 | 8 | 21,6 |
| г. Минск | 43/227 | 14 | 32.6 | 34/223 | 5 | 14,7 |
| Всего по РБ | 557/4346 | 135 | 24.2 | 161/1231 | 29 | 18,0 |

Примечания:
1 — В числителе — количество исследованных биопроб.
2 — В знаменателе — число экземпляров иксодовых клещей.

Исследование иксодовых клещей по годам позволило установить, что начиная с 2012 г., процент выявления антигена вируса КЭ в иксодовых клещах родов *I. ricinus* и *D. reticulatus* начинает возрастать, составляя: в 2010 г. — 20 и 17,4%, в 2011 г. — 16,5 и 15,6%, в 2012 г. — 19,3 и 17,0%, в 2013 г. — 18,8 и 18,18% и в 2014 г. — 21,5 и 21,95% соответственно.

Зараженность клещей вирусом КЭ достигала максимальных значений в 2014 г. (21,5% для *I. ricinus* и 21,95% для *D. reticulatus*) (рисунок 1).

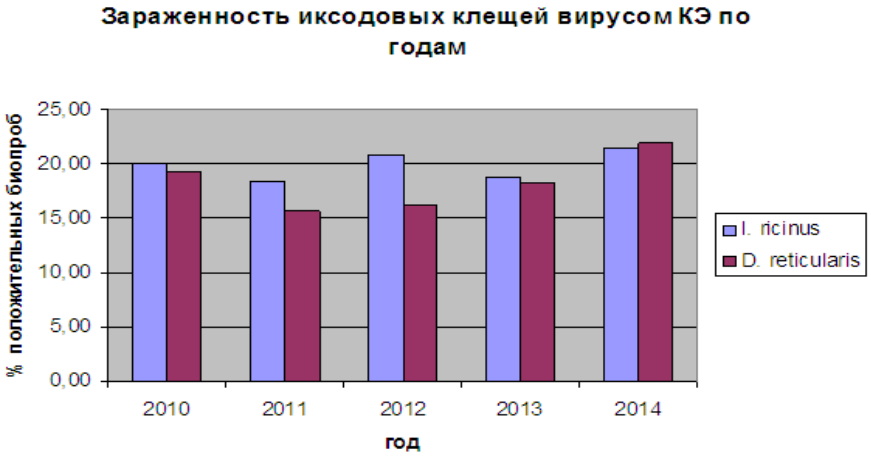



**Рисунок 1. — Выявление антигена вируса КЭ в иксодовых клещах методом ИФА по годам (2010–2014)**

В разрезе областей процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* варьировал от 15,8% по Минской области до 50% по Гомельской. Высокие показатели выявляемости антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* наблюдались также в Гродненской области (34,1%) и г. Минске (32,6%). Наиболее высокий процент зараженности клещей *D. reticulates* за период исследования отмечен в Брестской области (33,3%), а наиболее низкий — по г. Минску (14,7%) (рисунок 2).

**Рисунок 2. — Процент зараженности клещей по областям за 2010–2014 гг.**

В Минской области зараженность клещей была отмечена в Минском, Вилейском, Воложинском, Слуцком и Солигорском районах; в Витебской области — в Браславском, Городокском, Витебском и Верхнедвинском районах; в Гродненской области — в Гродненском, Сморгонском, Волковысском, Щучинском и Свислочском районах; в Брестской области — в Лунинецком, Каменецком и Столинском районах; в Гомельской области — в Речицком, Светлогорском, Житковичском и Добрушском районах; в Могилевской — в Хотимском, Костюковичском, Мстиславском и Быховском районах.

**Заключение.** Таким образом, зараженность иксодовых клещей вирусом КЭ в Республике Беларусь в течение последних 5 лет остается достаточно высокой и в среднем составляет для *I. ricinus* 24,2%, а для *D. reticulatus* — 18,0%, что свидетельствует о нестабильности текущей эпидобстановки по КЭ в стране.

**Литература**

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

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

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

## TICK-BORNE ENCEPHLITIS VIRUS CONTAMINATION OF IXODES TICKS IN BELARUS, 2010–2014

*Samoilova T.I.[1], Krasko A.G.[1], Koltunova Yu.B.[1], Yashkova S.E.[2], Karpuk L.I.[3], Vedenkov A.L.[2]*

*[1]State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;*

*[2]State Institution "Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health", Minsk, Republic of Belarus;*

*[3]Ministry of Health of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

In the paper the results of Ixodes ticks contamination by tick-borne encephalitis virus in Belarus for the period of 2010–2014 are presented.

**Keywords:** Ixodes ticks, contamination, tick-borne encephalitis virus, Belarus.

Поступила 12.10.2015

## ДИНАМИКА ЗАРАЖЕННОСТИ КРОВОСОСУЩИХ КОМАРОВ ВИРУСОМ ЗАПАДНОГО НИЛА НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

*Самойлова Т.И.[1], Красько А.Г.[1], Колтунова Ю.Б.[1], Яшкова С.Е.[2], Веденьков А.Л.[2]*

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

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

**Реферат.** В статье представлены результаты исследования кровососущих комаров, собранных на территории всех областей Республики Беларусь за 2010–2014 гг., на зараженность их вирусом Западного Нила.

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

**Введение.** Одной из наиболее значимых арбовирусных инфекций в эпидемиологическом отношении для Республики Беларусь является вирусный Западно-Нильский энцефалит (ВЗНЭ), возбудителем которого является вирус Западного Нила (ЗН). Вирус ЗН относится к роду *Flavivirus*, семейства *Flaviviridae* и принадлежит к антигенному комплексу японского энцефалита [1]. Впервые этот возбудитель был выделен в Африке (Уганда) K. Smithburn и соавт. в 1937 г. из крови лихорадящей больной при массовом обследовании населения на носительство вируса желтой лихорадки и по месту его обнаружения получил одноименное название — «Западный Нил» [2]. Природные очаги Западно-Нильской инфекции зарегистрированы практически повсеместно в Африке, а также в странах Европейского Средиземноморья, Ближнего Востока, Средней Азии, на Кавказе, Индийском субконтиненте, в Индонезии, Малайзии, Таиланде и других тропических странах. 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* и из крови лихорадящего больного, проживающего на территории Беловежской пущи [1].

**Цель** исследования — выявление антигена вируса Западного Нила в кровососущих комарах, собранных на территории Республики Беларусь за 2010–2014 гг.

**Материал и методы.** Материалом для исследования служили кровососущие комары, собранные во всех областях республики за 2010–2014 гг. Всего было собрано для исследования 47683 экземпляра комаров 3 родов: *Aedes* (39,4%), *Anopheles* (33,4%) и *Culex* (27,2%).

Выявление антигена вируса ЗН в кровососущих комарах осуществляли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Перед постановкой ИФА проводили подготовку биопроб: биопробы кровососущих комаров отмывали эфиром, 70% спиртом, а затем трехкратно физиологическим раствором с добавлением антибиотиков. Для приготовления суспензии членистоногих тщательно растирали и к гомогенатам добавляли физиологический раствор из расчета 0,4 мл на 20 комаров. Осветленную надосадочную жидкость использовали в ИФА. ИФА проводили с применением набора реагентов для выявления антигенов вируса ЗН методом ИФА производства института вирусологии им. Д.И. Ивановского (г. Москва).

**Результаты и их обсуждение.** Исследование в ИФА биопроб кровососущих комаров показало, что антиген вируса ЗН выявлялся в переносчиках на территории всех областей республики (таблица).

Таблица — Выявление антигена вируса ЗН в кровососущих комарах по областям

| Области | Кол-во биопроб комаров | Роды комаров | | | % положительных |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *Anopheles* | *Aedes* | *Culex* | |
| Витебская | 84/11 | 26/5 | 43/5 | 15/1 | 13,1 |
| Могилевская | 97/17 | 35/9 | 35/3 | 27/5 | 17,6 |
| Гродненская | 110/15 | 31/11 | 48/2 | 31/2 | 13,6 |
| Минская | 61/7 | 25/4 | 19/1 | 17/2 | 11,5 |
| Брестская | 90/18 | 30/5 | 35/10 | 25/3 | 20,0 |
| Гомельская | 92/21 | 35/9 | 32/5 | 25/7 | 22,9 |
| г. Минск | 55/5 | 16/2 | 18/2 | 21/1 | 9,1 |
| ИТОГО | 592/94 | 198/45 | 233/28 | 161/21 | 15,9 |

Примечания:
1 — В числителе — количество исследованных биопроб.
2 — В знаменателе — количество положительных.

Как видно из таблицы, наиболее высокий процент выявления антигена вируса ЗН за пять лет отмечен в Гомельской области (22,9%), а наиболее низкий — в г. Минске (9,1%) и Минской области (11,5%). В Гродненской области антиген вируса ЗН выявлялся в 13,6% биопроб, в Витебской — 13,1%, в Брестской и Могилевской — 20,0 и 17,6% соответственно. Зараженность кровососущих комаров вирусом ЗН в целом по республике за пять лет составила 15,9%. Следует отметить, что выявление антигена вируса ЗН в кровососущих комарах в последние годы возросло, как по Республике Беларусь в целом, так и отдельно по некоторым областям (рисунок 1).

Как видно из рисунка 1, процент выявления антигена в биопробах в 2012–2013 гг. был выше, чем в 2010–2011 гг. во всех областях, в то время как в 2014 г. наблюдалось некоторое его снижение. Наибольшая динамика роста выявления антигена отмечена в Витебской (с 5,9% в 2011 г. до 30,1% в 2012 г.) и Гомельской (с 16,7% в 2011 г. до 33,3% в 2013 г.) областях РБ.

Если рассматривать зараженность комаров по родам, то наибольший процент содержания антигена вируса отмечен у комаров рода *Anopheles* — 22,7%. Доля положительных биопроб кровососущих комаров рода *Aedes* составила 12,0%, а рода *Culex* — 13% (рисунок 2).

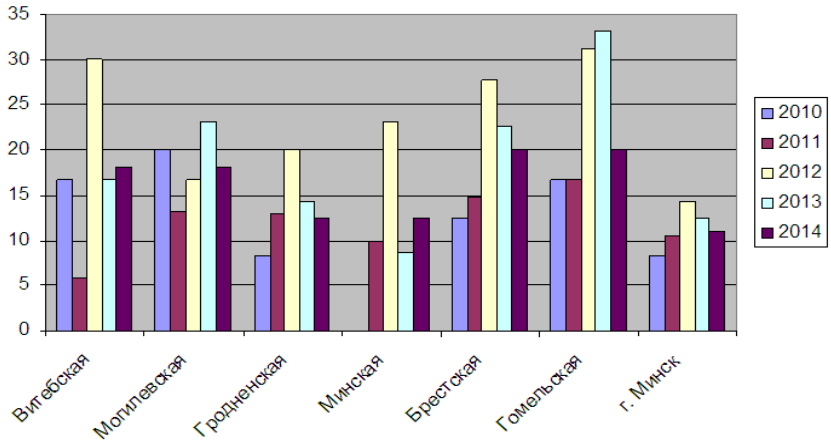



**Рисунок 1. — Выявление антигена вируса Западного Нила в кровососущих комарах по областям Республики Беларусь по годам**

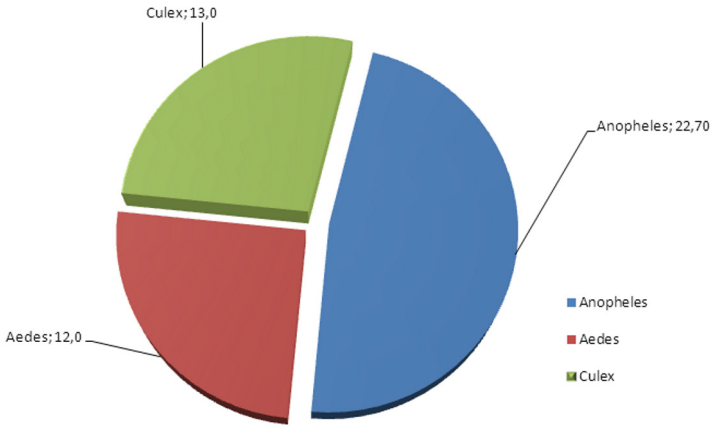



**Рисунок 2. — Выявление антигена вируса Западного Нила в биопробах кровососущих комаров по родам**

Как видно из рисунка 2, в период с 2012 по 2014 гг. наибольшее значение как переносчики вируса ЗН имеют комары рода *Anopheles*.

В диаграмме на рисунке 3 приведены результаты выявления антигена вируса ЗН в комарах различных родов по годам.

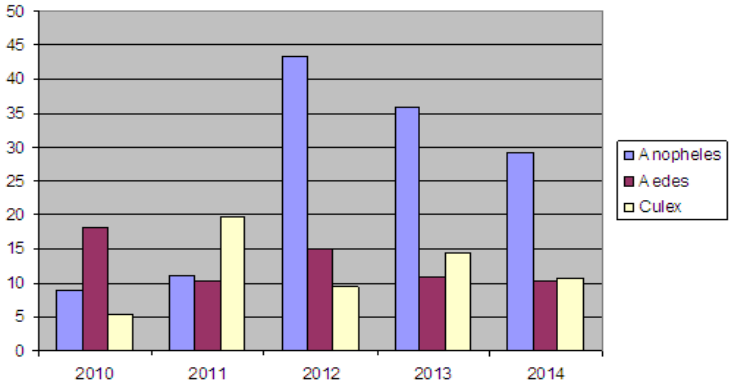



**Рисунок 3. — Выявление антигена вируса Западного Нила в биопробах кровососущих комаров по годам (2010–2014 гг.)**

**Заключение.** Проведенные исследования кровососущих комаров показали, что за последние годы на территории Республики Беларусь отмечается рост зараженности комаров вирусом ЗН, как в целом по республике, так и на территории большинства областей.

Учитывая, что полусинантропные и синантропные 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. — Vol. 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. — Vol. 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. — Vol. 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 OF BLOOD-SUCKING MOSQUITOES IN THE REPUBLIC OF BELARUS, 2010-2014

*Samoilova T.I.[1], Koltunova Yu.B.[1], Yashkova S.E.[2], Vedenkov A.L.[2]*

*[1]State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;*

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

In this issue results of detection of West Nile virus in blood-sucking mosquitoes collected in Belarus in 2010–2014 are presented.

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

Поступила 12.10.2015

## ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСА СИНДБИС В КРОВОСОСУЩИХ КОМАРАХ БЕЛАРУСИ

*Самойлова Т.И.*

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

**Реферат.** В статье приведены результаты выделения и серологической идентификации вируса Синдбис из кровососущих комаров в природных очагах Беларуси.

**Ключевые слова:** вирус Синдбис, кровососущие комары, Беларусь.

**Введение.** Вирус Синдбис из семейства *Togaviridae* впервые был выделен в Египте из комаров *Culex pipiens* Р. Тейлором в 1952 г. [1]. В настоящее время циркуляция вируса установлена в странах Африки, Азии, Европы, Австралии [2]. Имеются данные о его циркуляции в республиках Средней Азии и Казахстана. Основными переносчиками вируса являются комары, а резервуарами возбудителя — птицы [3]. В Северной Европе описано несколько заболеваний, вызываемых разными вариантами этого вируса и сопровождающихся лихорадкой, головной, суставной, мышечными болями,

воспалением лимфатических узлов, сыпью. Это болезнь Погоста в Финляндии, Карельская лихорадка в России, болезнь Окельбо в Швеции. Сходные заболевания наблюдаются и в ряде стран Южной Америки, Африки, в Австралии, Индии, на Филиппинах, в Азербайджане, Средней Азии, Таджикистане, в Украине [4–6]. Отмечаются спорадические заболевания и небольшие вспышки. Клиническая картина заболевания характеризуется острым началом с высокой температурой, головной болью. Заболевшие испытывают сильные мышечные и суставные боли. Заболеваемость повышается в летнее время, в период активности комаров.

**Материалы и методы.** Материалом для выявления антигена и выделения возбудителя служили кровососущие комары, собранные на территории всех областей республики. Всего для исследования было взято 132 биопробы кровососущих комаров 3 родов: *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*. После определения рода кровососущих комаров раскладывали по биопробам. В одну биопробу брали от 50 до 100 экземпляров одного рода, с одного района и с учетом даты сбора. После предварительной обработки биопроб кровососущих комаров их растирали в фарфоровой ступке и готовили суспензии на фосфатно-солевом буферном растворе. Приготовленные суспензии после центрифугирования исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления в них антигена вируса Синдбис. При этом использовали диагностические иммуноферментные тест-системы Института вирусологии им. Д.И. Ивановского (Москва, РФ) согласно инструкции производителя.

Из биопроб, положительных в ИФА с антигеном вируса Синдбис, проводили выделение изолятов на новорожденных белых мышах и культуре клеток Vero E6. В случае заболевания или гибели животных их вскрывали, извлекали головной мозг для последующих пассажей. Наблюдение за животными вели в течение 5–7 дней.

На культуре клеток проводили 3–5 последовательных пассажей. Идентификацию выделенных инфекционных агентов осуществляли непрямым методом флуоресцирующих антител (нМФА), в реакции связывания комплемента (РСК) и в реакции нейтрализации (РН) с использованием моно- и полиспецифических иммуноасцитических жидкостей (ИАЖ) к различным арбовирусам: клещевого энцефалита (КЭ), Западного Нила (ЗН), калифорнийского энцефалита, Тягиня и Синдбис. Для получения ИАЖ использовали метод иммунизации лабораторных животных путем внутрибрюшинного введения 10%-й вируссодержащей суспензии. Антигены вирусов получали путем 3–5-кратного пассирования на культуре клеток Vero E6 с последующим 3-кратным замораживанием-размораживанием и концентрированием препарата полиэтиленгликолем. РНК из образцов выделяли методом кислотно-фенольной экстракции.

**Результаты и их обсуждение.** В результате вирусологических исследований материала от кровососущих комаров, давших положительный результат в ИФА на антиген вируса Синдбис, было изолировано 3 инфекционных агента (№№ 747, 764, 860). Инфекционный агент № 747 был выделен из 100 экземпляров комаров рода *Culex*, собранных в Березинском районе, а № 764 — из комаров рода *Aedes*, отловленных в Барановичском районе Брестской области; инфекционный агент № 860 был выделен из пула 100 комаров рода *Aedes*, собранных в Лоевском районе Гомельской области. Все изоляты были выделены на новорожденных белых мышах путем их внутримозгового заражения. Их инкубационные периоды на 1-м пассаже составляли от 3 до 5 дней. Белые мыши массой 6–8 г были нечувствительны к изолятам. Следует отметить, что регулярную гибель новорожденных белых мышей при заражении в мозг вызывал изолят № 764, а два других изолята регулярной гибели у мышей не вызывали.

На культуре клеток Vero E6 было проведено от 3 до 5 последовательных пассажей изолятов. Цитопатическое действие было обнаружено только у изолята № 764 на 3–5-е сут после заражения.

При идентификации изолятов на 1-м этапе типирования необходимо было исключить или подтвердить принадлежность последних к вирусу КЭ, т. к. инфекционные агенты выделялись от кровососущих членистоногих из природных очагов, где широко циркулирует вирус КЭ. Результаты предварительной идентификации выделенных агентов приведены в таблице.

Как видно из таблицы, выделенные изоляты не имеют антигенных связей с ИАЖ поли-Калифорния, поли-КЭ, моно-КЭ, моно-ЗН, моно-Тягиня. Изолят № 764 вступает во взаимодействие с моноспецифической ИАЖ к вирусу Синдбис. При идентификации изолята по всем трем методам получены положительные результаты лишь с моно-ИАЖ к вирусу Синдбис. Предварительная идентификация выделенных изолятов с использованием различных серологических методов (нМФА,

РСК, РН) показала, что изолят № 764 имеет антигенные связи с ИАЖ к вирусу Синдбис и не вступает во взаимодействие с ИАЖ к другим вирусам.

Таблица — Результаты предварительной идентификации изолятов, выделенных из кровососущих комаров

| Метод исследования | № изолята | ИАЖ к вирусам | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | поли-Калифорния | поли-КЭ | моно-КЭ | моно-ЗН | моно-Тягиня | моно-Синдбис |
| нМФА | 747 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 764 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1:40 |
| | 860 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| РСК | 747 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 764 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1:40–1:80 |
| | 860 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| РН | 747 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 764 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,8 |
| | 860 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**Заключение.** В связи с вышеизложенным изолят № 764, выделенный из комаров рода *Aedes*, можно отнести к вирусу Синдбис, изучение которого требует дальнейших научных исследований.

Следует отметить, что циркуляция вируса Синдбис на территории Беларуси была выявлена еще до выделения возбудителя. Антитела обнаружены у птиц, добытых в Гомельской и Витебской областях в 1985–1987 гг. Они выявлялись у скворцов, обыкновенных чаек, уток крякв, грачей и галок [7]. При изучении на наличие антител к вирусу Синдбис крупного рогатого скота положительно реагирующие животные обнаружены в трех областях — Брестской, Гомельской и Витебской. Антитела к вирусу Синдбис были обнаружены также у людей. Наиболее часто они выявлялись в Витебской области. Кроме того, при обследовании остролихорадящих пациентов у 8 из них обнаруживались антитела в титрах от 1:10 до 1:20 (Брестская и Витебская области). У всех пациентов клиническая картина заболевания соответствовала лихорадке вируса Синдбис [8, 9].

Таким образом, полученные вирусологические и серологические данные по выделению и идентификации изолята от кровососущих комаров и являющегося вирусом Синдбис могут свидетельствовать о его циркуляции в природных очагах Республики Беларусь.

**Литература**

1. Sindbis virus: a newly recognized arthropod-transmitted virus / R.M. Taylor [et al.] // Am. Trop. Med. Hyg. — 1955. — Vol. 4. — P. 844–846.

2. Львов, Д.К. Арбовирусы и арбовирусные инфекции / Д.К. Львов, С.М. Клименко, С.Я. Гайдамович.— М.: Медицина, 1989. — С. 7–49.

3. Львов, Д.К. Экология вирусов и эпидемиология вирусных инфекций / Д.К. Львов // Общая и частная вирусология: руководство в 2-х т. — М.: Медицина, 1982. — Т. 1, гл. 13. — С. 407–436.

4. Causative agent of Pogosta disease isolated from blood and skin lesions / S. Kurkela [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 10, № 5. — P. 889–894.

5. Этиология Карельской лихорадки, новая арбовирусная инфекция / Д.К. Львов [и др.] // Вопр. вирусологии. — 1982. — № 6. — С. 690–692.

6. Pogosta disease: clinical observations during an outbreak in the province of North Karelia, Finland / M. Turunen, [et al.] // Br. J. Rheumatol. — 1988. — Vol. 37. — P. 1177–1180.

7. Самойлова, Т.И. Актуальные вопросы изучения арбовирусных инфекций в Беларуси / Т.И. Самойлова // Материалы 9-го съезда работников профилактической медицины Республики Беларусь. — Минск, 1996. — Т. 3, ч. 1: Современные проблемы эпидемиологии и эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями. — С. 83–91.

8. Самойлова, Т.И. Новые арбовирусы, выявленные на территории Республики Беларусь / Т.И. Самойлова, В.И. Вотяков, Л.П. Титов // Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, клиника, микробиология, вирусология и иммунология): ст. и тез. докл. 1-й итог. науч.-практ. конф. — Минск, 1998. — С. 84–92.

9. Самойлова, Т.И. Арбовирусы в Республике Беларусь: (полевые и экспериментальные исследования: дис. … д-ра биол. наук: 03.00.06; 14.00.30 / Т.И. Самойлова. — Минск, 2003. — 257 с.

## DETECTION OF SINDBIS VIRUS IN MOSQUITOES IN BELARUS

*Samoilova T.I.*

*State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

In the paper the results of the isolation and serological identification of Sindbis virus from mosquitoes in the natural foci of Belarus are presented.

**Keywords:** Sindbis virus, mosquitoes, Belarus.

Получена 13.11.2015

## ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА, СОДЕРЖАЩЕГО ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЙ ФРАГМЕНТ ГЕНОМА ВИРУСА ЛИМФОЦИТАРНОГО ХОРИОМЕНИНГИТА

*Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е., Счесленок Е.П., Школина Т.В., Владыко А.С.*

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

**Реферат.** Получена «пакующая» клеточная линия AM12 LCMV3´retro, продуцирующая рекомбинантные вирусные частицы, в составе генома которых содержится диагностически значимый фрагмент S-сегмента генома вируса лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ) размером 156 пар нуклеотидов. Культуральная жидкость «пакующей» клеточной линии AM12 LCMV3´retro использована для разработки препарата «РНК-стандарт-ЛХМ», предназначенного для комплектации «Тест-системы диагностической для выявления РНК-генома вируса ЛХМ методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени» в качестве положительного контрольного образца.

**Ключевые слова:** ретровирусный вектор, «пакующая» клеточная линия, РНК-стандарт, вирус лимфоцитарного хориоменингита.

**Введение.** Создание современных диагностических тест-систем для выявления геномов РНК-содержащих вирусов на основе метода обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) предполагает наличие в комплектации тест-системы положительного контрольного образца. Использование такого внутреннего стандарта позволяет контролировать прохождение всех стадий реакции (выделение РНК, реакцию обратной транскрипции, ПЦР), оценить влияние ингибиторов, содержащихся в биологических жидкостях, на ферменты реакций ОТ-ПЦР, дает возможность количественного определения образовавшихся продуктов.

Описаны в литературе и применяются на практике различные типы внутренних стандартов. Однако особые проблемы возникают при разработке таких стандартов, где в качестве матрицы необходимо использовать РНК. Это связано с тем, что молекулы РНК являются нестабильными и легко подвергаются расщеплению рибонуклеазами. Существует несколько типов внутренних РНК-стандартов: транскрибированные *in vitro* молекулы РНК, биологические стандарты (культивируемые вирусы, вируссодержащие сыворотки), генно-инженерные стандарты (рекомбинантные бактериофаги и вирусы животных) [1–3].

Высокотехнологичным способом получения РНК-стандартов является использование для их создания ретровирусных векторов, содержащих вставки специфических фрагментов вирусного РНК-генома. Подобный тип внутреннего стандарта обладает рядом преимуществ: РНК, упакованная в ретровирусную частицу, является недоступной для действия РНКаз и, следовательно, стабильной; наличие вирусной оболочки позволяет контролировать этап выделения РНК из вирусной частицы аналогично выделению вируса из биологической жидкости; в вектор может быть клонирован диагностический фрагмент любого РНК-содержащего вируса, при этом ретровирусные частицы, продуцируемые «пакующей» клеточной линией, в отличие от биологических стандартов, не па-

тогенны; титр продуцируемых ретровирусных частиц может быть определен с помощью индикаторной клеточной линии.

Разработка внутреннего стандарта на основе ретровирусного вектора особенно актуальна для патогенов, которые не могут быть культивированы *in vitro* (гепатит *C*), а также для вирусов, относящихся к первой и второй группе патогенности, работа с которыми требует соблюдения определенных правил безопасности [1, 4].

**Цель** исследования — разработка РНК-стандарта на основе ретровирусного вектора, содержащего фрагмент диагностически значимого участка генома вируса лимфоцитарного хориоменингита, для использования его в качестве положительной контрольной пробы в составе тест-системы диагностической для выявления РНК-генома вируса лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ) методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени «Белар-ЛХМ-ПЦР/РВ».

**Материалы и методы.** *Культивирование клеточных линий.* В качестве «пакующей» клеточной линии для получения рекомбинантных вирионов использовали линию GP+env-AM12, в качестве индикаторной клеточной линии для определения титра ретровирусных частиц — линию NIH 3T3. Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки; 2 мМ L-глутамина (Sigma); 100 ед./мл пенициллина (Sigma); 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma) в атмосфере 5% $CO_2$ при температуре 37°C. Все среды для выращивания клеток прогревали на водяной бане до 37°C: полноценная среда DMEM, отмывочная среда (не содержащая сыворотки), раствор трипсина (Sigma) (0,025% в 0,05 М растворе ЭДТА). Из культурального сосуда удаляли среду культивирования и добавляли отмывочную среду, клетки промывали. Отмывочную среду удаляли и добавляли 1 мл раствора трипсина на 25 $см^2$ флакон. Клетки помещали в термостат (37°C) на 1–2 мин. Трипсинизацию останавливали добавлением 1 мл полноценной среды DMEM. Клеточную суспензию переносили в пробирку и центрифугировали при 3000 об./мин 5 мин. Надосадок удаляли, клетки ресуспендировали в 1 мл полноценной среды DMEM. Производили подсчет клеток при помощи камеры Горяева, микроскопа и счетчика клеток. Клетки высевали на полноценную среду DMEM для субкультивирования при плотности $0{,}25\times10^6$ клеток на 25 $см^2$ флакон.

*Трансфекция ретровирусного вектора в «пакующую» клеточную линию.* Ретровирусный вектор вводили в «пакующую» клеточную линию GP+env-AM12 посредством полибреновой методики трансфекции. Для этого $4\times10^5$ клеток «пакующей» линии помещали во флакон площадью 25 $см^2$ за день до постановки эксперимента. На 2-й день среду культивирования заменяли 1 мл свежей среды, содержащей плазмидую ДНК, и инкубировали в течение 6 ч в присутствии 10 мкг/мл полибрена (Sigma). Затем проводили химический «шок» в присутствии 20% DMSO (Sigma) в течение 5 мин, далее клетки отмывали и помещали в свежую среду. На следующий день культуральная среда была заменена на селективную, содержащую 400 мкг/мл G418 (химический аналог неомицина, Sigma). Клоны, устойчивые к антибиотику, изолировали на 12–14-й день после трансфекции и размножали для последующего анализа.

*Определение титра ретровирусных частиц.* Культуральную жидкость, собранную от клонов клеток GP+env-AM12, трансфицированных ретровирусным вектором, центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g для удаления клеток и дебриса. Инфицирование проводили немедленно после сбора вируса. Реципиентные клетки NIH 3T3 высевали с плотностью $3\times10^5$ на 60 мм чашки Петри за день до инфицирования. На 2-й день среду заменяли на 1 мл свежей среды, содержащей 8 мкг/мл полибрена и аликвоту тестируемого вируса. Инкубирование проводили в течение 6 ч, после чего среду заменяли на свежую. На 4-й день клетки NIH 3T3 трипсинизировали и высевали на две большие чашки Петри в среду, содержащую G418 (400 мкг/мл). Культуральную среду заменяли каждые 3–4 дня. На 10-й день отбирали клеточные клоны, устойчивые к антибиотикам, рассевали для образования монослоя и анализировали количество флюоресцирующих клеток с помощью цитофлюориметра. Титр вирусных частиц рассчитывали по формуле: $A \times B / 100 \times C$, где A — количество клеток в культуральном сосуде на момент инфицирования; B — количество флюоресцирующих клеток; C — корректирующий коэффициент, учитывающий разведение супернатанта, нанесенного на клетки.

*Выделение РНК.* Выделение РНК из биологического материала проводили с использованием коммерческого препарата TRI-reagent BD (Sigma) и набора реагентов «РИБО-сорб» (Амплисенс, РФ) согласно инструкции производителя.

*Постановка реакции ОТ-ПЦР.* Постановку реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени проводили с использованием реагентов 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» согласно инструкции по применению.

**Результаты и их обсуждение.** В качестве «пакующей» клеточной линии для получения рекомбинантных вирионов, содержащих в составе генома диагностически значимый фрагмент генома вируса ЛХМ, была использована клеточная линия GP+env-AM12, продуцирующая ретровирусные частицы с амфотропным спектром хозяев. Данная линия клеток получена на базе мышиных фибробластов NIH 3T3 и предоставляет *in trans* все вирусные белки, необходимые для размножения вектора [5]. Для ее создания в клетки NIH 3T3 последовательно были введены вирус-кодирующие последовательности gag-pol и env, не содержащие Ψ-область, ответственную за упаковку вирусного генома в вирион. Такая клеточная линия продуцирует «пустые» вирионы. При введении ретровирусного вектора в клетки «пакующей» линии он интегрирует в геном клетки-хозяина, может быть упакован в вирионы и далее эффективно реплицироваться.

Для трансфекции «пакующей» клеточной линии была использована оригинальная векторная конструкция — плазмидная ДНК pLCMV3´retro (№ депонента p21/14 от 18.03.2014), созданная при помощи методов молекулярного клонирования и генной инженерии на основе ретровирусного вектора. Ретровирусный вектор содержит в качестве вставки три функционально значимые последовательности: фрагмент 3´-нетранслируемой области S-сегмента генома вируса ЛХМ (штамм Armstrong); последовательности, кодирующие аминогликозид 3'-фосфотрансферазу (*neo*) и зеленый флюоресцирующий белок (*gfp*), а также ряд регуляторных элементов (цис-элементов), обеспечивающих получение транскрипта ретровирусной части вектора и его упаковку в рекомбинантные вирионы: два регуляторных домена LTR (long terminal repeat — длинный концевой повтор), расположенных на концах провирусной ДНК и ограничивающих последовательности, кодирующие вирусные белки; сайт связывания т-РНК затравки (PBS, primer binding site); область упаковки — димеризации (Ψ-область, ответственная за упаковку геномных молекул РНК в вирион); полипуриновый тракт — сайт инициации синтеза плюс-цепи ДНК (PPT, polypurine tract). По концам LTR расположены два небольших частично инвертированных повтора (att-сайты), необходимых для интеграции провируса в геном зараженной клетки. Таким образом, посредством полибреновой методики трансфекции была получена «пакующая» клеточная линия AM12 LCMV3´retro, которая продуцирует рекомбинантные вирионы, содержащие в составе генома диагностический фрагмент генома вируса ЛХМ.

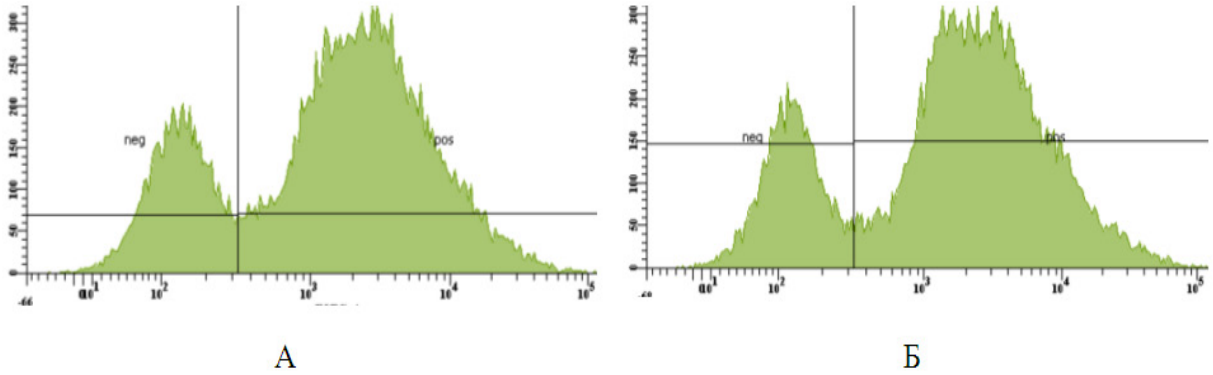
Наличие в ретровирусном векторе последовательности, кодирующей аминогликозид 3'-фосфотрансферазу (*neo*) и обеспечивающей устойчивость к женецитину (G418), позволило при добавлении антибиотика в среду культивирования провести селективный отбор тех клеточных клонов, которые содержат ретровирусный вектор в составе генома.

Титр ретровирусных частиц, продуцируемых клеточными клонами «пакующей» линии AM12 LCMV3´retro, был изучен с использованием индикаторной линии NIH 3T3 с помощью проточного цитофлюориметра по флюоресцентному сигналу зеленого флюоресцирующего белка (*gfp*), нуклеотидная последовательность которого содержится в ретровирусном векторе. Подсчет количества флюоресцирующих клеток проводили для двух независимых клеточных клонов (рисунок 1). Титры ретровирусных частиц, продуцируемых отдельными клонами, варьировали незначительно и составили $3{,}2\times10^5$ (А) и $4{,}0\times10^5$ (Б) КОЕ/мл (колониеобразующих единиц на 1 мл супернатанта).

Для подтверждения наличия в составе генома ретровирусных частиц диагностического участка генома вируса ЛХМ культуральную жидкость «пакующей» клеточной линии AM12 LCMV3´retro проверяли в реакции ОТ-ПЦР. Реакцию проводили на матрице РНК, выделенной из супернатанта «пакующей» клеточной линии, с праймерами и гибридизационной пробой, входящими в состав тест-системы «Белар-ЛХМ-ПЦР/РВ», по наличию специфического флюоресцентного сигнала. Как видно из рисунка 2, супернатант содержит рекомбинантные ретровирусные частицы, в состав генома которых встроен диагностически значимый фрагмент РНК-генома вируса ЛХМ размером 156 пар нуклеотидов.

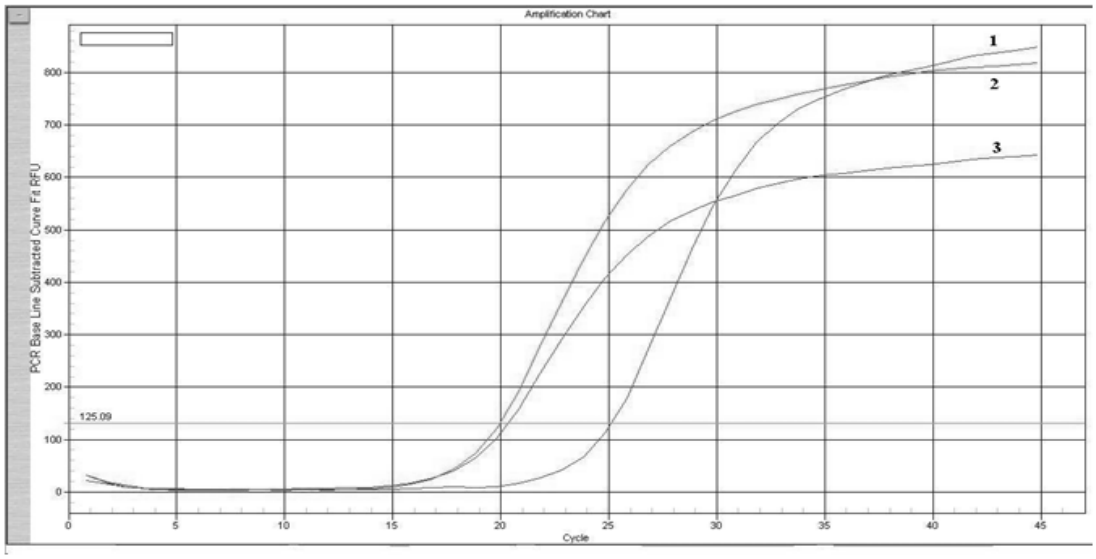
Таким образом, культуральная жидкость «пакующей» клеточной линии AM12 LCMV3´retro может быть использована для получения положительной контрольной пробы, входящей в состав

диагностической тест-системы для ПЦР-диагностики вируса ЛХМ. Использование такого положительного контрольного образца на этапе производства и комплектации «Тест-системы диагностической для выявления РНК-генома вируса лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ) методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени» позволяет исключить работу с концентрированным вирусом лимфоцитарного хориоменингита, относящимся ко 2-й группе патогенности.




А Б

**Рисунок 1. — Определение количества флюоресцирующих клеток двух независимых клеточных клонов (А, Б) индикаторной клеточной линии NIH 3T3, инфицированных культуральной жидкостью «пакующей» клеточной линии AM12 LCMV3´retro, на проточном цитофлюориметре**



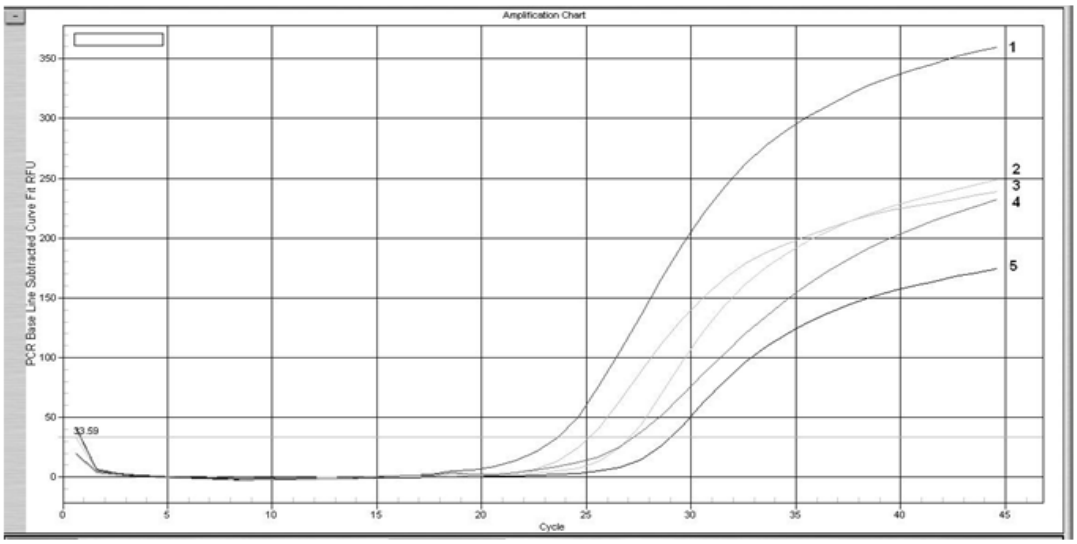

1, 2 — ОТ-ПЦР анализ РНК, выделенной из культуральной жидкости двух отдельных клонов «пакующей» клеточной линии AM12 LCMV3´retro по каналу ROX; 3 — ПЦР-анализ плазмидной ДНК pLCMV3´retro

**Рисунок 2. — Оценка наличия последовательности, кодирующей диагностический фрагмент S-сегмента генома вируса лимфоцитарного хориоменингита (штамм Armstrong) размером 156 п.н., в культуральной жидкости «пакующей» клеточной линии AM12 LCMV3´retro, используя метод ПЦР в режиме реального времени**

После отработки методик выделения РНК, постановки ОТ-ПЦР и адаптации их к условиям, используемым в «Тест-системе диагностической для выявления РНК-генома вируса ЛХМ методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени», культуральный супернатант «пакующей» клеточной линии AM12 LCMV3´retro послужил основой для создания препарата «РНК-стандарт-ЛХМ», предназначенного для комплектации указанной тест-системы в качестве положительной контрольной пробы.

При проверке методом ОТ-ПЦР биологических образцов, которые были контаминированы культуральной жидкостью, собранной от клеток «пакующей» клеточной линии AM12 LCMV3´retro, с применением специфических пар праймеров, входящих в состав диагностических тест-систем для выявления геномных РНК особо опасных и опасных вирусов методом ОТ-ПЦР, показатель специфичности для РНК-стандарта-ЛХМ составил 99%.

Чувствительность РНК-стандарта-ЛХМ определяли путем последовательного титрования до единичных копий в составе реакционной смеси экспериментального образца известной концентрации ($3{,}2\times10^5$ КОЕ/мл). Биологические образцы (сыворотка крови) были контаминированы РНК-стандартом-ЛХМ и использованы для приготовления серии разведений с известным количеством копий вирусного генома — стандартных образцов St80; St40; St20; St10; St5, позволяющих получать в конечном объеме реакции ПЦР 80, 40, 20, 10, 5 копий РНК-генома вируса ЛХМ соответственно. Из анализируемых проб была выделена РНК, которая использовалась для постановки ОТ-ПЦР. Детектируемая специфическая флюоресценция по каналу ROX была зафиксирована во всех исследованных образцах, в т. ч. при минимальном содержании (5–10 копий) РНК вируса ЛХМ в расчете на конечный объем реакции (рисунок 3). Полученные результаты свидетельствуют о возможности выявлять молекулы РНК РНК-стандарта ЛХМ в пределах 5–10 копий РНК на реакцию.




1–5 — стандартные образцы St80; St40; St20; St10; St5 соответственно

**Рисунок 3 — Оценка чувствительности РНК-стандарта-ЛХМ методом ПЦР в режиме реального времени**

**Заключение.** Посредством полибреновой методики трансфекции в клетки «пакующей» клеточной линии GP+env-AM12 ретровирусного вектора pLCMV3´retro получена «пакующая» клеточная линия AM12 LCMV3´retro, которая продуцирует рекомбинантные вирионы, содержащие в составе генома диагностически значимый фрагмент S-сегмента генома вируса ЛХМ размером 156 пар нуклеотидов. Культуральная жидкость «пакующей» клеточной линии AM12 LCMV3´retro является основой препарата «РНК-стандарт-ЛХМ», предназначенного для контроля этапов выделения генетического материала и работы компонентов реакционных смесей при прохождении реакции ОТ-ПЦР в биологическом образце в ходе выявления РНК вируса ЛХМ. По данным апробирования в условиях эксперимента препарат «РНК-стандарт-ЛХМ» обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет контролировать все этапы пробоподготовки биологического материала, повышает эксплуатационные качества и безопасность «Тест-системы диагностической для выявления РНК-генома вируса лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ) методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени», «Белар-ЛХМ-ПЦР/РВ».

**Литература**

1. Использование внешних и внутренних контрольных образцов при постановке полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции полимеразной цепной реакции / Т.Е. Сизикова [и др.] // Клинич. лаб. диагностика. — 2013. — № 3. — С. 41–44.

2. Dreier, J. Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays / J. Dreier, M. Störmer, K. Kleesiek // J. Clin. Microbiol. — 2005. — Vol. 43, № 9. — P. 4551–4557.

3. Felder, E. Development of a versatile and stable internal control system for RT-qPCR assays / E. Felder, R. Wölfel // J. Virol. Methods. — 2014. — Vol. 208, № 1. — P. 33–40.

4. Куликов, С.М. Внутренний стандарт на основе ретровирусного вектора для определения вируса гепатита С в конкурентной ПЦР / С.М. Куликов, А.Б. Сударикова, О.А. Глинщикова // Журн. микробиологии. — 2004. — № 6. — С. 84–88.

5. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line / D. Markowitz [et al.] // Virology. — 1988. — Vol. 167, № 2. — P. 400–406.

## DESIGN OF THE POSITIVE CONTROL SAMPLE CONTAINING THE DIAGNOSTICALLY SIGNIFICANT FRAGMENT OF LYMPHOCYTIC CHORIOMENINGITIS VIRUS GENOME

*Fomina E.G., Grigorieva E.E., Scheslenok E.P., Shkolina T.V., Vladyko A.S.*

*State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus*

Packaging cell line AM12 LCMV3'retro producing recombinant viral particles which genome contains the diagnostic 156 bp fragment of S-segment of lymphocytic choriomeningitis virus genome was constructed. The supernatant of the packaging line was used as a basis of RNA-standard-LCMV, which could be included in the "Real time PCR kit for the determination of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) RNA genome» as a positive control sample.

**Keywords:** retroviral vector, packaging cell line, RNA-standard, lymphocytic choriomeningitis virus.

Поступила 17.09.2015

## АНАЛИЗ ПЦР-КАРТИНЫ СОМАТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ ГЕНОВ ТЯЖТЛЫХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

*Павлов К.И.[1, 2], Титов Л.П.[1], Котикова М.А.[2], Сапешко Е.Ю.[2]*

*[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, республика Беларусь;*

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

**Реферат.** В работе представлены результаты полуколичественной ПЦР-детекции реаранжировок генов тяжелых цепей иммуноглобулинов. На примере анализа ПЦР-картины соматической рекомбинации показаны возможности оцифровки результатов агарозного гель-электрофореза и интерпретации данных. Исследование соматической рекомбинации в популяциях В-лимфоцитов здоровых добровольцев выявило вариантный характер генных реаранжировок: первая форма не характеризовалась преобладанием полных продуктов V(D)J-реаранжировок, вторая, наоборот, характеризовалась определенным преобладанием FR1-JH-фрагментов.

**Ключевые слова:** соматическая рекомбинация, тяжелые цепи генов иммуноглобулинов, поликлональные популяции В-лимфоцитов.

**Введение.** Разнообразие антигенраспознающих фрагментов антител связано с многочисленными свободными перетасовками (реаранжировками) групп генов, последовательным рядом делеций, процессинга и сплайсинга, как на стадии линейной ДНК, так и посттранскрипционно. Генетический механизм, лежащий в основе этой реорганизации, называется соматической рекомбинацией. Его открыли молекулярные биологи Судзуми Тонегава и Нобумиши Ходзуми в сериях эксперимен-

тов по сравнению ДНК В-лимфоцитов мышиных эмбрионов и взрослых животных [1]. В современных протоколах рутинной диагностики множества инфекций полимеразная цепная реакция (ПЦР) все чаще выступает как минимально достаточное исследование и как «золотой стандарт» диагностики одновременно. Совместить эти две цели позволяет высокая специфичность данной реакции, а также многочисленные способы учета данных [2, 3]. Помимо диагностики инфекционных болезней ПЦР применяется для генотипирования, выявления аллельного разнообразия молекулярных структур человеческого организма. С помощью полуколичественной ПЦР исследуется соматическая рекомбинация антигенраспознающих структур. Каждая В-клетка имеет только одну продуктивную реаранжировку. Совокупность механизмов формирования вариабельного домена тяжелой цепи и всего конечного белкового продукта иммуноглобулина в целом приводит к тому, что продукт генных реаранжировок уникален по длине и нуклеотидной последовательности для каждой В-клетки, причем различия носят действительно заметный характер [2, 4]. Исследуя совокупность ПЦР-продукты V(D)J-рекомбинаций, возможно описание специфических клонов В-клеток и общая характеристика групп этих клонов.

Для оценки клонального статуса В-лимфоцитов и процессов соматической рекомбинации были использованы подходы и методики, применяемые в гематологии для обнаружения лимфопролиферативных заболеваний. Данный метод полуколичественной ПЦР может быть направлен на описание поликлональных популяций В-лимфоцитов, просто таковые обычно не являются диагностической целью в онкогематологии, а просто отбрасываются, как не содержащие моноклональный элемент.

Стандартно при использовании мультиплексной ПЦР с миксом прямых праймеров, комплиментарных к каждому из трех FR-фрагментов, выявляются 3 ПЦР-продукта:

1) FR1-JH — полный реаранжировочный продукт без лидерного пептида (L), ожидаемым диапазоном длинн ампликонов от 300 до 400 нуклеотидных пар;

2) FR2-JH — фрагмент со средним диапазоном колебаний длинны от 200 до 280 нуклеотидных пар. Наиболее короткие варианты FR2-JH могут совпадать по длине с наиболее длинными формами FR3-JH;

3) FR3-JH — фрагмент реаранжировок имеющий наиболее консервативную последовательность константного фрагмента. Даже при наличии доминирующего лейкозного клона имеет довольно высокий диапазон длины — от 90 и до 200 оснований [4, 5].

**Цель** исследования — оценка вариабельности нормальной ПЦР-картины соматической рекомбинации генов иммуноглобулинов с использованием оцифровки данных.

**Материалы и методы.** Нормальная топография клонального статуса была исследована у 26 здоровых добровольцев без системных и острых заболеваний в возрасте от 18 до 31 года. Для выделения ДНК бралась суспензия МПК концентрацией не менее 50 млн клеток в 100 мкл буферного раствора. Экстракция ДНК проводилась набором «Нуклеосорб-В» (РФ) в соответствии с инструкцией изготовителя. Определение клональных реанжировок В-лимфоцитов проводилось с использованием микса праймеров набора ISH Somatic Hypermutation Assay (InVivoscribeTechnologies, США) (рисунок 1) [3, 6].

ПЦР проводилась с использованием не менее 1,25 U SynTaq полимеразы («Синтол», РФ) в соответствии с инструкцией изготовителя. Детекция результатов выполнялась путем гель-электрофореза в 1%-й и «вязкой» 3%-й агарозе с этидием бромидом и учетом на трансиллюминаторе. Был использован как стандартный маркер молекулярного веса, так и специальный маркер контроля качества ДНК-праймерами Specimen Control Size Ladder (InVivoscribeTechnologies, 2-096-0020). Съемка фореграмм проводилась на цифровую фотокамеру с разрешением 14 мегапикселей, сохранением в формате jpg и последующим анализом пакетом программ GelAnalyzer с опцией оцифровки. Статистическая обработка полученных результатов выполнена с использованием статистического модуля программы Microsoft Excel 2010, а также пакета статистического анализа данных Statistica 10.

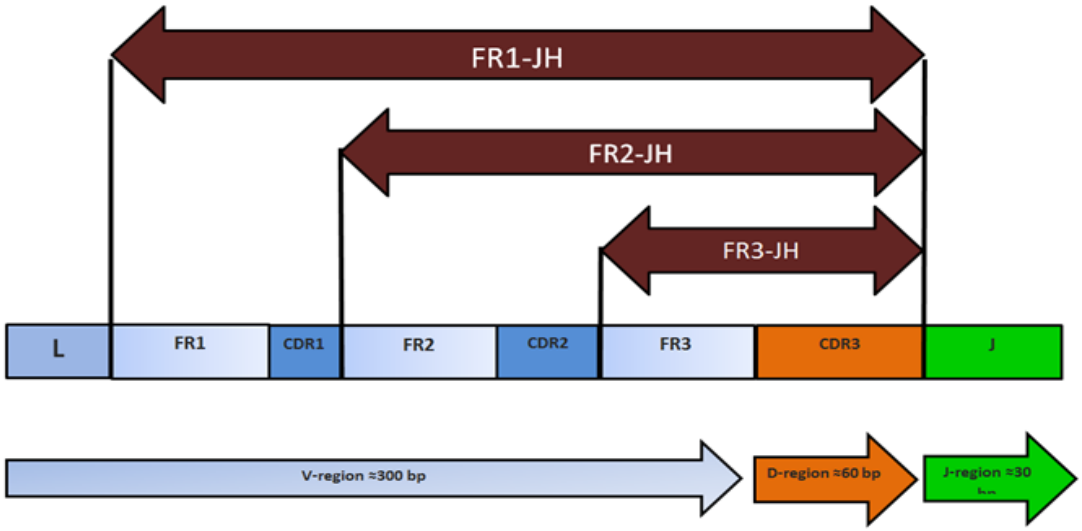



**Рисунок 1. — Фрагменты образуемых ПЦР-продуктов при использовании микса праймеров**

**Результаты и их обсуждение.** Каждый конечный продукт генетических реаранжировок для каждого отдельного клона В-клеток пусть и незначительно, но отличается от любого другого, то на электрофореграмме мы видим не отдельный ампликон, а целую полосу из сходных по длине, но не одинаковых ПЦР-продуктов. При гемобластозе в кровяном русле присутствует определенное количество клеток, потомков одного и того же клона, и ПЦР-продукты V(D)J-реаранжировок получаются идентичными, что и результируется в выраженную яркую полосу из полученных ампликонов (рисунок 2). Соответственно в электрофоретической картине наблюдаются пики разной интенсивности.

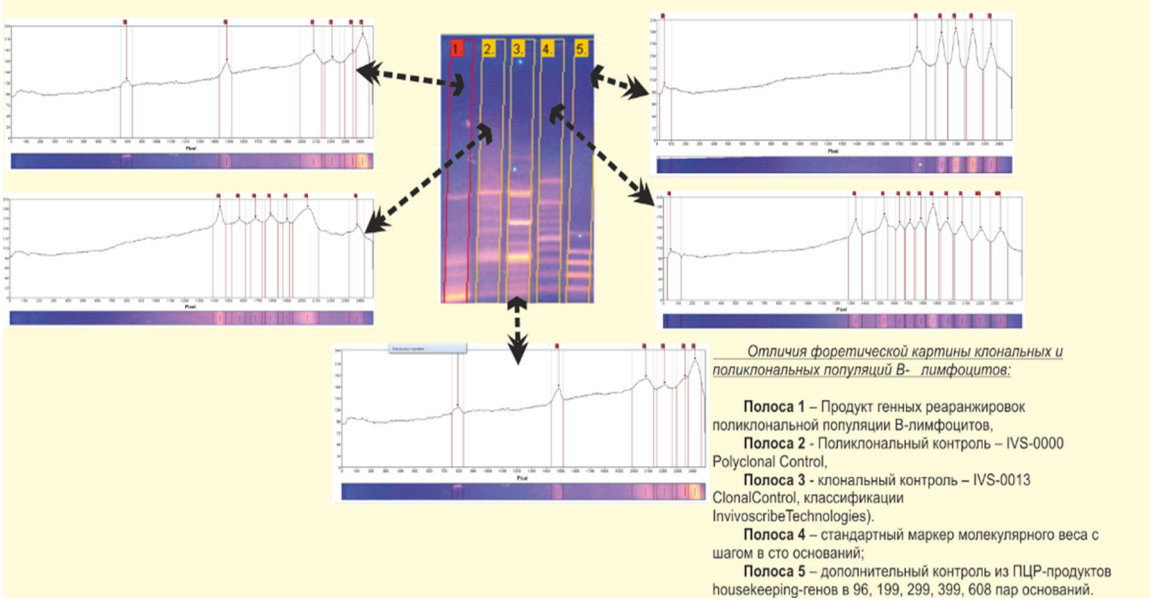


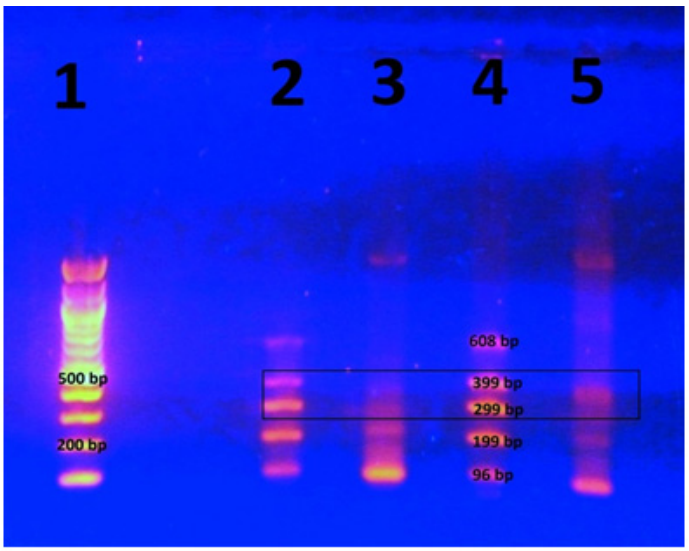

**Рисунок 2. — Отличие электрофоретической картины клональных и поликлональных популяций В-лимфоцитов**

Их можно оцифровать и представить в виде сопоставимых значений. На этом основана детекция малых популяций лейкозных клеток, что важно для прогнозирования клинико-гематологических рецидивов и определения показаний к возобновлению химиотерапии. Последняя задача связана с определением т. н. минимальной резидуальной (остаточной) болезни (МРБ).

Все образцы содержали полный набор выявляемых специфических продуктов V(D) J-реаранжировок. Было выявлено, что для большинства поликлональных образцов фрагменты порядка 250 пар оснований, соответствующие FR2-JH-фрагменту, совпадали по яркости с полным реаранжировочным продуктом FR1-JH. Во всех образцах наиболее яркими и вариативными были продукты выявления FR3-JH фрагмента, содержащего самый короткий константный фрагмент, но варьирующего в широком диапазоне от 80 до 150 пар оснований. Таким образом, можно сделать вывод о наиболее разнообразной соматической рекомбинации внутри FR3-JH фрагмента. Среди исследованных образцов были отмечены образцы с выраженными чертами клональности при электрофоретическом исследовании: в диапазоне от 300 до 400 пар оснований, где должны быть ампликоны полного продукта V(D)J реаранжировок они имели полосу [7].

Фрагмент FR2-JH при ПЦР-детекции клонального статуса ДНК линии IVS-0000 Polyclonal Control, (InvivoscribeTechnologies) имел наиболее поликлональный вид, характеризуясь многочисленными ампликонами в диапазоне от 180 до 300 нуклеотидных пар без явных пиков. Отдельные образцы тем не менее, наоборот, характеризовались присутствием двух различимых полос. Следовательно, в поликлональной популяции преобладали две формы организации FR2-JH фрагмента. У 22 из 26 обследованных на качество соматической рекомбинации пациентов была исследована поверхностная экспрессия CD19 молекул — поверхностных маркеров В-клеток. Среднее содержание В-клеток в исследованной популяции составило 10,08±1,65% от числа лимфоцитов периферической крови, что соответствует норме и никак не сопряжено с гемобластозом В-клеточного звена. Стоит отметить, что количество CD8+ Т-лимфоцитов также находилось в норме. Не отмечено было и аномалий экспрессии поверхностной молекулы CD86, также относящейся к семейству иммуноглобулинов. Тем не менее моноклональный элемент в области полного продукта реаранжировок выявлялся довольно заметно. Для 10 пациентов с диагнозом хронического гепатита *С* была выявлена стандартная поликлональная картина соматической рекомбинации. Два образца имели полосы в диапазоне полного FR3-JH продукта. Выраженной деформации в картине V(D)J-реаранжировок отмечено не было. Выпадения определенных фрагментов либо появления нестандартных ПЦР-продуктов выявлено не было. Таким образом, все исследованные образцы имели поликлональную картину генных реаранжировок. Пять образцов характеризовались определенными чертами клональности. Одной из задач исследования ставилось описание паттернов поликлональной соматической рекомбинации для выявления иммунологического полиморфизма и индивидуальной вариативности, гетерогенности популяции по данному признаку [2, 8, 9]. Суммируя все исследованные результаты V(D) J-реаранжировок, можно выделить две основных формы поликлональной картины. Следует отметить большое количество проб, в которых фрагменты порядка 250 пар оснований, соответствующие FR2-JH-фрагменту, совпадали по яркости с полным реаранжировочным продуктом FR1-JH (рисунок 3, полоса 3). Низкое выявление яркого пика в области конечного продукта указывает на многообразие реаранжировочных ампликонов и крайне интенсивную вариацию их длины в диапазоне от 300 до 400 пар оснований, что может быть показателем более высокой функциональной готовности В-клеточного рецептора при данной форме соматической рекомбинации.

Следует отметить большое содержание высокомолекулярных фрагментов в ПЦР-картине соматической рекомбинации. Наличие высокомолекулярных ПЦР-продуктов в первую очередь связано с клетками, в которых либо не происходили процессы реаранжировки, либо этот процесс был прерван. При микроэррей-исследовании мононуклеарных лейкоцитов периферической крови здоровых добровольцев выявляется большое количество генов группы BCL (B-cell lymphomas associated), которые активны на разных этапах соматической рекомбинации и могут быть связаны с образованием непродуктивных реаранжировок. Помимо этого, как Т-лимфоциты, которые невозможно удалить из общей лимфоцитарной фракции без специальных методов сортировки и сепарации, так и моноциты, которые при градиентном центрифугировании имеют ту же плотность, что и лимфоциты. Даже при высокоэффективном выделении МПК возможно присутствие определенных количеств нейтрофилов и базофилов.




Полоса 1 — стандартный маркер молекулярного веса; полосы 2–4 — маркеры молекулярного веса Specimen Control Size Ladder; полоса 3 — отсутствие выраженного пика яркости в области полного продукта амплификации; полоса 5 — совокупность полных V(D)J ПЦР-продуктов

**Рисунок 3. — Две наиболее частые формы ПЦР-продуктов V(D)J-реаранжировок генов тяжелых цепей иммуноглобулинов в поликлональных популяциях В-лимфоцитов**

Учитывая, что для большинства поликлональных образцов фрагменты порядка 250 пар оснований, соответствующие FR2-JH-фрагменту, совпадали по яркости с полным реаранжировочным продуктом. Причем в диапазоне от 250 до 400 пар оснований выявлялось сплошное скопление ампликонов. Данную тенденцию отображают графики флюоресценции этидия бромида при воздействии ультрафиолетового излучения. С помощью пакета программ GelAnalyser (http://www.gelanalyzer.com/) была выполнена оцифровка данных и трансформация фотоснимков в графики флюоресценции (рисунок 2). В качестве контролей для таких графиков служат как стандартные маркеры молекулярного веса, так и ПЦР-продукты с известной длиной (рисунок 3, полосы 2 и 4). В половине случаев выявлялась стандартная поликлональная картина соматической рекомбинации (рисунок 3, полоса 5). Выраженной деформации в картине V(D)J-реаранжировок отмечено не было ни в одном из образцов. Выпадения определенных фрагментов либо появления нестандартных ПЦР-продуктов выявлено не было.

По литературным данным, ряд вирусных патогенов с потенциалом к хронической персистенции способны оказывать воздействие на процессы соматической рекомбинации и таким образом значительно трансформировать ПЦР-картину. Вирус Эпштейна–Барр имеет целый ряд механизмов, позволяющих активировать процессы соматической рекомбинации. Вирус способен непосредственно активировать RAG-гены — гены-активаторы рекомбинации, узурпируя тем самым лимфопролиферативный механизм. Это может сказываться на структуре генных реаранжировок и ПЦР-картине, симулируя гемобластоз [10, 11]. Повышенная экспрессия этих генов может быть результатом прямой вирусной индукции и показателем перехода инфекции в латентную форму. Стимуляция вирусом генных реаранжировок может приводить к клональной экспансии лимфоцитами, имеющими не эффективный В-клеточный рецептор. Помимо вируса Эпштейна–Барр способностью влиять на клональную картину обладает также другой представитель герпесвирусов — цитомегаловирус. Другие герпесвирусы, напротив, способны ингибировать процессы соматической рекомбинации: цитомегаловирусная инфекция может не сопровождаться значительным лейкоцитозом и высоким абсолютным лимфоцитозом, хотя содержание В-лимфоцитов может превышать при этом 33%. По литературным данным, в популяции как В-, так и Т-клеток встречаются клоны клеток с непродуктивными реаранжировками. При цитомегаловирусной инфекции по ходу заболевания может отмечаться динамика в изменении клонального статуса от выраженной моноклональной картины на пике заболевания до полной редукции к поликлональной картине. Причем моноклональная картина отмечает-

ся как в костном мозге, так и в периферическом русле. Также и вирусы герпеса 6 и 7-го типов способны провоцировать иммуносупрессию как по Т-, так и по В-звену. Ряд РНК-вирусов способны оказывать воздействие на соматическую рекомбинацию. Среди них стоит выделить респираторно-синтициальный вирус [12, 13], вирусы гриппа [14], вирус гепатита *С* [15].

Соматическая рекомбинация генов иммуноглобулинов имеет прямое иммунологическое выражение в процессе созревания аффинности антител [2]. Аффинность антител напрямую связана с количеством и качеством соматических гипермутаций в генах вариабельных участков тяжелых цепей иммуноглобулинов. Соматический мутагенез представляет собой многоступенчатый регулируемый процесс единичных нуклеотидных замен в т. н. «горячих точках» вариабельных участков тяжелых цепей генов иммуноглобулинов. В последствии на основе сродства образуемых рецепторов с антигеном происходит положительная селекция В-лимфоцитов. Соматическая рекомбинация непосредственно влияет на качество и количество соматических гипермутаций. Наряду с активностью фермента Activation-induced cytidine deaminase (активированная индукцией цитидиндезаминаза, или просто цитидиндезаминаза) успешная соматическая рекомбинация — необходимое условие для созревания афинности, а следовательно, и для качества иммунного ответа.

**Заключение.** На основе полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. Исследование соматической рекомбинации в популяциях В-лимфоцитов здоровых добровольцев выявило вариантный характер генных реаранжировок: первая форма не характеризовалась преобладанием полных продуктов V(D)J-реаранжировок, вторая, наоборот, характеризовалась определенным преобладанием FR1-JH-фрагментов.

2. Для большинства поликлональных образцов фрагменты порядка 250 пар оснований, соответствующие FR2-JH-фрагменту, совпадали по размеру с полным FR1-JH фрагментом, что является одним из признаков поликлональности данной популяции.

3. Отмечалось большое содержание высокомолекулярных фрагментов в ПЦР-картине генных реаранжировок, соответствующих неэффективным формам соматической рекомбинации или переключению аллели.

**Литература**

1. Hozumi, N. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions / N. Hozumi, S. Tonegawa // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1976. — Vol. 73, № 10. — P. 3628–3632.

2. Honjo, T. Immunoglobulin heavy chain loci of mouse and human / T. Honjo, F. Matsuda, F.W. Alt // In: Immunoglobulin Genes. — London: Acad. Press, 1995. — P. 145–171.

3. Langerak, A.W. Multiple clonal Ig / TCR products: implications for interpretation of clonality findings / A.W. Langerak, J.M. Jacques, J.M. van Dongen // J. Hematopathol. — 2011. — Vol. 4. — P. 65–70.

4. Nayyar, A. Detection of immunoglobulin gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction / A. Nayyar, A. Suhaib // Int. J. Pathol. — 2011. — Vol. 9, № 2. — P. 52–54.

5. Van der Velden, V.H. Immunoglobulin kappa deleting element rearrange-ments in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for de-tection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR / V.H. Van der Velden // Leukemia. — 2002. — Vol. 16. — P. 928–936.

6. Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: I. Low grade B-cell lymphoproliferative disorders of nonfollicular center cell type / G.H. Segal [et al.] // Hum. Pathol. — 1994. — Vol. 25. — P. 1269–1275.

7. Immunoglobulin gene analysis of cutaneous pseudolymphomas by PCR / N. Fumiaki [et al.] // J. Dermatol. — 1995. — Vol. 22. — P. 403–410.

8. Mederios, L.J. The utility of polymerase chain reaction as a screening method for the detection of antigen receptor gene rearrangement / L.J. Mederios, L.M. Weiss // Hum Pathol. — 1995. — Vol. 25. — P. 1261–1263.

9. The usefulness of a rapid PCR methodology to detect rearranged Ig heavy chain genes in lymphoproliferative disease in a diagnostic setting /R.I. Angulo [et al.] // Pathology. — 1995. — Vol. 27. — P. 352–357

10. B lineage-specific regulation of V(D)J recombinase activity is established in common lymphoid progenitors / L.L. Borghesi [et al.] // J. Exp. Med. — 2004. — Vol. 199. — P. 491–502.

11. Assessment of clonality in cutaneous lymphoid infiltrates by polymerase chain reaction analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement / J.H. Ritter [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. — 1997. — Vol. 108. — P. 60–68.

12. Cabalka, A.K. Physiologic risk factors for respiratory viral infections and immunoprophylaxis for respiratory syncytial virus in young children with congenital heart disease / A.K. Cabalka // Pediat. Infect. Dis. J. — 2004. — Vol. 23, № 1. – P. 41–45.

13. Welliver, R.C. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses / R.C. Welliver // Pediat. Infect. Dis. J. — 2003. — Vol. 22, № 2. — P. 6–12.

14. Wong, E.H. Codon usage bias and the evolution of influenza A viruses / E.H. Wong // BMC Evol. Biol. — 2010. — Vol. 10. — P. 253.

15. Coinfection of hepatitis C virus with human immunodeficiency virus and progression to AIDS. Italian Seroconversion Study / M. Dorrucci [et al.] // J. Infect. Dis. — 1995. — Vol. 172, № 6. — P. 1503–1508.

## ANALYSIS OF IMMUNOGLOBULIN HEAVY CHAIN GENES SOMATIC RECOMBINATION PCR PATTERN

*Pavlov K.I.[1, 2], Titov L.P.[1], Kotikova M.A.[2], Sapeshko E.J.[2]*

*[1]State Institution "Republican research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;*

*[2]Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus*

The results of immunoglobulin heavy chains genes rearrangements semi-quantitative PCR detection were presented. Received PCR pattern of somatic recombination showed the possibility of digitizing electrophoresis results and data interpretation. The study of somatic recombination in the B-lymphocyte populations in healthy volunteers revealed the variants for gene rearrangements: the first form is not characterized by a predominance of complete product V(D)J-rearrangements, second, on the contrary — was characterized by the predominance of certain FR1-JH-fragments.

**Keywords:** somatic recombination, immunoglobulin heavy chain genes, population of polyclonal B-lymphocytes.

Поступила 14.09.2015

## ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ


**А**

*Аксенова Е.А. .....124*
*Амвросьева Т.В. ..... 10, 43, 173, 183*
*Анищенко Е.В..... 195*
*Антоневич Н.Г..... 162*
*Аринович А.С. .....43*
*Асташонок А.Н. .....128, 140*

**Б**

*Бакаева Т.Н. .....118*
*Богуш З.Ф..... 10, 43, 173*
*Бойко Т.В. .....30*
*Бореко Е.И. ..... 152*
*Борисевич С.И. .....14*
*Булай А.А. .....57*
*Бут-Гусаим Л.А. .....55*

**В**

*Варивода Е.Б. .....50*
*Веденьков А.Л. ..... 211, 214*
*Владыко А.С..... 57, 64, 143, 148, 220*
*Войтенко Н.Т. .....57*
*Войтик С.Б. .....118*
*Волченко А.Н. .....46, 50*
*Воропаев Е.В. .....202*

**Г**

*Газиумарова Л.Д. .....118*
*Гиндюк Н.Т..... 190*
*Глебко Л.В..... 190*
*Глинская И.Н..... 30*
*Гончаров А.Е. .....162, 169, 199, 208*
*Гончарова А.И..... 106*
*Горбачева Е.С. .....69*
*Горбунов В.А..... 3, 162*
*Грибкова Н.В..... 73*
*Григорьева Е.Е. .....220*
*Гудкова Е. И..... 109*
*Гулько В.А. .....55*
*Гуцалюк И.Я. .....178, 208*

**Д**

*Давидович Г.М. ..... 208*
*Давыдов А.В. .....30*
*Дедюля К.Л..... 43, 173, 183*
*Дмитраченко Т.И. .....95, 99*
*Докукина Т.В..... 140*

*Дорина Г.А. .....118*
*Дорошко М.В. .....113*
*Дубков Н.А. ..... 64, 143, 148*
*Дудчик Н.В. .....118*
*Дуж Е.В..... 162, 169*
*Думова С.А..... 14*

**Е**

*Евсеенко Е.О. .....69*
*Ермакова Т.С..... 73*
*Ермолович М.А..... 19, 25, 178*

**Ж**

*Жаворонок С.В. ..... 202*
*Жильцов И.В. .....95, 99*

**З**

*Залуцкая О.М. .....77*
*Запольская В.В. .....46, 50*
*Землянский В.А. ..... 43, 183*
*Злотникова М.В. .....205*

**К**

*Кабанова Ю.А. .....162*
*Кабышева И.М. .....69*
*Карпов И.А. .....178, 208*
*Карпович С.С. .....38*
*Касницкая Т.Н. .....64*
*Квачева З.Б. ..... 128*
*Киреев Д.В. ..... 199*
*Клюйко Н.Л..... 14, 30, 69, 118*
*Колисниченко Е.В. .....38*
*Колтунова Ю.Б. .....211, 214*
*Колчанова Н.Э. .....91*
*Корень С.В. .....162*
*Корнеева Д.Е. .....106*
*Костюк С.А..... 134*
*Котикова М.А. .....225*
*Красавцев Е.Л..... 55, 195*
*Красько А.Г. .....211, 214*
*Кузьмич И.А..... 14, 30*

**Л**

*Лагун Л.В. .....88*
*Левшина Н.Н..... 30*

*Леонард Н.В. .....38*
*Лозюк С.К. .....10, 173, 183*
*Лосева Е.М. ..... 14*
*Ляховская Н.В. .....14*

**М**

*Маклюк М.А. .....83*
*Матиевская Н.В. ..... 199*
*Маханько О.В. .....143, 148*
*Мельникова Е.И. ..... 3*
*Мельникова М.О. .....69*
*Миклаш Л.В. .....30*
*Мицура В.М. .....202*

**Н**

*Наройчик Л.К..... 46*
*Недосейкина М.С. .....124*
*Носова Е.С. ..... 69*

**О**

*Окулич В.К. ..... 91, 106*
*Омельянович О.Г. .....57*
*Осипкина О.В. .....202*

**П**

*Павлов К.И. ..... 225*
*Пашкович В.В. ..... 46*
*Петкевич А.С.....3*
*Пешняк Ж.В. ..... 128, 140*
*Поклонская Н.В. ..... 10, 43, 173, 183*
*Полещук Н.Н. ..... 128, 140*
*Полуян О.С. ..... 134*
*Полякова Н.В. ..... 14*
*Прудников А.Р. .....95, 99*

**Р**

*Раевская И.А. .....83*
*Романова И.В. ..... 208*
*Рубаник Л.В. ..... 128, 140*
*Рудая Л.Н. ..... 190*

**С**

*Садовникова Г.В. ..... 38, 190*
*Самойлова Т.И. ..... 211, 214, 217*
*Самойлович Е.О. ..... 14, 19, 25, 178*
*Сапешко Е.Ю. .....225*
*Свирчевская Е.Ю. ..... 19, 25, 178*
*Семейко Г.В. ..... 14, 19, 178*
*Семенов В.М. .....95, 99*
*Семижон П.А. ..... 57, 64, 83, 143, 148*
*Сержант Е.А. .....64*
*Скороход Г.А. .....109*
*Слизень В.В. .....77, 109*
*Суркова Л.К. .....77*
*Счесленок Е.П. ..... 57, 64, 143, 148, 220*

**Т**

*Терешков Д.В. .....202*
*Титов Л.П. ..... 30, 69, 73, 113, 118, 225*
*Токунова И.О. .....199*
*Торосян Т.А. .....95, 99*

**У**

*Ухова И.Ф. .....25*

**Ф**

*Федорович Е.В. .....64*
*Филипенок С.С. .....109, 118*
*Филипченкова М.А. .....83*
*Фомина Е.Г. ..... 148, 220*

**Ц**

*Циркунова Ж.Ф. ..... 109*

**Ч**

*Чайка А.В. .....57*
*Чистенко Г.Н. ..... 83*

**Ш**

*Шилин В.Е. .....91*
*Шиманович В.П. ..... 3, 19, 30, 162*
*Школина Т.В. ..... 57, 143, 220*
*Шнып И.В. ..... 118*

**Ю**

*Юрага Т.М. .....134*

**Я**

*Янович О.О. ..... 113*
*Яшкова С.Е. ..... 211, 214*

## 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 экземпляре. Для всего текста публикации использовать шрифт Times New Roman размером 12 пунктов, абзацный отступ (красная строка) — 1 см, с выравниванием по ширине, межстрочный интервал одинарный, без установки автоматического переноса, все поля по 25 мм.

3. Объем статьи, включая рисунки, таблицы, библиографический список литературы, — 5–7 страниц формата А4, научных обзоров — до 12 страниц.

4. Статья должна быть изложена на русском или английском языке для иностранных авторов.

5. Заглавие статьи печатается с выравнивание по центру без точек в конце и включает:

1) **НАЗВАНИЕ СТАТЬИ — ПЕЧАТАЕТСЯ ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ БЕЗ СОКРАЩЕНИЙ ЖИРНЫМ ШРИФТОМ**;

2) *фамилии и инициалы авторов* указываются ниже строчными буквами курсивом нежирным шрифтом;

3) *полное название учреждения, город, страна* указываются на следующей строке строчными буквами курсивом нежирным шрифтом.

6. После заглавия (на языке текста публикуемого материала) приводится реферат. Текст реферата должен содержать краткую информацию (до 10 строк) о результатах публикуемой работы, отражать, что нового несет в себе работа в сравнении с другими известными по тематике публикациями. После реферата печатаются ключевые слова (не более 5).

7. Текст статьи печатается с обязательным выделением следующих разделов: <u>введение</u>, содержащее краткий обзор литературы по данной проблеме с указанием нерешенных ранее вопросов, сформулированную и обоснованную <u>цель</u> работы; основная часть: <u>материалы и методы исследования</u>, <u>результаты и их обсуждение</u>, <u>заключение</u> или выводы; <u>библиографический список</u> (литература). В разделе «Материалы и методы» обязательно сообщать о соблюдении правил работ с использованием экспериментальных животных (для экспериментальных исследований), а также указать использованные методы статистической обработки данных.

8. Сокращение слов не допускается, кроме общепринятых сокращений химических и математических величин, мер, терминов. В статьях должна быть использована система единиц СИ.

9. Таблицы, графики и диаграммы должны быть тщательно выверены автором и соответствовать цифрам в тексте и располагаться после их первого упоминания. Все таблицы, графики и диаграммы должны иметь названия. Оформление таблиц, графиков и диаграмм должно соответствовать требованиям ВАК Республики Беларусь. Каждая таблица должна иметь краткий заголовок, который состоит из слова «Таблица», ее порядкового номера и наименования, отделенного от номера точкой и знаком тире. Заголовок следует помещать над таблицей слева, без абзацного отступа.

10. Иллюстрации (фотографии, графики, рисунки, схемы) должны быть высокого качества и выполнены в цветах, хорошо различимых при черно-белой печати. Количество графического материала должно быть минимальным и пронумеровано последовательно арабскими цифрами. В подписях к микрофотографиям указываются увеличение (окуляр, объектив) и метод окраски материала. Графики, выполненные в табличном редакторе Excel, должны быть внедрены в документ с возможностью их дальнейшего редактирования, не следует удалять из файла Excel страницы с исходными данными для графика. Графики должны быть выполнены на белом фоне. Иллюстрации должны иметь наименование и пояснительные данные (подрисуночный текст), располагаемые по центру страницы. Пояснительные данные помещают под иллюстрацией, а со следующей строки — слово «Рисунок», номер и наименование иллюстрации, отделяя знаком тире номер от наименования. В конце нумерации иллюстраций ставится точка, в конце их наименований точка не ставится. Не допускается перенос слов в наименовании рисунка. Слово «Рисунок», его номер и наименование ил-

люстрации печатаются полужирным шрифтом. Использование страниц альбомного формата не допускается.

11. В конце каждой оригинальной статьи должен быть приложен библиографический список литературы (не более 10), оформленный в соответствии с ГОСТ 7.1-2003 «Библиографическое описание документа», для обзорной статьи (не более 25), ссылки нумеруются согласно порядку цитирования в тексте и приводятся в квадратных скобках (например: [1] или [1–3, 6]).

12. После «Библиографического списка» печатается название статьи, фамилии авторов, название учреждения с указанием города и страны, резюме (100–150 слов) и ключевые слова на английском языке (если статья англоязычная, резюме приводится на русском языке). Буквального соответствия русского и английского рефератов не требуется.

13. В конце статьи должны быть подписи всех авторов.

14. К статье прилагаются сведения об авторах (Ф.И.О., звание, ученая степень, должность, учреждение, город, адрес электронной почты и контактный телефон).

15. Обязательно предоставление материалов в электронном виде с соблюдением вышеуказанных правил. Файл должен иметь формат MS Word (*.DOC, *.RTF). Название файла должно содержать фамилию и инициалы первого автора и первые два слова названия статьи на русском языке (например, Сидров ИИ_Способ получения.doc).

16. Статья должна быть тщательно отредактирована и выверена автором. Обязательна виза руководителя подразделения. К статье прилагается экспертное заключение о возможности опубликования в открытой печати и письмо-ходатайство организации, в которой выполнялась работа с обязательным указанием, что направляемые материалы ранее не были опубликованы или не приняты к печати другими изданиями (авторы несут за это полную ответственность).

17. Один автор имеет право на публикацию не более трех научных статей с учетом соавторства.

18. Лицам, осуществляющим послевузовское обучение (аспирантура, докторантура, соискательство) в год завершения обучения, предоставляется первоочередная возможность опубликования представленных статей.

19. Поступившие в редакцию статьи направляются на рецензирование профильным специалистам. Основным критерием целесообразности публикации является новизна и информативность статьи. Если по рекомендации рецензента статья возвращается на доработку, то переработанная рукопись вновь рассматривается редакционной коллегией, при этом датой поступления считается день получения редакцией ее окончательного варианта.

20. Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать статьи без искажения основного содержания статьи.

21. При нарушении указанных правил статьи не рассматриваются. Рукописи не возвращаются.

**Плата за опубликование научных статей не взимается со всех авторов.**

**Адрес и контактная информация редакции:**

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии,
ул. Филимонова, 23, г. Минск, 220114, Республика Беларусь
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

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

НАУЧНОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
*Горбунов В.А., Мельникова Е.И., Петкевич А.С., Шиманович В.П.* ....3

**ЭПИДЕМИОЛОГИЯ** ....**10**

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ КИШЕЧНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ЭТИОЛОГИЯ, ОСОБЕННОСТИ ЭПИДПРОЦЕССА, МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДОМИНИРУЮЩИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
*Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Богуш З.Ф., Лозюк С.К.* ....10

РЕГИОНАЛЬНОЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ МНОГООБРАЗИЕ РОТАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2014 г.
*Полякова Н.В., Семейко Г.В., Самойлович Е.О., Клюйко Н.Л., Ляховская Н.В., Борисевич С.И., Кузьмич И.А., Думова С.А., Лосева Е.М* ....14

О РЕЗУЛЬТАТАХ АНАЛИЗА ДАННЫХ ПО КОРИ И КРАСНУХЕ И ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ИХ В ЕВРОПЕЙСКУЮ РЕГИОНАЛЬНУЮ КОМИССИЮ ПО ВЕРИФИКАЦИИ ЭЛИМИНАЦИИ ЭТИХ ИНФЕКЦИЙ
*Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Шиманович В.П., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю.* ....19

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ДЕТЕЙ С СИНДРОМОМ ОСТРОГО ВЯЛОГО ПАРАЛИЧА В БЕЛАРУСИ В 2012–2015 гг.
*Ухова И.Ф., Самойлович Е.О., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю.* ....25

ДОЗОРНЫЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА БАКТЕРИАЛЬНЫМИ МЕНИНГИТАМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ (2013–2014 гг.)
*Шиманович В.П., Титов Л.П., Давыдов А.В., , Глинская И.Н., Левшина Н.Н., Бойко Т.В., Миклаш Л.В., Клюйко Н.Л., Кузьмич И.А.* ....30

ОТНОШЕНИЕ НАСЕЛЕНИЯ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ К ВАКЦИНАЦИИ
*Карпович С.С., Леонард Н.В., Колисниченко Е.В., Садовникова Г.В.* ....38

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ JC ВИРУСОВ
*Дедюля К.Л., Поклонская Н.В., Богуш З.Ф., Амвросьева Т.В., Землянский В.А., Аринович А.С.* ....43

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
*Запольская В.В., Волченко А.Н., Наройчик Л.К., Пашкович В.В.* ....46

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2010–2014 гг.
*Волченко А.Н., Запольская В.В., Варивода Е.Б.* ....50

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПАЦИЕНТОВ С HBV-ИНФЕКЦИЕЙ, СОСТОЯЩИХ НА ДИСПАНСЕРНОМ УЧЕТЕ
*Красавцев Е.Л., Бут-Гусаим Л.А., Гулько В.А.* ....55

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В МОГИЛЕВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2009–2014 гг.
*Булай А.А., Омельянович О.Г., Чайка А.В., Войтенко Н.Т., Счесленок Е.П., Семижон П.А., Школина Т.В., Владыко А.С.* ....57

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИЕРСИНИОЗОВ В ОЧАГАХ РАСПРОСТРАНЕНИЯ
*Счесленок Е.П., Касницкая Т.Н., Семижон П.А., Сержант Е.А., Дубков Н.А., Владыко А.С., Федорович Е.В.* ....64

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗИСТЕНТНОСТИ К БЕТА-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ И СУЛЬФАНИЛАМИДАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*
*Носова Е.С., Титов Л.П., Клюйко Н.Л., Горбачева Е.С., Евсеенко Е.О., Кабышева И.М., Мельникова М.О.* ....69

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ТЯЖЕЛЫХ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
*Грибкова Н.В., Ермакова Т.С., Титов Л.П.* ....73

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* МЕТОДОМ MIRU-VNTR
*Слизень В.В., Суркова Л.К., Залуцкая О.М.* ....77

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ЭНТЕРОБИОЗОМ НАСЕЛЕНИЯ ОКТЯБРЬСКОГО РАЙОНА г. МИНСКА
*Маклюк М.А., Раевская И.А., Семижон О.А., Филипченкова М.А., Чистенко Г.Н.* ....83

**МИКРОБИОЛОГИЯ ....88**

РОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК В РАЗВИТИИ ЦИСТИТА (ОБЗОР)
*Лагун Л.В.* ....88

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ БАКТЕРИЯМИ ПЕРИОДОНТАЛЬНОГО КАРМАНА И ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ РАЗРУШАЮЩИХ БИОПЛЕНКУ
*Колчанова Н.Э., Окулич В.К., Шилин В.Е.* ....91

ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ — НОВЫЙ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ НЕУДАЧИ ЭМПИРИЧЕСКОЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ
*Жильцов И.В., Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Торосян Т.А., Прудников А.Р.* ....95

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОБЩЕГО УРОВНЯ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ И МЕХАНИЗМОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ АССОЦИАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫЯВЛЯЕМОЙ В РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ПРИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ
*Жильцов И.В., Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Торосян Т.А., Прудников А.Р.* ....99

ОЦЕНКА ЭЛАСТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ С СИАЛОАДЕНИТАМИ
*Корнеева Д.Е., Гончарова А.И., Окулич В.К.* ....106

УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ НЕТИФОИДНЫХ САЛЬМОНЕЛЛ
*Слизень В.В., Циркунова Ж.Ф., Гудкова Е.И., Скороход Г.А., Филипенок С.С.* ....109

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ИНВАЗИВНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ *HELICOBACTER PYLORI*
*Янович О.О., Титов Л.П., Дорошко М.В.* ....113

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ
*Газиумарова Л.Д., Бакаева Т.Н., Титов Л.П., Шнып И.В., Филипенок С.С., Дудчик Н.В., Клюйко Н.Л., Дорина Г.А., Войтик С.Б.* ....118

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ А И ИНТЕЛЕЙКИНА 6
И ГЕНИТАЛЬНАЯ ИНФЕКЦИЯ ПРИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДАХ
*Недосейкина М.С., Аксенова Е.А.* .....124

ПАТОМОРФОЗ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ЭНДО- И ЭКЗОЦЕРВИКСА
И ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ШЕЙКИ МАТКИ,
ПЕРСИСТЕНТНО-ИНФИЦИРОВАННЫХ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*
И ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА
*Асташонок А.Н., Рубаник Л.В., Полещук Н.Н., Квачева З.Б.* .....128

ИЗУЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И НЕВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СУСТАВОВ
*Полуян О.С., Костюк С.А., Юрага Т.М.* .....134

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СООТНОШЕНИЯ МАРКЕРОВ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛЫМИ КОГНИТИВНЫМИ
РАСТРОЙСТВАМИ И ПСИХОНЕВРОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
*Асташонок А.Н., Докукина Т.В., Рубаник Л.В., Полещук Н.Н.* .....140

ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОЧИЩЕННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G
ИЗ МЫШИНОЙ ИММУНОАСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ
*Дубков Н.А., Счесленок Е.П., Маханько О.В., Школина Т.В., Семижон П.А., Владыко А.С.* .....143

ПОЛУЧЕНИЕ МЫШИНЫХ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ
АНТИТЕЛ К РЕКОМБИНАНТНОМУ БЕЛКУ, ВКЛЮЧАЮЩЕМУ CH2 И CH3 ДОМЕНЫ
Fc-ФРАГМЕНТА IgG ЧЕЛОВЕКА
*Маханько О.В., Семижон П.А., Фомина Е.Г., Счесленок Е.П., Дубков Н.А., Владыко А.С.* .....148

**ВИРУСОЛОГИЯ .....152**

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ВЕЩЕСТВ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ
*Бореко Е.И.* .....152

КОЛЛЕКЦИЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ
РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ:
НЫНЕШНЕЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ
*Корень С.В., Кабанова Ю.А., Антоневич Н.Г., Дуж Е.В.,*
*Гончаров А.Е., Шиманович В.П., Горбунов В.А.* .....162

ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ
ЛИНИЯМИ КЛЕТОК МИЕЛОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
*Дуж Е.В., Гончаров А.Е.* .....169

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ АПРОБАЦИИ АЛГОРИТМА
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ПОЛИОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
У РЕЦИПИЕНТОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
*Богуш З.Ф., Амвросьева Т.В., Дедюля К.Л., Поклонская Н.В., Лозюк С.К.* .....173

ЗНАЧИМОСТЬ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
В ЭТИОЛОГИИ ОСТРЫХ ЭКЗАНТЕМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
*Ермолович М.А., Самойлович Е.О., Гуцалюк И.Я., Карпов И.А., Семейко Г.В., Свирчевская Е.Ю.* .....178

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОБРАЗЦА ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ЭНТЕРОВИРУСОВ МЕТОДОМ ПЦР
С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ
ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ
*Поклонская Н.В., Дедюля К.Л., Амвросьева Т.В., Землянский В.А., Лозюк С.К.* .....183

О ПРОФИЛАКТИКЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ ПРИ ОКАЗАНИИ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ
*Гиндюк Н.Т., Садовникова Г.В., Глебко Л.В., Рудая Л.Н.* .....190

РОЛЬ ТРОМБОЦИТОВ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ВИЧ-СТАТУСА
У ВИЧ-ЭКСПОНИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ
*Анищенко Е.В, Красавцев Е.Л.* .....195

ЭКСПРЕССИЯ CCR5 И CXCR4 ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ
ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТРОПИЗМА ВИРУСА
*Матиевская Н.В., Киреев Д.Е., Токунова И.О., Гончаров А.Е.* .....199

ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-28В
СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ *С*,
ИМЕЮЩИХ 1 ГЕНОТИП ВИРУСА ГЕПАТИТА *С*
*Мицура В.М., Воропаев Е.В., Жаворонок С.В., Осипкина О.В., Терешков Д.В.* .....202

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЕ
РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ КОЖИ
*Злотникова М.В.* .....205

ПРЕДИКТОРЫ ЗАТЯЖНОГО ТЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА
*Гончаров А.Е., Давидович Г.М., Карпов И.А., Романова И.В., Гуцалюк И.Я.* .....208

ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ
ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В БЕЛАРУСИ В 2010–2014 гг.
*Самойлова Т.И., Красько А.Г., Колтунова Ю.Б., Яшкова С.Е., Карпук Л.И., Веденьков А.Л.* .....211

ДИНАМИКА ЗАРАЖЕННОСТИ КРОВОСОСУЩИХ КОМАРОВ
ВИРУСОМ ЗАПАДНОГО НИЛА НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ
*Самойлова Т.И., Красько А.Г., Колтунова Ю.Б., Яшкова С.Е., Веденьков А.Л.* .....214

ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСА СИНДБИС В КРОВОСОСУЩИХ КОМАРАХ БЕЛАРУСИ
*Самойлова Т.И.* .....217

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА,
СОДЕРЖАЩЕГО ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЙ ФРАГМЕНТ ГЕНОМА
ВИРУСА ЛИМФОЦИТАРНОГО ХОРИОМЕНИНГИТА
*Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е., Счесленок Е.П., Школина Т.В., Владыко А.С.* .....220

АНАЛИЗ ПЦР-КАРТИНЫ СОМАТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ ГЕНОВ
ТЯЖТЛЫХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ
*Павлов К.И., Титов Л.П., Котикова М.А., Сапешко Е.Ю.* .....225

**ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ .....232**

**ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ .....234**

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

Научное издание

# СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Сборник научных трудов

Выпуск 8

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 | О.С. Капранова |
| Корректор | О.С. Капранова |
| Компьютерная верстка | О.С. Капранова, Д.В. Сивуров |
| Обработка иллюстраций | С.Л. Абрамович |

Подписано в печать 05.12.2015.
Уч.-изд. л. 28,80.
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