

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

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

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ
ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА**

Сборник научных трудов

выпуск 9

Минск

2016

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.,
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 здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2016. — Вып. 9. — 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-генетических и клеточных механизмов патогенеза, современных проблем иммунопрофилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний.

Сборник предназначен для научных сотрудников и работников 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

ИТОГИ ВЫПОЛНЕНИЯ ПОДПРОГРАММЫ «ИНФЕКЦИИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ» ГОСУДАРСТВЕННОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ПРОГРАММЫ «НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ» ЗА 2011–2015 ГОДЫ

Горбунов В.А., Шиманович В.П., Мельникова Е.И., Амвросьева Т.В., Владыко А.С., Гончаров А.Е., Гудков В.Г., Еремин В.Ф., Красько А.Г., Титов Л.П., Рубаник Л.В., Самойлович Е.О., Шмелева Н.П.

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

Реферат. В результате выполнения научных исследований в рамках подпрограммы «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» усовершенствована система эпидемиологического надзора за распространенными инфекционными заболеваниями, разработаны тест-системы для диагностики наиболее значимых возбудителей, средства профилактики и лечения вирусных, бактериальных, иммунных заболеваний и эффективные средства контроля природно-очаговых, карантинных и особо опасных инфекционных заболеваний с использованием новых перспективных биотехнологий, соответствующих V–VI технологическим укладам. Полученные научные результаты направлены на поддержание устойчивого санитарно-эпидемиологического благополучия и необходимого уровня биологической безопасности страны.

Ключевые слова: подпрограмма «Инфекции и микробиологические нанотехнологии», государственная научно-техническая программа «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики», научные исследования, биотехнология.

В 2015 г. завершилась реализация подпрограммы «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» государственной научно-технической программы «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики», головной организацией-исполнителем которой являлось государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии». Актуальность подпрограммы была вызвана складывающейся эпидемиологической ситуацией в мире, обусловленной особенностью эволюции инфекционных заболеваний в начале XXI в. В мире отмечалось резкое снижение или ликвидация детских инфекций, контролируемых средствами иммунопрофилактики (корь, дифтерия, коклюш, эпидемический паротит, полиомиелит, натуральная оспа). Появились новые, ранее неизвестные инфекции, приобретшие черты глобального распространения в виде эпидемий и пандемий (вирусные гепатиты В и С, ВИЧ, новые варианты вируса гриппа, в т. ч. птичий вирус, новые коронавирусы и другие). Известные ранее инфекции (туберкулез, дифтерия, грипп) приобрели вновь признаки эпидемического распространения и характер более тяжелого течения. Установлена роль инфекционных агентов в патогенезе заболеваний, которые ранее не считались инфекционными — онкологических, аутоиммунных, иммунодефицитов, врожденных дефектов, неврологических и психических заболеваний. Ко всем этим проблемам естественного происхождения добавились причины искусственного характера — применение биологических агентов в качестве средств терроризма и усиление угрозы их применения в качестве биологического оружия.

Цель работы — разработка и внедрение в практическое здравоохранение эффективных средств специфической профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекционных и иммунных заболеваний; повышение эффективности эпидемиологического надзора за инфекциями; обеспечение потребности организаций здравоохранения в диагностических средствах.

Научные исследования в рамках подпрограммы выполнялись по следующим направлениям: система эпидемиологического надзора за распространенными инфекционными заболеваниями; средства для диагностики вирусных, бактериальных, иммунных заболеваний с использованием новых перспективных биотехнологий; средства профилактики и лечения вирусных, бактериальных, иммунных заболеваний; разработка эффективных средств контроля природно-очаговых, карантинных и особо опасных инфекционных заболеваний.

Внедрение полученных результатов научных исследований способствовало совершенствованию эпидемиологического надзора за рядом инфекций, что обеспечило поддержание эпидемиологического благополучия в стране.

Впервые парвовирусная инфекция показана как широко распространенное в стране заболевание, требующее использования лабораторных методов для установления диагноза. С целью повы-

шения доступности лабораторной диагностики парвовирусной инфекции разработан набор реагентов для выявления ДНК парвовируса В19 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени «Parvovirus В19», предназначенный для диагностики парвовирусной инфекции независимо от вида клинических проявлений, в т. ч. для подтверждения диагноза у лиц с макулопапулезной сыпью, установления инфицирования женщины в период беременности и внутриутробного инфицирования плода, оценки наличия вируса в организме донора при трансплантации органов и тканей, у иммунодефицитных лиц [1–3].

В результате исследований разработаны алгоритм лабораторной диагностики норовирусной инфекции и база данных, содержащая информацию об особенностях генетической структуры, генотипах и субгенотипах норовирусов, доминирующих в различных регионах и в различные периоды времени. Применение результатов научных исследований в эпидемиологическом мониторинге позволяет оперативно идентифицировать новые генотипы и геноварианты норовирусов, обладающих высоким эпидемическим потенциалом, и своевременно принимать меры по предотвращению их распространения на территории страны [4, 5].

Впервые в стране разработан метод мультиплексной TaqMan ПЦР в реальном времени для выявления и дифференциации *Bordetella pertussis* и *Bordetella parapertussis* в клиническом материале, что позволяет повысить эффективность лабораторной диагностики коклюшной инфекции в стране. Использование метода молекулярно-генетического анализа *Bordetella pertussis* на основе мультилокусного секвенирования позволяет провести молекулярно-генетический анализ по семи генам вирулентности, что обеспечивает основу для перспективного мониторинга изменений в популяции циркулирующих *Bordetella pertussis* и определения путей совершенствования используемых вакцин для достижения контроля над инфекцией [6].

По результатам научных исследований внедрена лабораторная верификация и окончательная классификация случаев эпидемического паротита. Доказана роль вакцинного штамма паротита Ленинград-Загреб в возникновении случаев эпидемического паротита, проявившихся в результате его горизонтальной трансмиссии [7–9].

Разработанный алгоритм клиничко-лабораторной дифференциальной диагностики заболеваний с синдромом острого вялого паралича у детей позволяет дифференцировать их с заболеваниями со схожей неврологической симптоматикой. Созданная база данных по заболеваниям, сопровождающихся синдромом острого вялого паралича, систематизирует результаты, полученные при проведении надзора за полиовирусной инфекцией [10].

В систему эпидемиологического мониторинга внедрены метод определения подтипа ВИЧ-1 в разных группах риска и генотипирование методом секвенирования вируса гепатита С. Это позволяет определять направления заноса вирусов в страну, расшифровывать вспышки ВИЧ-инфекции и вирусного гепатита С среди потребителей инъекционных наркотиков, случаи умышленного инфицирования, инфицирования через кровь и ее продукты и в конечном итоге проводить целевые профилактические мероприятия [11–13].

Научно обоснованы и разработаны система эпидемиологического надзора и санитарно-противоэпидемических мероприятий, алгоритм комплексной лабораторной диагностики при легионеллезной инфекции [14].

Медицинская диагностика, цель которой заключается в выявлении заболеваний на ранних стадиях и осуществлении контроля эффективности лечебных мероприятий, является одним из приоритетных направлений здравоохранения Республики Беларусь. Во всех регионах, имеющих развитую систему медицинской диагностики и оснащенные современным высокотехнологичным оборудованием диагностические центры, повышаются общие показатели здоровья населения и эффективность деятельности учреждений здравоохранения.

Современные методы медицинской диагностики основаны на новейших достижениях практической медицины и фундаментальных наук. Научные исследования и разработки в данной сфере в последние годы позволили многократно увеличить степень выявляемости инфекционных и других социально значимых групп заболеваний, расширить сферы применения современных методов медицинской диагностики и сделать их более доступными для населения.

Одним из наиболее быстро развивающихся направлений медицинской диагностики является разработка методов молекулярно-генетического анализа с использованием технологий, основан-

ных на ПЦР. В результате научных исследований разработаны тест-системы на основе ПЦР для диагностики наиболее значимых возбудителей острых кишечных инфекций бактериальной этиологии (*Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, энтероинвазивных, энтеропатогенных, энтерогеморрагических *E. coli*), аденовирусной инфекции и заболеваний, вызванных вирусом герпеса человека 6 типа, определения серогрупп *Neisseria meningitidis* (A, B, C, W135, Y, 29E), экспресс-диагностики листериоза, энтеровирусной инфекции, определения мутации резистентности в участке гена *pol* ВИЧ-1 у пациентов с ВИЧ/СПИД, оценки уровня вирусной нагрузки у пациентов с ВК вирусной инфекцией. В центре разработаны также наборы реагентов для постановки ПЦР с целью дифференциальной лабораторной диагностики острых респираторных вирусных инфекций, изучения их этиологической структуры, установления эпидемиологических особенностей циркуляции респираторных вирусов [15–22].

Распространенными методами лабораторной медицинской диагностики являются также биохимические и иммунохимические методы анализа, основанные на выявлении комплексов «антиген – антитело», рецепторном взаимодействии, определении активности ферментов с использованием специфических субстратов с хромогенными и люминесцентными метками. В ряде стран реализуются масштабные национальные программы по медицинской диагностике и мониторингу различных заболеваний с использованием методов иммунохимического анализа (обследование беременных и новорожденных в целях обнаружения генетических и приобретенных нарушений при развитии плода, раннее выявление онкологических, сердечно-сосудистых, вирусных и других заболеваний).

В результате реализации ряда научных проектов были разработаны иммунодиагностические системы для количественного определения антител класса G к вирусу гепатита A, диагностики аутоиммунной патологии и дифференциальной диагностики внутри группы буллезных дерматозов (псориазе, буллезной пузырчатке и др.), выявления антигенов рота- и аденовирусов в фекалиях пациентов, определения антител классов A, G, M к ротавирусам в биологических субстратах (сыворотка крови, слюна), диагностики энтеровирусной инфекции и санитарно-вирусологических исследований вод различного водопользования (питьевых, поверхностных, сточных) и пищевых продуктов, выявления иммуноглобулинов классов M и G к возбудителю Лайм-боррелиоза, диагностики паразитарной, респираторно-сенцитиальной и аденовирусной инфекций [23–25].

Внедрение методов лабораторной диагностики лекарственно-устойчивых форм герпесвирусных инфекций позволяет идентифицировать и выделить возбудителя из клинического материала, а также определить его чувствительность к действию противовирусных средств.

Кооперация с учеными-химиками из Института химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси позволила разработать экспрессный метод диагностики различных форм хламидийной инфекции (острая, персистентная) с использованием полученных конъюгатов флуоресцентно-меченых иммуномагнитных частиц и сконструированных биосовместимых сенсорных покрытий, что позволяет улучшить качество диагностики хламидийной инфекции, предотвратить хронизацию заболевания и тяжелые осложнения, такие как бесплодие, патология беременности и новорожденного, артропатии [26].

В рамках реализации направления по разработке средств профилактики и лечения вирусных, бактериальных, иммунных заболеваний была создана база данных коллекционных штаммов, входящая в состав программного комплекса «Коллекция патогенных микроорганизмов», основной задачей которого является формирование и поддержка актуального состояния всей совокупности справочников, классификаторов и нормативных данных для автоматизации процессов накопления сведений о штаммах и управление ими. Отработаны технологии культивирования вирусов 1–2 групп патогенности, которые явились основой при использовании методов диагностики особо опасных инфекций.

Для повышения эффективности лечения воспалительных демиелинизирующих заболеваний, ассоциированных с герпетическими вирусами и клещевым спирохетозным антигеном, предложен способ комплексной терапии, заключающийся в сочетанном применении ацикловира или его аналогов, метронидазола и цефтриаксона. Предложенная схема приводит к более полному восстановлению неврологического дефицита, снижению рецидивов и прогрессирования заболевания.

В РНПЦ эпидемиологии и микробиологии разработана технология производства и контроля качества культур клеток (MA-104, Vero E6, FRhK-4, McCoу B), которые могут быть использованы

для фундаментально-прикладных исследований в области вирусологии, клеточной биотехнологии, тканевой инженерии; диагностики вирусных инфекций, а также в контроле биологической безопасности медицинских иммунобиологических лекарственных средств; тестирования и изучения механизмов биологического действия различных физических факторов (лазерное и светодиодное излучение, крайне высокочастотное излучение, магнитное поле), факторов химической природы с целью дальнейшего исследования для разработки эффективных методов терапии заболеваний, исследований механизмов сенсibiliзирующего действия лекарственных средств [27, 28].

Разработанная компьютерная программа выбора и ротации дезинфицирующих средств с учетом микробиологического профиля в организациях здравоохранения позволяет сравнивать и выбирать дезинфицирующие и антисептические средства (в т. ч. с целью осуществления их ротации) на основании токсикологических характеристик, области и сферы применения, спектра биоцидного действия с учетом чувствительности клинических штаммов микроорганизмов, которая определяется в результате осуществления микробиологического мониторинга. Это поможет специалистам практического здравоохранения принимать решения о применении, ротации, отборе и сравнении дезинфицирующих и антисептических средств [29].

Принципиально важным направлением в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения остается создание и совершенствование системных основ предупреждения и ликвидации чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера, приведение системы надзора к уровню, адекватному для выявления и противодействия распространению новых (неизвестных), возвращающихся и распространяющихся на новые территории инфекционных болезней. Вопросы биологической безопасности (анализ, прогноз и предупреждение возникновения биологической угрозы техногенного или преднамеренного характера) должны быть постоянно в центре внимания. Разработанные в центре тест-системы позволяют проводить идентификацию возбудителей клещевых инфекций методом ПЦР в режиме реального времени (тест-система «Белар-КИ-ПЦР/РВ»), выявлять РНК-генама вируса лимфоцитарного хориоменингита методом ПЦР в режиме реального времени (тест-система «Белар-ПЦР-ЛХМ/РВ»), проводить диагностику природно-очаговых, арбовирусных и особо опасных вирусных инфекций (тест-система «Белар-Буниа-Флави-Фило-Арена-ПЦР») и гемморагической лихорадки с почечным синдромом (тест-система «Белар-ГЛПС-ПЦР/РВ») [30–33].

Использование передовых технологий, основанных на последних достижениях молекулярной биологии в области клеточных биотехнологий и нанотехнологий, соответствующих V–VI технологическим укладам, позволило за пять лет реализации подпрограммы «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» создать современные высокотехнологичные средства диагностики и методы контроля инфекционных заболеваний, направленные на поддержание устойчивого санитарно-эпидемиологического благополучия и необходимого уровня биологической безопасности страны.

Литература

1. Ермолович, М.А. Лабораторная диагностика парвовирусной инфекции при водянке плода / М.А. Ермолович // Мед. журн. — 2015. — № 3. — С. 65–68.
2. Роль парвовирусной инфекции в перинатальной патологии / Г.А. Шишко [и др.] // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. — 2015. — № 5. — С. 95–102.
3. Значимость вирусных инфекций в этиологии острых экзантемных заболеваний [Электронный ресурс] / М.А. Ермолович [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2015. — Вып. 8. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
4. Этиологическая структура вирусных острых кишечных инфекций в Республике Беларусь и генетическое разнообразие их возбудителей / Т.В. Амвросьева [и др.] // Мед. новости. — 2015. — № 12. — С. 14–22.
5. Norovirus infection in Belarus: occurrence and molecular epidemiology / N.V. Paklonskaya [et al.] // Cent. Eur. J. Public Health. — 2015. — Vol. 23, № 1. — P. 69–72.
6. Колодкина, В.Л. Генетическая вариабельность генов, связанная с вирулентностью вакцинных штаммов и клинических изолятов *Bordetella pertussis*, в Беларуси [Электронный ресурс] / В.Л. Колодкина, В.С. Мартынов // Здравоохранение. — 2016. — № 1. — Режим доступа: <http://www.zdrav.by/infektologiya-i-epidemiologiya/geneticheskaya-variabelnost-genov-svyazannaya-s-virulentnostyu>. — Дата доступа: 06.06.2016.

7. Клинико-лабораторная дифференциальная диагностика эпидемического паротита и других заболеваний слюнных желез [Электронный ресурс] / Е.О. Самойлович [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова — Минск: ГУ РНМБ, 2012. — Вып. 5. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
8. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг эпидемического паротита в Республике Беларусь [Электронный ресурс] / В.П. Шиманович [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2014. — Вып. 7. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
9. Шиманович, В.П. Характеристика лабораторно подтвержденных случаев эпидемического паротита, выявленных в Беларуси в 2011 году [Электронный ресурс] / В.П. Шиманович [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова — Минск: ГУ РНМБ, 2011. — Вып. 4. — С. 47–50.
10. Молекулярно-генетическая характеристика вирусов, изолированных от детей с синдромом острого вялого паралича в Беларуси в 2012–2015 гг. [Электронный ресурс] / И.Ф. Ухова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. ст. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2015. — Вып. 8. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
11. Еремин, В.Ф. Структура генома вируса гепатита С / В.Ф. Еремин // Здравоохранение. — 2015. — № 10. — С. 58–68.
12. The genetic properties of hepatitis C virus circulating in children with malignant diseases in Belarus [Electronic resource] / E. Gasich [et al.] // Abstr. Viral Hepatitis Summit, Apr. 10–12, 2015, Shanghai, China // J. Clin. Virol. — 2015. — Vol. 69. — Mode of access: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653215002176>. — Date of access: 25.11.2015.
13. Sequence diversity of hepatitis C virus in Belarus [Electronic resource] / E. Gasich [et al.] // Abstr. Viral Hepatitis Summit, Apr. 10–12, 2015, Shanghai, China. — Published in: J. Clin. Virol. — 2015. — Vol. 69. — Mode of access: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653215002188>. — Date of access: 25.11.2015.
14. Жданович, Е.А. Выделение легионелл из объектов окружающей среды в Республике Беларусь / Е.А. Жданович, Е.В. Федорович, А.Г. Красько // Тез. докл. Росс.-кит. науч.-практ. конф. по мед. микробиологии и клинич. микологии (XVIII Кашкинские чтения). — Опубл.: Пробл. мед. микологии. — 2015. — Т. 17, № 2. — С. 70.
15. Векторная конструкция для накопления армированных РНК / В.А. Землянский [и др.] // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2015. — № 2. — С. 19–22.
16. Амвросьева, Т.В. Генодиагностика вирусных инфекций при трансплантации почки – как профилактика вирусных посттрансплантационных осложнений / Т.В. Амвросьева, З.Ф. Богуш, Н.В. Поклонская // Дозология и здоровый образ жизни. — 2015. — № 1. — С. 19–22.
17. Тест-система для диагностики ВК вирусной инфекции человека методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / К.Л. Дедюля [и др.] // Биопрепараты. — 2015. — № 3. — С. 57–59.
18. Грибкова, Н.В. Этиологическая структура и биологические свойства возбудителей тяжелых острых респираторных инфекций [Электронный ресурс] / Н.В. Грибкова, Т.С. Ермакова, Л.П. Титов // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2015. — Вып. 8. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
19. Совершенствование лабораторной диагностики листериоза и молекулярно-генетическая характеристика изолятов возбудителя [Электронный ресурс] / Л.Д. Газиумарова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2015. — Вып. 8. — С. 118–124. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
20. Разработка экспериментального образца тест-системы для индикации энтеровирусов методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в реальном времени [Электронный ресурс] / Н.В. Поклонская [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2015. — Вып. 8. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
21. Разработка мультиплексной ПЦР для выявления и идентификации бактерий *Y. enterocolitica*, *Salmonella spp.*, термофильных *Campylobacter* [Электронный ресурс] / Е.С. Носова [и др.] // Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 50-летию мед.-профил. факультета: сб. науч. тр. / Белорус. гос. мед. ун-т; редкол.: А.В. Сикорский [и др.]. — Минск: БГМУ, 2015. — Режим доступа: http://www.bsmu.by/downloads/vrachu/konferencii/2015/sbornik_mpf.pdf. — Дата доступа: 24.12.2015.

22. Этиология ОРВИ среди госпитализированных детей в Республике Беларусь в 2011 и 2012 гг. / Н.В. Грибкова [и др.] // *Вопр. вирусологии.* — 2015. — № 3. — С. 37–40.
23. Эпидемиологический надзор за вирусным гепатитом А [Электронный ресурс] / И.В. Федорова [и др.] // *Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 50-летию мед.-профилакт. факультета: сб. науч. тр. / Белорус. гос. мед. ун-т; редкол.: А.В. Сикорский [и др.].* — Минск: БГМУ, 2015. — Режим доступа: http://www.bsmu.by/downloads/vrachu/konferencii/2015/sbornik_mpf.pdf. — Дата доступа: 24.12.2015.
24. Выявление возбудителей инфекционных заболеваний человека в иксодовых клещах, собранных в сезон 2014 г. в Республике Беларусь / О.Р. Князева [и др.] // *Тез. докл. Росс.-кит. науч.-практ. конф. по мед. микробиологии и клинич. микологии (XVIII Кашкинские чтения).* — Опубл.: Проблемы мед. микологии. — 2015. — Т. 17, № 2. — С. 83.
25. *Borrelia afzelii* Vк 593 семейства *Spirochaetaceae*, рода *Borrelia*, используемый для приготовления тест-систем, предназначенных для диагностики Лайм-боррелиоза.
26. Индикация возбудителей в гиперсекреции синовиальной жидкости и морфология хондроцитов и синовиоцитов тазобедренного сустава у пациентов с аваскулярным некрозом головки бедра [Электронный ресурс] / Н.Н. Полешук [и др.] // *Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 50-летию мед.-профилакт. факультета: сб. науч. тр. / Белорус. гос. мед. ун-т; редкол.: А.В. Сикорский [и др.].* — Минск: БГМУ, 2015. — Режим доступа: http://www.bsmu.by/downloads/vrachu/konferencii/2015/sbornik_mpf.pdf. — Дата доступа: 24.12.2015.
27. Коллекция культур клеток человека и животных РНПЦ эпидемиологии и микробиологии: нынешнее состояние и перспективы развития [Электронный ресурс] / С.В. Корень [и др.] // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова.* — Минск: ГУ РНМБ, 2015. — Вып. 8. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
28. Дуж, Е.В. Профиль экспрессии поверхностных маркеров линий клеток миелоидного происхождения [Электронный ресурс] / Е.В. Дуж, А.Е. Гончаров // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова.* — Минск: ГУ РНМБ, 2015. — Вып. 8. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
29. Уткина, Е.В. Характеристика микробного пейзажа внутрибольничной среды на примере детского стационара и учреждения родовспоможения г. Бреста [Электронный ресурс] / Е.В. Уткина, В.А. Горбунов // *Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 50-летию мед.-профилакт. факультета: сб. науч. тр. / Белорус. гос. мед. ун-т; редкол.: А.В. Сикорский [и др.].* — Минск: БГМУ, 2015. — Режим доступа: http://www.bsmu.by/downloads/vrachu/konferencii/2015/sbornik_mpf.pdf. — Дата доступа: 24.12.2015.
30. Получение положительного контрольного образца, содержащего диагностически значимый фрагмент генома вируса лимфоцитарного хориоменингита [Электронный ресурс] / Е.Г. Фомина [и др.] // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. ст. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова.* — Минск: ГУ РНМБ, 2015. — Вып. 8. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
31. Средство для лечения лимфоцитарного хориоменингита и лихорадки Ласса: пат. 19672 Респ. Беларусь Респ. Беларусь: МПК А 61К 36/896 [Электронный ресурс] / Н.Л. Богданова, Л.М. Рустамова, А.С. Петкевич, А.Г. Красько; заяв. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. — № a20130254; заявл. 27.02.13; опубл. 30.10.2014 // *Афіц. бюл. / Нац. цэнтр інтэлект. уласнасці.* — 2015. — № 6. — Режим доступа: <http://www.belgospatent.org.by/files/Bulletin/Izob/2015/2015-6.pdf>. — Дата доступа: 06.06.2016.
32. Проблемы и перспективы диагностики вирусного лимфоцитарного хориоменингита / Е.Г. Фомина [и др.] // *Общие угрозы — совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: материалы междунар. конф., Москва, 23–24 июня 2015 г. / Под ред. А.Ю. Поповой, В.В. Кутырева.* — М., 2015. — С. 391–393.
33. Разработка и использование иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусам Ласса, Марбург, Эбола / А.С. Владыко [и др.] // *Общие угрозы — совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: материалы междунар. конф., Москва, 23–24 июня 2015 г. / Под ред. А.Ю. Поповой, В.В. Кутырева.* — М., 2015. — С. 79–81.

Поступила 12.08.2016

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Амвросьева Т.В.¹, Бозуш З.Ф.¹, Бискина Н.М.², Поклонская Н.В.¹, Лозюк С.К.¹

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

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

Реферат. В статье изложены данные по заболеваемости энтеровирусными инфекциями (ЭВИ) в разных регионах Республики Беларусь за последние 2 года по 5 регистрируемым клиническим формам, указана ее возрастная структура, особенности эпидпроцесса. Описан спектр циркулирующих возбудителей и их молекулярно-эпидемиологические характеристики. Рекомендованы основные направления деятельности практического здравоохранения в рамках контроля данной социально значимой группы инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: энтеровирусные инфекции, заболеваемость, молекулярная эпидемиология, Беларусь.

Введение. Согласно данным многолетнего статистического учета по 5 нозологическим формам (энтеровирусный энцефалит, энтеровирусный менингит, энтеровирусный гастроэнтерит, энтеровирусный везикулярный фарингит, прочие формы энтеровирусной инфекции), ежегодно на территории страны регистрируется в среднем от 0,6 до 1,8 тыс. случаев ЭВИ. Всего различными клиническими формами ЭВИ в 2015 г. заболело 1322 человека, в 2014 г. — 1736 человек. В 2015 г. интенсивность эпидемического процесса ЭВИ снизилась по сравнению с 2014 г. на 24%. Так, показатель заболеваемости, включая гастроэнтериты, при пересчете на 100 тыс. населения составил в 2015 г. 14,0 против 18,38 в 2014 г. (рисунок 1).

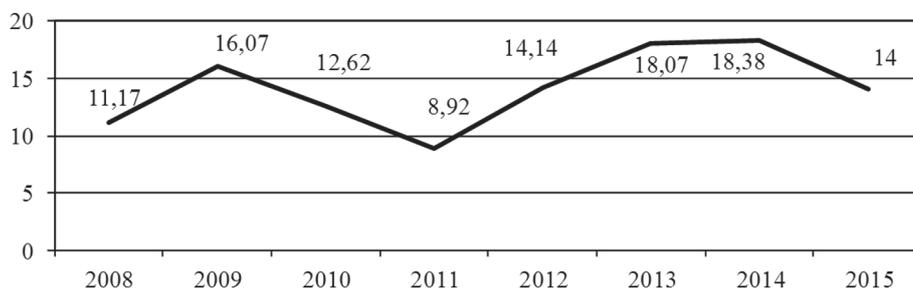


Рисунок 1. — Многолетняя динамика заболеваемости ЭВИ в Республике Беларусь за 2008–2015 гг.

Сопоставление сглаженной кривой, характеризующей отклонения фактических показателей заболеваемости ЭВИ от выпрямленной теоретической криволинейной тенденции (рисунок 2), в динамическом ряду наблюдений за 8 лет (2008–2015 гг.) выявил 1 полный цикл длительностью 5 лет (2008–2012 гг.). Период 2010–2011 гг. по уровню ЭВИ был эпидемически благополучным, начиная с 2012 г. интенсивность эпидпроцесса значительно возросла, 2013–2014 гг. были годами циклического подъема заболеваемости ЭВИ, в 2015 г. отмечался очередной циклический спад заболеваемости.

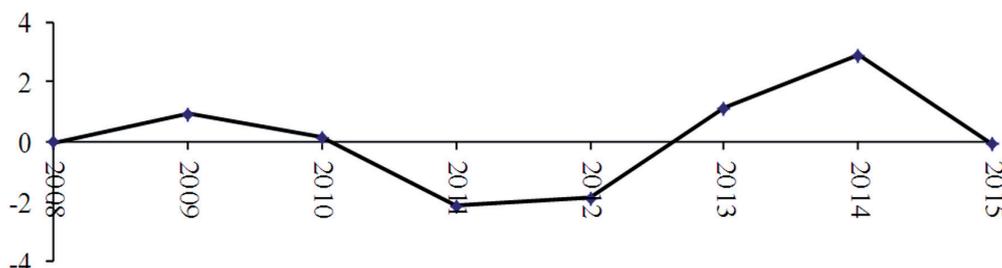


Рисунок 2. — Эпидемическая цикличность заболеваемости ЭВИ в Республике Беларусь за 2008–2015 гг.

Кроме того, 2015 г. был вторым годом циклического спада заболеваемости одной из самых тяжелых клинических форм ЭВИ — серозным менингитом — в 6,3 раза, по сравнению с 2013 г. — с 3,55 до 0,56 на 100 тыс. населения (рисунок 3).



Рисунок 3. — Динамика заболеваемости серозным менингитом в Республике Беларусь за 2008–2015 гг. (на 100 тыс. населения)

Заболеваемость ЭВИ в разрезе административных территорий республики характеризовалась значительным «разбросом» показателей. Уменьшение республиканского показателя заболеваемости ЭВИ в 2015 г. (рисунок 4) было обусловлено снижением заболеваемости на территориях практически всех областных регионов страны, за исключением Витебского, где показатель вырос в 1,7 раза (с 6,7 на 100 тыс. населения в 2014 г. до 11,43 в 2015 г.), и Гродненского (превышение составило 30,7%). В истекшем году наиболее высокий уровень регистрировался в г. Минске — 27,34 на 100 тыс. населения, что превысило республиканский показатель в 1,9 раза. Территориями с уровнем заболеваемости практически в 3 раза ниже республиканского, были Могилевская и Гомельская области.

Как и в 2014 г., в возрастной структуре регистрируемых клинических форм ЭВИ в 2015 г. преобладали дети до 14 лет — 83% заболевших. Наиболее высокий удельный вес ЭВИ отмечался у детей ясельного и садового возраста (рисунок 5).

Заболеваемость клинически более легкими формами ЭВИ (гастроэнтериты, фарингиты, прочие) доминировала у детей до 2-х лет (рисунок 6). Инцидентность неврологических форм (менингиты, энцефалиты) была выше у детей 3–6 лет и немного реже отмечалась у детей до 1 года и 7–14 лет. У взрослых лиц наиболее часто встречались гастроэнтериты.

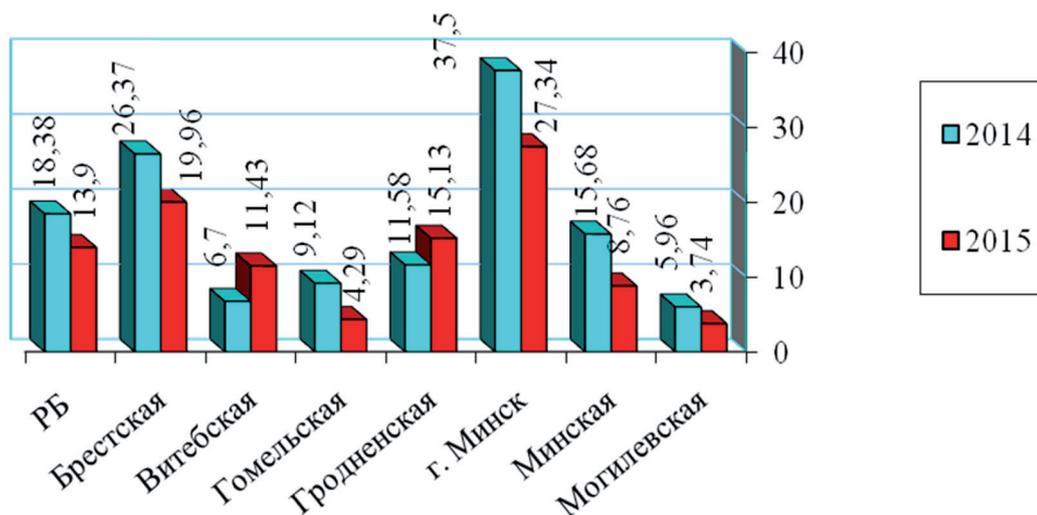


Рисунок 4. — Сравнительная заболеваемость ЭВИ в разрезе территорий и Республики Беларусь за 2014–2015 гг. (на 100 тыс. населения)

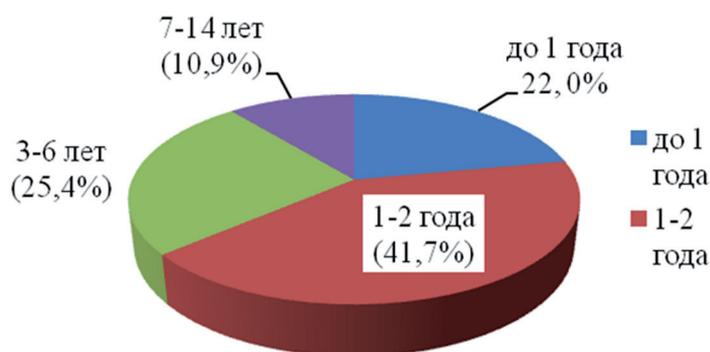


Рисунок 5. — Возрастная структура детской заболеваемости ЭВИ в Республике Беларусь в 2015 г.

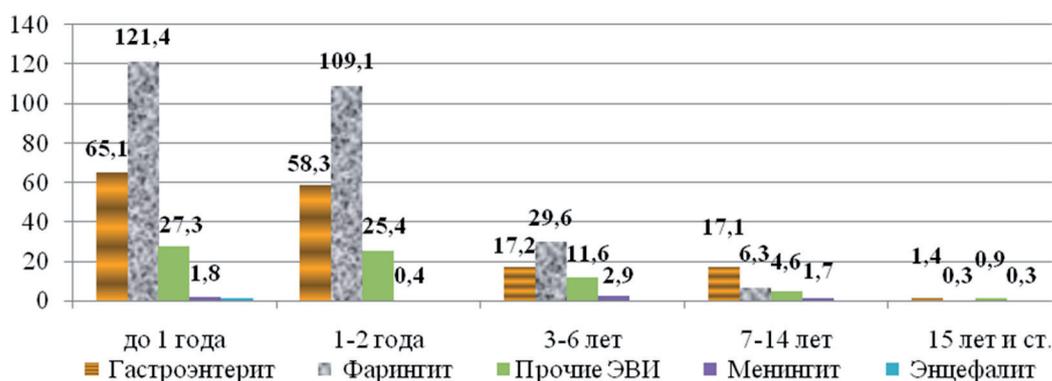


Рисунок 6. — Заболеваемость в разрезе нозологических форм ЭВИ по возрастным группам за 2015 г. (на 100 тыс. возрастной группы)

В 2015 г. по сравнению с предыдущим годом практически во всех возрастных группах населения отмечалось снижение показателей заболеваемости ЭВИ по всем нозологическим формам, за исключением детей в возрасте до 1 года, где наблюдался рост заболеваемости менингитами (с 0 до 1,76 на 100 тыс. возрастной группы) и энцефалитами (с 0 до 0,88), а также детей 7–14 лет, где отмечался рост гастроэнтеритов (с 4,63 до 17,14).

В целом в структуре клинических форм ЭВИ в 2015 г. вклад гастроэнтеритов составил 31,8%, фарингитов — 45,5%, прочих форм ЭВИ — 18,5%, на долю менингитов и энцефалитов пришлось 4,0 и 0,3% соответственно. По сравнению с предыдущим годом нозологическая структура ЭВИ в 2015 г. характеризовалась увеличением удельного веса гастроэнтеритов, фарингитов и прочих ЭВИ в пределах 2,4–5,0% и снижением удельного веса менингитов и энцефалитов на 4,1 и 0,2% соответственно.

В структуре клинических форм ЭВИ, регистрируемых на различных административных территориях Республики Беларусь, в 2015 г. гастроэнтериты преобладали в Брестской, Гродненской и Минской областях (48,6; 19,3 и 13% соответственно), менингиты — в Гомельской области и г. Минске (39,6 и 26,4%), фарингиты — в г. Минске, Гродненской и Витебской областях (63,7; 10,85 и 9,8% соответственно), прочие формы ЭВИ — в г. Минске и Витебской области (40,8 и 21,6%).

Вышеприведенные данные по заболеваемости населения республики ЭВИ в 2015 г. базируются на результатах анализа 17398 проб клинического материала на наличие маркеров неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ), проведенных в рамках лабораторного контроля циркуляции возбудителей данной группы инфекций. Положительные образцы составили 11,9%. В разрезе регионов максимально высокий уровень выявления маркеров НПЭВ был зарегистрирован в Гродненской области (26,94%), г. Минске (22,54%), Минской (22,52%), Витебской (15,84%) и Брестской (12,08%) областях. Интенсивность циркуляции НПЭВ по сравнению с 2014 г. среди населения Витебской области оставалась на прежнем уровне, в Гродненской области отмечался рост в 2,5 раза — с 10,56% до 26,94%, на остальных территориях наблюдалось ее незначительное снижение.

Поскольку для ЭВИ характерен эпидемический тип распространения, в механизме реализации которого особую значимость имеют внешнесредовые факторы (вода, пищевые продукты), важная роль отводилась исследованию объектов окружающей среды на предмет их вирусологической безопасности. В 2015 г. было исследовано свыше 6 тыс. проб (6201), из которых 2210 составили пробы водопроводной воды, 470 — воды открытых водоемов, 342 — воды бассейнов и зон рекреации, 344 — воды водоисточников, 51 — воды колодцев, 1600 — воды сточной, 459 — смывов с предметов обихода и 725 — пищевых продуктов. В 0,8% случаев были зарегистрированы нестандартные по вирусологическим показателям пробы.

Наибольшие уровни энтеровирусного загрязнения объектов окружающей среды имели место в Гродненской области (2,84%), г. Минске (2,22%), Брестской области (1,45%). В Минской области данный показатель составил 0,8%, в Могилевской — 0,38%, в Витебской и Гомельской областях уровни энтеровирусного загрязнения объектов окружающей среды не регистрировались.

Данные о спектре и типовой структуре циркулировавших в 2014–2015 гг. в Республике Беларусь НПЭВ представлены в таблице. В 2014 г. доминирующими вирусными агентами были ЕСНО 30, ЕСНО 11 и ЕСНО 6 с удельным весом в общем пуле выделенных в этом году изолятов 26,0; 14,4 и 13,5% соответственно. Из серогруппы ЕСНО вирусов выделялись также ЕСНО 7, 9 и 16 типов. Из представителей Коксаки А вирусов были выявлены Коксаки А 1, 5, 6, 9 и 16 типов с незначительным удельным весом каждого из них, не превышающим 2,0%. Ареал циркуляции высоковирулентного вируса ЕСНО 30 охватил большинство регионов республики, за исключением Брестской и Гродненской областей.

Среди циркулировавших в 2015 г. НПЭВ присутствовали представителями серогрупп Коксаки В (серотипы 3, 4, 5), Коксаки А (серотип 9) и ЕСНО (серотипы 3, 5, 6, 11, 16, 25, 30). В типовой структуре с минимальным перевесом доминировали вирусы Коксаки В, которые составили 39,8%. На долю вирусов ЕСНО пришлось 37,3%, Коксаки А — 1,2%. Значительный процент (21,7%) составили НПЭВ с неустановленным серотипом.

Таблица — Рейтинг НПЭВ, циркулировавших на территории Республики Беларусь в 2014–2015 гг.

2014 г., %	2015 г., %
ЕСНО 30 — 26,0	Коксаки В 5 — 21,7
ЕСНО 11 — 14,4	ЕСНО 11 — 14,5
ЕСНО 6 — 13,5	ЕСНО 6 — 10,8
Коксаки В 1–6 — 8,7	Коксаки В 3 — 9,6
Коксаки В 3 — 6,7	Коксаки В 1–6 — 6,0
Коксаки В 5 — 6,7	ЕСНО 3 — 4,8
Коксаки А 1 — 1,9	Коксаки В 4 — 2,4
Коксаки А 9 — 1,9	ЕСНО 16 — 2,4
ЕСНО 7 — 1,9	ЕСНО 30 — 2,4
ЕСНО 9 — 1,9	ЕСНО 5 — 1,2
Коксаки А 5 — 1,0	ЕСНО 25 — 1,2
Коксаки А 6 — 1,0	Коксаки А 9 — 1,2
Коксаки А 16 — 1,0	Не типизируемые НПЭВ — 21,7
ЕСНО 16 — 1,0	
Не типизируемые НПЭВ — 12,	

Вирусы ЕСНО 11 (Витебская область и г. Минск), ЕСНО 6 (Минская область), ЕСНО 30 и Коксаки В 5 (Могилевская область), Коксаки В 3 (Гродненская область) были изолированы на этих территориях как из окружающей среды, так и из клинического материала. Циркуляция серотипа ЕСНО 16 отмечалась среди населения Могилевской области и была зарегистрирована также в объектах окружающей среды в Гродненской области. Из относительно «новых» серотипов НПЭВ, не встречающихся в течение 2–4 предшествующих лет, на территории Гомельской области зафиксированы вирусы ЕСНО 25 и ЕСНО 3, на территории Витебской области — Коксаки В 4. Из достаточно широкого спектра представителей Коксаки А вирусов, циркулировавших в 2014 г. на территории столичного региона, в 2015 г. регистрировался только серотип Коксаки А 9.

Особенностью циркуляции НПЭВ в 2015 г. по сравнению с 2014 г. было увеличение удельного веса серотипов Коксаки В5 (с 6,7 до 21,7% от общего пула изолятов) и Коксаки В 3 (с 6,7 до 9,6%). Вклад доминировавших в 2014 г. представителей ЕСНО вирусов либо оставался практически на прежнем уровне (ЕСНО 11 — 14,5 против 14,4% в 2014 г., ЕСНО 6 — 10,8 против 13,5% в 2014 г.), либо резко снизился, как это произошло с вирусом ЕСНО 30 — его удельный вес в общем пуле изолятов составил всего 2,4%, по сравнению с 26,0% в 2014 г.

По результатам молекулярно-эпидемиологического анализа эпидемически значимых возбудителей ЭВИ в 2014 г. продолжилась циркуляция того же геноварианта ЕСНО 30, который регистрировался в нашей стране с 2012 г. Данный геновариант впервые появился в Китае и характеризовался высокой вирулентностью. Длительность его циркуляции в Беларуси определялась, с одной стороны, биологическими свойствами вируса (высоким эпидемическим потенциалом), с другой — недостаточной иммунной прослойкой в отношении данного возбудителя среди населения. Вирусы ЕСНО 9, Коксаки А 9 и Коксаки В 3 принадлежали к ранее не регистрировавшимся в нашей стране геновариантам. К числу новых, не встречавшихся на территории республики в течение последних 15 лет серотипов НПЭВ, можно отнести отдельные серотипы вирусов группы Коксаки А (1, 5, 6), которые методом молекулярного типирования были обнаружены в г. Минске.

В 2015 г. практически все циркулировавшие НПЭВ характеризовались значительной генетической гетерогенностью и включали различные геноварианты. Так, широко распространенный в 2015 г. серотип Коксаки В 5 был представлен 2 генетическими линиями, в пределах которых было идентифицировано 3 различных геноварианта вируса, 2 из них продолжали циркулировать с 2014 г., а один был ранее зарегистрирован в 2005 г., после чего вплоть до 2015 г. его циркуляция не наблюдалась. Геновариант серотипа Коксаки В 3 был для населения новым и принадлежал к генетической линии GПВ, тогда как ранее циркулировавший геновариант относился к генетической линии GVB. Циркуляция вируса ЕСНО 11 характеризовалась появлением на территории нашей страны нового, неизвестного ранее геноварианта: в предшествующие годы регистрировались вирусы, принадлежавшие к геногруппам D5 и D4, а в 2015 г. все идентифицированные вирусы ЕСНО 11 принадлежали к геногруппе D1.

Вирус ЕСНО 3 редко встречался в предшествующие годы на территории Беларуси, поэтому данные о ранее циркулировавших геновариантах этого серотипа отсутствуют. Анализ его изолятов, выявленных в 2015 г., показал, что все они принадлежали к одному геноварианту вируса, который достаточно давно циркулировал на территории Европейского региона. Белорусские изоляты вируса ЕСНО 3 обнаруживали 93–94% сходства с таковыми, выделенными в 2004–2005 гг. во Франции, Грузии и Тунисе.

На основании вышеизложенного можно отметить следующие особенности развития эпидпроцесса ЭВИ неполиомиелитной природы на территории Республики Беларусь в 2015 г. по сравнению с 2014 г.:

- общее снижение заболеваемости (на 24%);
- увеличение удельного веса легких нозологических форм (гастроэнтеритов, фарингитов, прочих ЭВИ) на 2,4–5,0% и снижение удельного веса тяжелых неврологических форм (менингитов и энцефалитов) на 0,2–4,1% в общей структуре клинических форм;
- смена доминирующего возбудителя (2014 г. — ЕСНО 30; 2015 г. — Коксаки В 5);
- резкое снижение интенсивности циркуляции высоковирулентного геноварианта вируса ЕСНО 30 (с 26,0% в 2014 г. до 2,4% в 2015 г.) и сокращение ареала его распространения до территории одного региона (Могилевской области);
- значительная генетическая гетерогенность циркулирующих серотипов НПЭВ, включающих различные геноварианты возбудителей, в т. ч. те, циркуляция которых в предшествующий период не регистрировалась (вирусы ЕСНО 25, ЕСНО 3, ЕСНО 11 геногруппа D1, Коксаки В 3 GПВ, Коксаки В 4).

На основании указанных особенностей эпидемического процесса по ЭВИ основные направления деятельности практического здравоохранения в рамках контроля данной социально значимой группы инфекционных заболеваний должны соответствовать действующим на территории нашей страны Санитарным нормам и правилам «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения энтеровирусных инфекций неполиомиелитной природы», утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь 13.03.2014 № 15. С учетом сло-

жившейся в 2016 г. тревожной ситуации по эпидемической заболеваемости ЭВИ в сопредельных странах (вспышки в Свердловской, Вологодской, Тамбовской, Иркутской и других областях) [1–4] особую актуальность имеют следующие профилактические мероприятия:

- обеспечение ежедневного мониторинга заболеваемости ЭВИ и энтеровирусными менингитами с принятием оперативного комплекса санитарно-противоэпидемических мероприятий в случае обострения эпидемиологической ситуации;

- осуществление молекулярно-эпидемиологического мониторинга возбудителей ЭВИ в соответствии с действующими нормативными и инструктивными документами в области диагностических и санитарно-вирусологических исследований [5–12];

- регулярная информационно-образовательная работа по профилактике ЭВИ с акцентом на работу с персоналом и родителями в закрытых коллективах для детей (детских садах, учреждениях образования, оздоровительных учреждениях и др.).

Литература

1. Леонов, А.В. Первоуральске около тридцати детей попали в больницу с диагнозом менингит [Электронный ресурс] / А.В. Леонов // Комсомольская правда в Екатеринбурге. — 2016. — Режим доступа: <http://www.ural.kp.ru/online/news/2492435/>. — Дата доступа: 26.08.2016.

2. В Вологодском лагере отравилось 26 детей [Электронный ресурс] // Росбалт. — 2016. — Режим доступа: <http://www.rosbalt.ru/russia/2016/08/15/1541064.html>. — Дата доступа: 15.08.2016.

3. В Тамбовской области отмечены случаи заболевания серозным менингитом [Электронный ресурс] // «Интерфакс-Россия». — 2016. — Режим доступа: <http://www.interfax-russia.ru/Center/news.asp?id=752526&sec=1671>. — Дата доступа: 09.08.2016.

4. Мильшина, Т. В лагере «Наратэй» на Байкале энтеровирусом заболели более 40 детей [Электронный ресурс] / Т. Мильшина // Комсомольская правда в Иркутске. — 2016. — Режим доступа: <http://www.irk.kp.ru/daily/26565/3581735/>. — Дата доступа: 09.08.2016.

5. Инструкция по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций № 133-1204: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 12.04.2005. — Минск: НИИ эпидемиологии и микробиологии, 2005. — 28 с.

6. Инструкция по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов № 134-1204: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 12.04.2005. — Минск: НИИ эпидемиологии и микробиологии, 2005. — 24 с.

7. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг энтеровирусной инфекции: инструкция по применению № 165-1208: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 11.06.2009. — Минск: НИИ эпидемиологии и микробиологии, 2009. — 34 с.

8. Методы контроля качества пищевых продуктов по вирусологическим показателям: инструкция по применению № 166-1208: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 11.06.2009. — Минск: НИИ эпидемиологии и микробиологии, 2009. — 20 с.

9. Лабораторная диагностика вирусных острых кишечных инфекций: инструкция по применению № 111-1210: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 15.12.2010. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2011. — 24 с.

10. Лабораторный контроль за возбудителями вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи: инструкция по применению № 002-0213: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 13.06.2013. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2013. — 16 с.

11. Методы отбора и концентрирования проб из объектов среды обитания человека: инструкция по применению № 016-1213: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 25.03.2014. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2014. — 10 с.

12. Алгоритм санитарно-вирусологического контроля объектов среды обитания человека: инструкция по применению № 013-1115: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 16.12.2015. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2014. — 14 с.

ACTUAL ISSUES OF ENTEROVIRAL INFECTION IN BELARUS

Amyrosieva T.V.¹, Bogush Z.F.¹, Paklonskaya N.V.¹, Biskina N.M.², Lozuk S.K.¹

*¹State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology and Microbiology",
Minsk, Republic of Belarus;*

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

The article presents the data on enteroviral infection morbidity in different region of Belarus for the last two years including frequency of different clinical forms, age structure and peculiarities of epidemic

process. Spectrum and molecular epidemiology of enteroviruses are described. The principal directions of practical public health activities within the control of this group of socially significant infectious diseases are recommended.

Keywords: enteroviral infection, morbidity, molecular epidemiology, Belarus.

Поступила 29.08.2016

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО МАЛЯРИИ НА ТЕРРИТОРИИ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ВРЕМЕНИ, ФАКТОРЫ РИСКА ВОССТАНОВЛЕНИЯ МЕСТНОЙ ПЕРЕДАЧИ ТРЕХДНЕВНОЙ МАЛЯРИИ

Корзан А.И., Ярец Л.Н., Гиндюк Н.Т., Садовникова Г.В., Подушкина Е.А.

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

Реферат. В Брестской области малярия как массовое заболевание была ликвидирована в 1958 г. и по настоящее время регистрируются только завозные случаи этой инфекции, среди которых преобладает *vivax*-малярия, которая может иметь эпидемиологические последствия. В настоящее время вероятность возникновения очагов местной малярии сохраняется в связи расширением климато-обусловленных ареалов инфекции, высокой численностью малярийных комаров и их видовым разнообразием на территориях потенциального риска возникновения малярии, преимущественно расположенных в регионах Брестского и Пинского Полесья, на фоне активизации экономических, торговых и культурных связей между странами, усилению процессов миграции населения.

Ключевые слова: малярия, эпидситуация, малярийные комары, факторы риска.

Введение. По данным ВОЗ, в 2015 г. риску малярии подвергались приблизительно 3,2 млрд человек в мире. Большинство случаев заболевания малярией и смерти от нее приходится на Африку к югу от Сахары — 88% случаев заболевания и 90% случаев смерти. Однако Азия, Латинская Америка и в меньшей степени Ближний Восток также подвергаются риску. В 2015 г. передача малярии продолжалась в 97 странах и территориях. Согласно оценкам ВОЗ, в этом году произошло 214 млн случаев заболевания малярией и 438 тыс. случаев смерти [1, 2].

В настоящее время существует пять видов паразитов, которые вызывают малярию у человека, и два таких вида — *Plasmodium falciparum* и *P. vivax* — создают наибольшую угрозу. *P. falciparum* является наиболее распространенным малярийным паразитом на африканском континенте. Он вызывает наибольшее количество случаев смерти, связанных с малярией, во всем мире. *P. vivax* более широко распространен, чем *P. falciparum*, и преобладает во многих странах за пределами Африки [2, 3].

В большинстве случаев малярия передается через укусы самок комаров *Anopheles*. Существует более 400 различных видов комаров *Anopheles*; около 30 являются значимыми переносчиками малярии [4, 5].

ВОЗ призывает сохранять высокий уровень приверженности концепции мира, свободного от малярии. Новая стратегия этой организации направлена на уменьшение к 2030 г. числа случаев заболевания и случаев смерти на 90% по сравнению с нынешними показателями. Так, число случаев заражения малярией в европейском регионе за прошедшие 20 лет сократилось от 90 тыс. до нуля [1, 3, 6, 7].

В последние годы существенно возрос риск завоза и распространения на территории области малярии с последующей реализацией ее местной передачи, что связано с расширением экономических, торговых и культурных связей между государствами, а также активизацией миграционных процессов, происходящих в мире, в которых задействован и пограничный г. Брест.

Цель работы — анализ эпидемиологической ситуации по малярии на территории Брестской области в период ее массового распространения и постликвидационный период с изучением фенологии переносчиков возбудителя и на основании полученных результатов определить факторы риска восстановления местной передачи трехдневной *vivax*-малярии, разработать мероприятия по ее профилактике.

Материалы и методы. Изучение случаев заболеваний малярией проводилось по отчетным данным, архивным материалам, амбулаторным и эпидемиологическим картам, имеющимся в об-

ластом центре гигиены эпидемиологии и общественного здоровья (ГУ «БОЦГЭиОЗ»), организациях здравоохранения области (ОЗ). Анализ маляриогенной обстановки проводился по данным ежегодного системного анализа энтомологической обстановки по населяющим группам паразитических членистоногих, сложившейся на территории Брестской области.

В рамках выявления лиц с симптомами заболевания малярией или паразитоносителей в ОЗ области проводился забор крови. Лабораторная диагностика этой инфекции проводилась стандартным микроскопическим методом на базе клинично-диагностических лабораторий (КДЛ) ОЗ области: исследовались препараты крови — тонкие мазки и толстые капли. Все положительные, сомнительные и 10% отрицательных из просмотренных препаратов крови направлялись для контроля в паразитологическую лабораторию ГУ «БОЦГЭиОЗ».

Для эпидемиологических и энтомологических исследований использовали картографические и статистические методы, демографические данные, отчеты ОЗ.

Результаты и их обсуждение. Ретроспективный анализ 24160 случаев заболеваний малярией с 1948 по 2015 гг. свидетельствовал о наличии двух периодов в эпидемическом процессе данной инфекции на территории области: период ликвидации местной малярии как массового заболевания — 24078 случаев (99,66±0,04%) и постликвидационный — период завозной малярии 82 случая (0,34±0,04%).

Таблица 1. — Распределение случаев заболеваний местной малярии по административным территориям Брестской области в период с 1948 по 1958 гг.

Наименование территорий	Количество случаев	%
г. Брест	1508	6,26±0,02
г. Барановичи	7	0,03±0,01
Барановичский	156	0,65±0,003
Березовский	1253	5,20±0,14
Брестский	551	2,29±0,10
Ганцевичский	315	1,31±0,07
Дрогичинский	1939	8,05±0,17
Жабинковский	774	3,21±0,06
Ивановский	2616	10,86±0,20
Ивацевичский	1260	5,23±0,14
Каменецкий	361	1,50±0,08
Кобринский	2379	9,88±0,19
Лунинецкий	1035	4,30±0,13
Ляховичский	133	0,55±0,05
Малоритский	486	2,02±0,09
г. Пинск	1754	7,28±0,17
Пинский	2264	9,40±0,19
Пружанский	770	3,20±0,11
Столинский	4517	18,76±0,25
Всего	24078	100,0

В период ликвидации местной малярии с 1948 по 1958 гг. было зарегистрировано 24078 случаев заболеваний среди местных жителей на всех административных территориях области с наибольшим их количеством в 1949 г. — 14447 (59,80±0,31%). Один случай местной малярии был выявлен в 1966 г. В период ликвидации малярии наибольшая доля заболевших лиц приходилась на Столинский район — 18,76±0,25%, Ивановский — 10,86±0,20%, Кобринский — 9,88±0,19%, Пинский — 9,40±0,19% и Дрогичинский — 8,05±0,17% (таблица 1). Для данных территорий Пинского и Брестского Полесья, куда относятся эти районы, характерно высокое стояние грунтовых вод — 1–3 м,

протекает река Припять и ее многочисленные притоки (в Кобринском районе — река Муховец и Днепро-Бугский канал), имеется много водоемов, заболоченных территорий, периодически происходит подтопление этих территорий во время весеннего паводка, соответственно, есть условия для размножения различных видов комаров, отмечается их высокая численность. Данные Полесские регионы относятся к более теплой климатической зоне Брестской области [8].

В постликвидационный период (с 1971 по 2015 гг.) на территории области было зарегистрировано 82 завозных случая малярии среди местных граждан и граждан иных государств: из Африки — 19 (23,17±4,66%), в т. ч. из Египта, Конго, Мали, Нигерии, Сьерра-Леоне, Судана; из Евразии — 63 (76,83±4,66%), в т. ч. из Азербайджана, Афганистана, Беларуси (г. Орша), Вьетнама, Пакистана, России (Московской области), Таджикистана (Пянджского и Московского районов). Доля заболеваний завозной *vivax*-малярии доминировала и составила 86,58±3,76%, *falciparum*-малярии — 11,00±3,66%, *ovale*-малярии — 1,22±1,10%, *falciparum*+*malariae*-малярии — 1,20±1,10% (таблица 2).

Таблица 2. — Завозные случаи малярии на территорию Брестской области в период с 1960 по 2015 гг., страны и виды возбудителя

Наименование страны пребывания	Количество случаев		Вид малярии
	абс. число	%	
Африка, n = 19 (23,17±4,66)			
Египет	3	3,66 ±2,07	3 – <i>P. vivax</i>
Конго	2	2,44±2,90	2 – <i>P. falciparum</i>
Мали	1	1,22±1,21	1 – <i>P. vivax</i>
Нигерия	2	2,44±2,90	2 – <i>P. falciparum</i>
Сьерра-Леоне	5	6,10±2,64	5 – <i>P. falciparum</i> 1 – <i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i>
Судан	1	1,22±1,21	1 – <i>P. falciparum</i>
Эфиопия	4	4,88±2,38	1 – <i>P. ovale</i> 3 – <i>P. vivax</i>
Евразия, n = 63 (76,83±4,66)			
Азербайджан	1	1,22±1,10	1 – <i>P. vivax</i>
Афганистан	50	60,97±5,39	50 – <i>P. vivax</i>
Беларусь	1	1,22±1,10	1 – <i>P. vivax</i>
Вьетнам	1	1,22±1,10	1 – <i>P. vivax</i>
Пакистан	2	2,44±2,90	2 – <i>P. vivax</i>
Россия	2	2,44±2,90	2 – <i>P. vivax</i>
Таджикистан	6	7,32±2,88	6 – <i>P. vivax</i>
Не установлено	1	1,22±1,21	1 – <i>P. vivax</i>
Всего 82 случая: 71 (86,68%) — <i>P. vivax</i> ; 9 (10,97%) — <i>P. falciparum</i> ; 1 — <i>P. ovale</i> (1,22%); 1 — <i>P. malariae</i> + <i>P. falciparum</i> (1,22%).			

В период с 1971 по 1981 гг. завоз малярии осуществлялся в основном нашими гражданами во время служебных командировок в ряд африканских стран, с 1982 по 1991 гг. — в Афганистан, с 1990 по 1992 гг. — в южный Таджикистан для прохождения воинской службы. В последующем с 1993 г. и по настоящее время завоз малярии осуществлялся как нашими гражданами, так и жителями эндемичных по малярии стран, доли которых составили 80,0 и 20,0% соответственно. Случаев, связанных с туристическим отдыхом наших граждан, не установлено. Болели малярией только мужчины, возраст которых был от 20 до 54 лет, преимущественно — 45–49 лет (33,3±12,59%). Доля эпидемиологически значимой для области завозной *vivax*-малярии составила в этот период времени 40,0%. На территорию городов области было завезено 77,70±4,60% случаев, сельскую местность — 33,33±5,20%.

Так, в 2002 и 2003 гг. завоз *vivax*-малярии на территорию области был осуществлен гастарбайтерами из Московской области РФ [9]. Местные жители работали в данном регионе и проживали в одном общежитии с выходцами из Азербайджана и Таджикистана — возможными паразитоносителями этой инфекции. В 1998 г. в г. Пинске выявлен вторичный от завозного случай *vivax*-малярии в результате заражения жителя этого города в исправительно-трудовом учреждении Могилевской области, где был впоследствии выявлен паразитоноситель малярии — гражданин Таджикистана.

В двух случаях среди наших граждан заболевание тропической формой малярии закончилось летальным исходом: в одном случае в результате обращения в ОЗ свыше недели от появления первых симптомов (прибыл из Сьерра-Леоне), в другом — из-за необращения по поводу заболевания в ОЗ (прибыл из Конго).

В сезон передачи малярии на территории области выявлено 6 случаев *vivax*-малярии (8,45±3,31%) из 71 завозного случая данной инфекции за последние 20 лет.

Ежегодно в ОЗ области обследуются на малярию более 500 человек, за последние 5 лет таких обследований было 2775, выявлено 4 случая малярии (0,14±0,07%), в т. ч. *vivax*-малярия — 1, *falciparum*-малярия — 3.

На территории области малярийные комары составляют треть представителей семейства *Culicidae* и распространены повсеместно. По результатам исследования по степени маляриогенности 9 районов области (Брестский, Барановичский, Березовский, Дрогичинский, Ивановский, Каменецкий, Кобринский, Пинский и Столинский) отнесены к территориям с высокой степенью потенциального риска передачи малярии и 7 районов — с умеренной (Ганцевичский, Ивацевичский, Жабинковский, Малоритский, Ляховичский, Лунинецкий и Пружанский). Оценка данных территорий проводилась по семи главным критериям (среднесуточная температура воздуха выше +15°C, продолжительность сезона передачи малярии в днях, численность малярийных комаров (в пик численности), потенциальные переносчики, индекс антропофилии, анофелогенная площадь в гектарах, число гонотрофических циклов), по наибольшему числу критериев относящихся к той или иной зоне (низкая, умеренная, высокая). При возникновении спорных вопросов использовались дополнительные критерии (личиночная плотность малярийных комаров (максимальный показатель в сезон), зообарьер, количество зарегистрированных случаев малярии) по такому же принципу. При выборе критериев учитывались условия, определяющие маляриогенность территории (наличие и плотность популяции комаров рода *Anopheles*, восприимчивых к заражению возбудителем малярии человека; температура воздуха, обеспечивающая завершение процесса спорогонии в теле комара; вероятность и частота контакта населения с комарами), многолетний энтомологический мониторинг переносчиков и доступность оценки районирования для практических специалистов [4, 6].

По результатам фенологических наблюдений и ревизии видового состава популяции малярийных комаров, на территории Брестской области переносчиками трехдневной малярии могут быть 4 вида комаров рода *Anopheles*: *An. messeae*, *An. atroparvus*, *An. claviger*, *An. maculipennis*. Так, из потенциальных переносчиков малярии на территории г. Бреста и Брестского района встречаются 4 вида комаров рода *Anopheles*: *An. messeae*, *An. atroparvus*, *An. claviger*, *An. maculipennis*, на территории Кобринского района 3 вида — *An. messeae*, *An. atroparvus*, *An. maculipennis*, на территории Столинского района 2 вида — *An. messeae*, *An. maculipennis* и на территории Ивановского района 1 вид — *An. messeae*. Наибольшее распространение и эпидемиологическое значение как переносчик малярии имеют *An. messeae* и *An. maculipennis*, которые являются эндофильными видами, т. е. концентрируются преимущественно в различных типах убежищ и помещениях (жилые, животноводческие, надворные постройки и др.) [4, 5].

В результате энтомологического мониторинга переносчиков малярии за последние 5 лет было установлено, что в Брестском районе и г. Бресте в сезон 2011 г. сложились благоприятные условия для развития малярийных комаров. На территории района и города увеличилась анофелогенная площадь водоемов, которая составила 19,8 га, что способствовало увеличению численности малярийных комаров. За весь пятилетний период были отмечены самые высокие среднесезонные показатели численности имаго комаров на дневке, численность составила 11,9 экз./м², в сезон передачи малярии (22.06.2011) также отмечался пик численности малярийных комаров с численностью 30 экз./м². Погодные условия сезона 2011 г. (среднесуточная температура выше +15°C составила 123 дня) способствовали завершению цикла спорогонии в теле комара за 14 дней и увеличению сезона переда-

чи малярии до 119 дней (с 9 июня по 5 октября) и присутствию потенциально опасных самок (завершивших полных 3 гонотрофических цикла) в популяции. При наличии источника инфекции они могли представлять эпидемиологическую опасность.

Неблагоприятные годы (2011 и 2014 гг.) в плане возникновения и распространения местных случаев малярии в эпидемический сезон могли быть на территории Столинского района (таблица 3). Высокая численность имаго малярийных комаров (2011 г. — 22,4 экз./м², 2014 г. — 24,5 экз./м²), количество дней со среднесуточной температурой выше +15°C до 140 дней в 2011 г. и до 113 дней в 2015 г. Другие показатели, такие как сезон эффективной заражаемости комаров первой генерации, пришелся на первую и вторую декады июня, и сезон передачи малярии в днях составил 102 дня в 2011 г. и 108 дней в 2014 г. (с 7 июня по 23 сентября) (таблица 3). Сократился срок спорогонии до 12 дней в 2011 г. и в 2014 г. он составил 23 дня. Самки малярийных комаров в сезон 2011 г. могли проделать 3 гонотрофических цикла, а в сезон 2014 г. — 4.

Климатические показатели среднесуточных температур сезона 2014 г. в Кобринском районе способствовали высокой численности малярийных комаров рода *Anopheles* на дневке — 5,75 экз./м², сокращению срока спорогонии до 26 дней, продолжительности сезона передачи малярии до 108 дней (с 11 июня по 26 сентября) и присутствию в популяции эпидемически опасных самок малярийных комаров, проделавших 4 гонотрофических цикла, что в случае завоза в эпидемический сезон возбудителя малярии заболевшими лицами на территорию данного района была возможна местная передача малярии.

На территории Ивановского района в сезон 2011 и 2015 гг. также имелись предпосылки для возникновения и распространения местных случаев малярии в случае ее завоза. В 2011 г. отмечалась высокая численность имаго малярийных комаров 10,72 экз./м², самки малярийных комаров могли проделать до 3 гонотрофических циклов. Сезон передачи малярии продлился с 9 июня по 19 сентября, и количество дней со среднесуточной температурой выше +15°C составило 129. В 2015 г. численность малярийных комаров на дневке не была высокой (2,4 экз./м²), но сезон передачи малярии продлился до 2 октября, сократился срок спорогонии до 20 дней, количество дней со среднесуточной температурой выше +15°C градусов составило 149. На всех административных территориях области самки малярийных комаров могли проделать в сезон от 3 до 4 гонотрофических циклов, что свидетельствует о высокой степени потенциальной опасности популяции.

Таблица 3. — Средне сезонный показатель численности имаго малярийных комаров на дневке, климатические показатели и элементы малярийного сезона в Столинском районе Брестской области за период с 2011 по 2015 гг.

Наименование	Годы				
	2011	2012	2013	2014	2015
Среднесуточная температура выше +15°C	140 дней	128 дней	142 дня	113 дней	119 дней
Численность малярийных комаров на дневке, экз./м ²	22,4 экз.	21,8 экз.	19,8 экз.	24,5 экз.	13,4 экз.
Сезон эффективной заражаемости имаго малярийных комаров первой генерации (продолжительность в днях)	04.06–26.08 (84 дня)	22.05–18.08 (88 дней)	26.04–19.08 (118 дней)	16.05–13.08 (89 дней)	28.05–27.08 (91 день)
Сезон передачи малярии (продолжительность в днях)	15.06–24.09 (102 дня)	19.06–10.10 (113 дней)	09.06–23.10 (136 дней)	07.06–23.09 (108 дней)	16.06–29.09 (105 дней)
Число гонотрофических циклов	3	4	4	4	4

Таким образом, наиболее вероятными территориями с риском возникновения и распространения малярии являются районы, расположенные в Пинском (Столинский, Ивановский, Дрогичинский и Пинский районы, г. Пинск) и Брестском Полесье (Кобринский и Брестский районы, г. Брест), где имеются все предпосылки для распространения этого заболевания в случае завоза возбудителя.

Природные условия данных районов благоприятны для развития многих членистоногих комплекса «гнуса» — значительное количество временных и постоянных водоемов, которые способствуют выплоду кровососущих насекомых в течение всего теплого сезона, наиболее продолжительный период среднесуточных температур выше +15°C, допускающий завершение процесса спорогонии в теле комара, наличие малярийных комаров, восприимчивых к возбудителям малярии, и способность самок доживать до эпидемически опасного возраста, их достаточно высокая численность в сезон передачи малярии и наличие контакта с человеком, продолжительность сезона передачи малярии и наличие населения восприимчивого к заражению [8].

Профилактические мероприятия. Исследование свидетельствует, что основными подходами в профилактике малярии на территории области могут быть мероприятия по выявлению инфицированных людей (заболевших и паразитоносителей) во время их обращения в ОЗ области, в первую очередь, среди групп риска (специалистов-контрактников, вернувшихся из стран Африки и Евразии, студентов, прибывших на учебу, беженцев и мигрантов из эндемичных по малярии стран, гастарбайтеров, находившихся в очаговых по малярии регионах стран СНГ) особенно в эпидемический сезон — с июня по август (в отдельные годы по сентябрь). Необходимо обеспечить раннюю диагностику и своевременную терапию, для чего требуется постоянный резерв примахина для противорецидивного лечения трехдневной малярии, вызванной *P.vivax*, с целью недопущения формирования местных очагов трехдневной малярии и препаратов для лечения хлорохин-устойчивой малярии с целью недопущения летальных исходов от ее тропической формы. Необходимо также постоянно работать над повышением профессионального уровня специалистов ОЗ в вопросах клинической и лабораторной диагностики малярии. Взаимодействие с различными ведомствами и организациями (в т. ч. силовыми) путем комплексного планирования профилактических и противоэпидемических мероприятий на подконтрольной территории может способствовать выявлению иностранных граждан и лиц без гражданства, а также мест их компактного проживания и др.

Широкое информирование населения о возможных рисках заражения малярией, необходимости соблюдения мер личной профилактики во время пребывания в эндемичных по малярии странах может сыграть большую роль в профилактике этой инфекции и недопущению летальных исходов от нее.

Наблюдения за фенологией, контроль численности и видового состава кровососущих двукрылых, картографирование мест выплода и ареалов обитания малярийных комаров является основой энтомологического мониторинга в области. Он позволяет территориальным санитарно-эпидемиологическим учреждениям оперировать достаточным объемом информации о местах выплода кровососущих насекомых для своевременной организации комароистребительных работ, что позволяет предупредить риск заболевания людей этой инфекцией. Основной и наиболее доступной мерой профилактики малярии для населения служит защита от нападения комаров, особенно в периоды их активности (май – июнь), использование репеллентов, москитных сеток для окон, защитной одежды.

Заключение:

1. Ликвидация малярии как массового заболевания завершилась на территории области в 1958 г. В послыквизационный период завоз малярии на территорию области осуществлялся в большинстве случаев из стран Евразии (76,83±4,66%), преимущественно из Афганистана и Таджикистана, доля завозных случаев из стран Африки составила 23,17±4,66%, чаще из Сьерра-Леоне. Среди завозных случаев превалировала *vivax*-малярия (86,58±3,76%), в сезон передачи инфекции было выявлено 6 случаев (8,45±3,31%), местной передачи малярии не установлено.

2. Группой риска заболеваний малярией в послыквизационный период были лица мужского пола в возрасте от 20 до 54 лет, находившиеся в служебных командировках и деловых поездках в эндемичных по малярии странах и прибывшие в область преимущественно на территорию городов (в 77,70±4,60% случая).

3. Малярийные комары распространены повсеместно на территории области и составляют треть представителей семейства *Culicidae*. Переносчиками трехдневной малярии могут быть 4 вида комаров рода *Anopheles*, обитающих в различных районах области: *An. messeae*, *An. atroparvus*, *An. claviger*, *An. maculipennis*. Сезон передачи малярии на территории области возможен только в летние месяцы — с июня по август, в отдельные годы с июня по сентябрь.

4. Преимущественное воспроизводство малярии возможно в регионах, относящихся к более теплой и влажной климатической зоне Брестской области — Брестского и Пинского Полесья, 6 районов которых отнесены к территориям с высокой степенью риска передачи малярии, где имеются условия для размножения различных видов комаров, в т. ч. малярийных, и отмечается увеличение их численности.

5. Климатические изменения, произошедшие в природе за последние годы, создали предпосылки для расширения ареалов переносчиков и возбудителей инфекций, что может привести к обнаружению новых видов малярийных комаров в местностях, где они раньше не встречались.

Литература

1. Ежов, М.Н. Возврат малярии в страны Европейского региона ВОЗ: уроки истории и современная ситуация. Сообщение 2. Средняя Азия / М.Н. Ежов, А.Б. Званцов, В.П. Сергиев // Мед. паразитология. — 2005. — № 1. — С. 26–30.

2. Малярия // Информ. бюлл. ВОЗ. — 2016. — № 94.

3. Лысенко, А.Я. Маляриология / А.Я. Лысенко, А.В. Кондрашин, М.Н. Ежов. — 2-е изд. — Копенгаген: Европ. регион. бюро ВОЗ, 2003. — 510 с.

4. Званцов, А.Б. Переносчики малярии в странах СНГ / А.Б. Званцов, М.Н. Ежов, М.М. Артемьев. — Копенгаген: Европ. регион. бюро ВОЗ, 2003. — 312 с.

5. Mosquitoes of the genus *Anopheles* in countries of the WHO European Region having faced a recent resurgence of malaria. Regional research project, 2003–2007 / M. Gordeev [et al.]. — Copenhagen: WHO/Euro, 2008. — 26 pp.

6. Беляев, А.Е. Практическое руководство по эпидемиологическому надзору за малярией для стран Европейского региона, столкнувшихся с возвратом малярии / А.Е. Беляев, А.Б. Званцов, Т.И. Авдюхина. — 2-е изд. — Копенгаген: Европ. регион. бюро ВОЗ, 2006. — 120 с.

7. Malaria elimination: A field manual for low and moderate endemic countries. — Copenhagen: WHO, 2007.

8. География Брестской области / С.В. Артеменко [и др.]. — Брест, 2002. — С. 101–111.

9. Иванова, Т.Н. Природные и социальные условия, способствующие восстановлению местной передачи трехдневной малярии в Московском регионе / Т.Н. Иванова // Здоровье населения и среда обитания. — 2005. — № 10. — С. 30–33.

EPIDEMIOLOGICAL SITUATION ON MALARIA IN THE BREST REGION AT DIFFERENT TIME PERIODS, RISK FACTORS FOR EMERGING OF LOCAL VIVAX TRANSMISSION

Korzan A.I., Yarets L.N., Gindyuk N.T., Sadovnikova G.V., Podushkina E.A.

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

In Brest region malaria as a mass disease was eradicated in 1958 and at the present time only imported cases of infection is currently registered, including vivax-malaria prevails, which can have epidemiological consequences. Currently, the risk for emerging of local malaria foci is maintained in connection to extension of climate-caused infection areas, high numbers of malaria-carrying mosquitoes and their species diversity in areas of potential risk of malaria, mostly located in the regions of Brest and Pinsk Polesye on the background of the international intensification of economic, trade and cultural relations between countries, as well as enhance the population migration processes.

Keywords: malaria, epidemiological situation, malarial mosquitoes, risk factors, Brest region, Belarus.

Поступила 30.08.2016

ГЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ НОРОВИРУСОВ

Лозюк С.К., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В., Казинец О.Н., Дедюля К.Л., Богуш З.Ф.

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

Реферат. Норовирусы являются сегодня признанными доминирующими возбудителями вспышек острых гастроэнтеритов, что определяет особую актуальность изучения этиологических аспек-

тов норовирусной инфекции. Настоящая работа посвящена анализу результатов молекулярно-эпидемиологического мониторинга норовирусных инфекций в течение 2009–2015 гг. Идентифицировано 9 генотипов норовирусов, периодическая смена которых и появление их новых геновариантов сопровождалось подъемом заболеваемости. Зарегистрированные в 2015 г. эпизоды групповой заболеваемости норовирусной инфекцией были вызваны циркуляцией на территории страны нового геноварианта Kawasaki 2014 генотипа GII.17. Результаты анализа генетической структуры и антигенных характеристик данного возбудителя указывают на его значительный эпидемический потенциал и возможность длительного доминирования в мировом масштабе.

Ключевые слова: норовирусы, молекулярно-эпидемиологический мониторинг.

Введение. В результате широкого внедрения антибиотикотерапии и вакцинопрофилактики, а также совершенствования методов лабораторной диагностики этиологическая структура кишечных инфекций в последние годы претерпела значительные изменения. Они обусловлены увеличением удельной доли инфекций, вызываемых вирусными агентами, в отношении которых отсутствуют специфические средства профилактики и лечения. Большая часть этих агентов относится к группе (+)РНК-вирусов, для которых характерен чрезвычайно высокий уровень генетической изменчивости, лежащий в основе их значительного гено- и фенотипического многообразия. Последнее определяет одновременное существование и быстрое появление множества антигенных вариантов, что, в свою очередь, с одной стороны, является препятствием к формированию устойчивого иммунного ответа в результате естественной иммунизации и, с другой стороны, существенно затрудняет разработку эффективных средств вакцинопрофилактики, позволяющих сдерживать распространение этих вирусных агентов. Кроме того, в современном обществе вследствие технического прогресса и повышения уровня жизни усиливается действие ряда антропогенных факторов, способствующих глобальному распространению наиболее эпидемически значимых геновариантов кишечных вирусов. Все вышеизложенное в полной мере применимо и в отношении Республики Беларусь.

В связи с отсутствием специфических средств лечения и профилактики заболеваний, вызванных рядом РНК-содержащих кишечных вирусов, наиболее эффективной стратегией сдерживания их распространения и снижения заболеваемости является регулярный эпидемиологический надзор за распространением и циркуляцией их возбудителей, основанный на результатах лабораторного контроля и молекулярно-генетических исследований. Он позволяет своевременно выявлять появление и распространение новых эпидемических геновариантов вирусов, способных вызвать значительный подъем заболеваемости, а также вирусную контаминацию объектов окружающей среды, которая может быть причиной вспышек инфекций, вызванных кишечными вирусами.

Норовирусы — одни из наиболее эпидемически значимых возбудителей кишечных инфекций. По своей значимости среди вирусных агентов они уступают только ротавирусам, а в некоторых аспектах формирования эпидпроцесса (по способности вызывать групповую заболеваемость, пищевые вспышки кишечных инфекций) уверенно лидируют. Вместе с тем норовирусы являются одними из наиболее генетически изменчивых кишечных вирусов и все вышеизложенное в полной мере относится к этой группе возбудителей. Исходя из этого, в нашей стране разработана и внедрена система молекулярно-эпидемиологического мониторинга норовирусов, позволяющая точно идентифицировать генотип и эпидемический геновариант возбудителя, отследить его распространение.

Цель работы — анализ полученных с помощью системы молекулярно-эпидемиологического надзора данных о циркуляции различных генотипов норовирусов на территории Беларуси за весь период наблюдения — 2009–2015 гг.

Материалы и методы. Для выделения вирусных нуклеиновых кислот из проб применяли коммерческие наборы «Рибо-преп» («АмплиСенс», РФ) в соответствии с инструкциями по применению. Для постановки реакции обратной транскрипции использовали набор «Риверта-L» («АмплиСенс», РФ), также следуя рекомендациям изготовителя.

Первичную детекцию вируса осуществляли методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческой тест-системы «АмплиСенс ОКИ скрин-FL» («АмплиСенс», РФ) в соответствии с инструкцией производителя. Постановку ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторах RotorGene 6000 (Corbett Life Sciences, Австралия).

Для накопления фрагментов генома вируса с целью секвенирования использовали Diamant HF ДНК полимеразу, 2,5x реакционный буфер «HF», содержащий 0,5 мМ смесь дезоксинуклеотидов и

5 mM раствор $MgCl_2$ (ГНУ «Институт микробиологии НАН Б», РБ). Амплификацию осуществляли с применением взятых из литературных источников праймеров и зондов, синтезированных фирмой PrimeTech (РБ).

Реакцию секвенирования производили с помощью набора «GenomLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit» (Beckman coulter, США). Детекцию результатов осуществляли на приборе SEQ 8 000 (Beckman coulter, США), анализ результатов — в MEGA6 (Тамура, Стечер, Петерсон, Филипски и Кумар 2013).

Молекулярное типирование проводили с помощью программного продукта Norovirus Genotyping Tool Version 1.0, доступного для свободного использования в режиме онлайн по адресу <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>, и BLAST, открытого для свободного использования по адресу <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Результаты и их обсуждение. Регулярный молекулярно-эпидемиологический мониторинг норовирусной инфекции проводится в Беларуси с 2009 г. по настоящее время. По его результатам идентифицировано 9 генотипов норовирусов.

В 2009 г. регистрировалась только спорадическая заболеваемость норовирусной инфекцией. В период сезонного подъема зимой 2009 г. было генотипировано 14 изолятов норовирусов, все они относились к генотипу GII.4, геновариант GII.4 2006b [1]. Данный геновариант был впервые идентифицирован во время вспышки в США в конце 2005 г. — начале 2006 г. и вызвал ряд вспышек на территории США, Европы, Австралии, Японии, Тайваня и Кореи в 2006–2007 гг. С обнаруженным примерно в этот же период GII.4 2006a данный геновариант имел различие в 6,5% в аминокислотной последовательности капсида и 2,6% в последовательности полимеразы. Наибольшее генетическое сходство этот геновариант показал с GII.4 Farmington Hills, обнаруженным в 2002 г., идентичность составила 98,9% в полимеразе и 94,9% в гене капсида [2].

В 2010 г. помимо спорадической заболеваемости было зарегистрировано 2 вспышки норовирусной инфекции, в марте 2010 г. — у взрослых (обследовано 8 пациентов, этиология подтверждена у 87,5%), а в мае 2010 г. — среди подростков (обследовано 15 пациентов, норовирусная этиология подтверждена у 86,6%). В этот период было генотипировано 7 изолятов норовирусов, установлено, что вспышки были вызваны GII.4 New Orleans 2010, спорадические случаи инфекции — рекомбинантным генотипом GII.g-GII.12, также продолжалась циркуляция ранее геноварианта GII.4 2006b. Эпидемический геновариант New Orleans впервые был зарегистрирован в Австралии в 2008 г. и получил глобальное распространение в 2009–2012 гг. Несмотря на такое широкое распространение, данный геновариант не вызвал существенного подъема заболеваемости норовирусной инфекцией, как это имело место при появлении предшествующего геноварианта GII.4 2006b [3]. Важно отметить, что геновариант New Orleans является OPC 1/2 рекомбинантом, получившим одну часть генома (OPC 1) от ранее циркулировавшего геноварианта GII.4 2006a, а другую часть (OPC 2, 3) — от геноварианта GII.4 2008 Appledorn [3].

По результатам филогенетического анализа вирусы, вызвавшие групповую заболеваемость в январе и июле 2012 г., были отнесены к генотипам GII.3 и GII.6. Норовирусы генотипа GII.3, вызвавший групповую заболеваемость в январе 2012 г., ни до, ни после этого не выявлялись на территории Беларуси. Максимальным сходством (98%) с ними обладали вирусы, циркулировавшие в 2010–2011 гг. в Китае и Тайване. Норовирус генотипа GII.6, зарегистрированный в июле 2012 г. в качестве этиологического агента эпидемической норовирусной заболеваемости, — единственный из всех проанализированных нами эпизодов групповой заболеваемости, вызванный геновариантом, активно циркулировавшим в то же время среди населения. Следует отметить, что данный эпизод групповой заболеваемости характеризовался достаточно низким уровнем (33,3%) идентификации норовирусных агентов у обследованных, тогда как в большинстве других эпизодов вирус выявлялись у 60–100% пациентов. Эти данные позволяют предположить, что в этом случае имела место смешанная этиология групповой заболеваемости, а норовирусы были минорными этиологическими агентами [1].

Норовирусы, вызвавшие групповую заболеваемость в июле 2013 г., были рекомбинантами по OPC1/OPC2,3. В литературе описано 2 варианта рекомбинантных геномов, содержащих РНК-полимеразу генотипа GII.g — ркомбинанты с генотипом GII.12 (по VP1) и с генотипом GII.1 (по VP1) [4, 5]. Норовирусы, обладающие рекомбинантным генотипом GII.g-GII.12, циркулировали в разных странах, в т. ч. в Беларуси в 2010–2011 гг. на фоне спорадической заболеваемости, но на

основании анализа нуклеотидной последовательности норовирусные возбудители групповой заболеваемости июля 2013 г. были идентифицированы как рекомбинанты GII.g-GII.1. Известно, что данный геновариант норовирусов вызвал многочисленные вспышки в странах Европы (Бельгия, Германия) в 2010–2012 гг. [4].

В 2012–2014 гг. норовирусная спорадическая заболеваемость была обусловлена двумя эпидемическими геновариантами GII.4 генотипа — GII.4 New Orleans/GII.4 Sydney и GII.4e/GII.4 Sydney. Вариант GII.4 New Orleans 2009 преобладал во всем мире с 2009 г., с ним связано три последовательные крупные эпидемии острых гастроэнтеритов (ОГЭ) в Австралии (2009–2011 гг.). Вариант GII.4 Sydney-2012 был впервые выявлен в марте 2012 г. в Австралии и вытеснил GII.4 New Orleans. Он вызвал 30% вспышек ОГЭ в Сиднее в 2012 г., а также в других странах (Новая Зеландия, Япония, Франция, Гонконг и США). Последовательность ORC1 у GII.4 Sydney-2012 была получена из GII.4 Osaka 2007, а ORC3 из GII.4 New Orleans или их общего предка по этому региону GII.4 2008 Appledorn [6, 7].

Резкий подъем групповой заболеваемости в 2015 г. был обусловлен появлением на территории Беларуси нового генотипа норовирусов — GII.17. В этот период было зарегистрировано 6 эпизодов групповой заболеваемости ОГЭ в закрытых коллективах, количество заболевших составило более 200 человек. По результатам лабораторной диагностики этиологическими агентами всех эпизодов данной групповой заболеваемости оказались норовирусы. В процессе их генотипирования было установлено, что этиологическим агентом 5 эпизодов был генотип GII.17, один эпизод был связан с генотипом GI.3.

По литературным данным, генотип GII.17 впервые был зарегистрирован в 2014–2015 гг. в странах Азии, где вызвал значительный подъем заболеваемости. В связи с активным распространением он стал предметом детального изучения специалистов различных стран. Установлено, что генотип GII.17 характеризуется изменениями антигенной структуры, позволяющими ему ускользать от распознавания иммунной системой, а также высокой скоростью мутаций, что в совокупности определяет его высокий эпидемический потенциал.

Следует отметить, что генотип GII.17 не регистрировался на территории нашей страны в течение предшествующего периода наблюдения (с 2009 по 2014 гг.). Для установления времени его появления проведено ретроспективное молекулярное типирование норовирусов, вызвавших спорадическую заболеваемость в 2015 г. С этой целью проанализирован поступивший в течение предшествующего периода (до сентября 2015 г.) в Республиканскую референс-лабораторию диагностики кишечных вирусных инфекций и санитарной вирусологии клинический материал от 131 пациента с подозрением острого норовирусного гастроэнтерита ($n = 131$). У половины из числа этих пациентов норовирусная инфекция была подтверждена лабораторно. По результатам молекулярного типирования обнаруженных возбудителей в 1-м полугодии 2015 г. в г. Минске циркулировали норовирусы 2-х геновариантов — GII.4 New Orleans-GII.4 Sydney и GII.4e-GII.4 Sydney (40 и 60% соответственно). Полученные данные свидетельствовало о том, что циркуляция генотипа GII.17 до сентября 2015 г. на территории Беларуси не регистрировалась. Таким образом, стало очевидно, что резкий рост групповой заболеваемости осенью 2015 г. был обусловлен появлением нового для населения Беларуси генотипа норовирусов — GII.17.

Появление нового генотипа норовирусов, обладавшего значительным эпидемическим потенциалом, диктовало необходимость дальнейшего мониторинга его распространения на территории страны. Для этого были проанализированы 62 пробы клинического материала (фекалии), полученные от пациентов с симптомами ОГЭ на территории Минской, Гродненской, Брестской и Могилевской областей. В ходе данных исследований норовирусы были обнаружены в 85% поступивших проб. По результатам их молекулярного типирования установлено, что на территории Минской области 100% исследованных проб содержали норовирусы генотипа GII.17. В Гродненской области циркулировали норовирусы генотипов GII.17 (50%), GII.4 (33%) и GII.7 (17%), в Брестской области — генотипов GII.Pe (67%), GII.4 (16,5%) и GII.21 (16,5%), в Могилевской области — генотипов GII.Pe (50%) и GII.4 (50%).

Заключение. Минимальное генетическое разнообразие было более выражено в годы, когда появлялся новый более эпидемически активный вариант вируса, вызывающий подъем заболеваемости. Так, наблюдался подъем групповой заболеваемости осенью 2015 г., вызванный новым ге-

новариантом Kawasaki 2014 генотипа GII.17, который преобладал в этот год на территории страны и продолжает распространяться. Результаты анализа генетической структуры и антигенных характеристик генотипа GII.17 указывают на его значительный эпидемический потенциал и возможность длительного доминирования в мировом масштабе. В этой связи крайне актуальным является осуществление регулярного молекулярно-эпидемиологического мониторинга норовирусной инфекции, первым и важным этапом которой является генодиагностика регистрируемой заболеваемости острыми кишечными инфекциями и острыми гастроэнтеритами. Для этого в нашей стране имеется все необходимое: соответствующие инструктивно-методические документы [8, 9] и диагностическая тест-система для выявления норовирусов II геногруппы методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции «НоВ II-ПЦР» (ГУ ВУ 100558032.375-2016), которая способна эффективно обнаруживать все известные на сегодняшний день генотипы норовирусов.

Литература

1. Групповая заболеваемость норовирусными гастроэнтеритами в республике Беларусь и молекулярная эпидемиология возбудителей / Н.В. Поклонская [и др.] // Мед. новости. — 2013. — № 12. — С. 78–82.
2. Yang, Z. Complete genome sequence of human norovirus GII.4_2006b, a variant of Minerva 2006 / Z. Yang, M.K. Mammel, M. Kulka // Genome Announc. — 2016. — Vol. 4, № 1. — pii: e01648-15. — doi: 10.1128/genomeA.01648-15.
3. Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII.4 variant 2006a and 2006b / E.T.V. Tu [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2008. — Vol. 46, № 3. — P. 413–420.
4. New norovirus classified as a recombinant GII.g/GII.1 causes an extended foodborne outbreak at a university hospital in Munich / D. Hoffmann [et al.] // J. Clin. Virol. — 2013. — Vol. 58, № 1. — P. 24–30.
5. Vega, E. Novel GII.12 norovirus strain, United States, 2009-2010 / E. Vega, J. Vinjé // Emerg. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 17, № 8. — P. 1516–1518.
6. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage / J. Eden [et al.] // J. Virol. — 2013. — Vol. 87, № 11. — P. 6270–6282.
7. Advance for Recombination between pandemic GII.4 norovirus stains New Orleans 2009 and Sydney 2012 / V. Martella [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2013. — Vol. 51, № 11. — P. 3855–3857.
8. Лабораторная диагностика вирусных острых кишечных инфекций: инструкция по применению № 111-1210: утв. М-вом здравоохран. Респ. Беларусь 10.12.2010.
9. Алгоритм лабораторной диагностики норовирусной инфекции: инструкция по применению № 014-1213: утв. М-вом здравоохран. Респ. Беларусь 23.03.2014.

GENOTYPE COMPOSITION OF NOROVIRUSES CIRCULATING IN BELARUS

*Laziuk S.K., Poklonskaya N.V., Amvrosieva T.V., Kazinets O.N., Dedyulya K.L., Bogush Z.F.
State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology",
Minsk, Republic of Belarus*

Noroviruses are now recognized as the dominant agents of outbreaks of acute gastroenteritis that determines the urgency of studying the etiological aspects of norovirus infection. This work presents the results of molecular epidemiological monitoring of norovirus infection in the Republic Belarus since 2009 to 2015. By results of investigations for this period 9 genotypes of noroviruses have been identified. The results of laboratory assay and molecular epidemiological monitoring of norovirus infections in 2015 allowed to decipher the 6 episodes of group morbidity caused by the appearance on the territory of Belarus the new GII.17 genotypes. Analysis of the genetic structure and antigenic characteristics of the pathogen indicates its significance epidemic potential and the possibility of long-term dominance in the world.

Keywords: noroviruses, epidemiological monitoring.

Поступила 17.08.2016

РАЗЛИЧИЯ В ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В г. МИНСКЕ И ОБЛАСТЯХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Полякова Н.В.¹, Семейко Г.В.², Самойлович Е.О.², Бискина Н.М.³

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

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

³Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»,
Минск, Республика Беларусь

Реферат. Результаты ретроспективного эпидемиологического анализа ротавирусной инфекции (РВИ) в Республике Беларусь свидетельствуют о том, что заболеваемость характеризуется тенденцией к росту как в столице, так и в областях страны. Однако среднесезонные показатели заболеваемости РВИ в г. Минске существенно (в 1,5–10 раз) выше, чем в других регионах страны. Анализ внутригодовой динамики заболеваемости за 2008–2015 гг. выявил, что сезонный подъем РВИ в регионах с низкой заболеваемостью (Брестская, Витебская, Гомельская и Гродненская области) начинался в январе — на месяц позже, чем в регионах с более высокой заболеваемостью (г. Минск, Могилевская область), и был менее интенсивным. Отсутствие зарегистрированных случаев РВИ в отдельные месяцы сезонного подъема в некоторых областях с низкой заболеваемостью скорее всего указывает на имевшие место проблемы с лабораторной диагностикой инфекции. Генотипирование ротавирусов, циркулировавших в эпидемический сезон 2014 г., показало, что наибольшее генетическое разнообразие ротавирусов (6 генотипов) отмечалось в регионах с наиболее высокой заболеваемостью. Удельный вес генотипа G4P [8] был наибольшим, а генотипа G1P [8] наименьшим в регионах с наиболее высокой заболеваемостью.

Ключевые слова: ротавирусная инфекция, эпидемиологический анализ, циркулирующие генотипы ротавирусов.

Введение. Острые кишечные инфекции (ОКИ) представляют одну из серьезных проблем здравоохранения. По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется 1,7 млрд случаев ОКИ [1]. Для Республики Беларусь эта проблема также является актуальной, о чем свидетельствует тенденция к росту заболеваемости в последнее десятилетие (от 105,3 на 100 тыс. населения в 2006 г. до 135,4 в 2015 г.). Значительное улучшение лабораторной диагностики в последние годы привело к снижению доли возбудителей неустановленной этиологии в структуре ОКИ и, как следствие, повышению доли возбудителей вирусной этиологии, среди которых на ротавирусы в отдельные годы приходилось до 90%. Согласно исследованиям, проведенным в различных странах мира, частота выявления гастроэнтерита ротавирусной этиологии среди госпитализированных по поводу ОКИ детей колеблется от 20,0 до 87,0%, что свидетельствует о том, что ротавирусная инфекция является одной из наиболее распространенных кишечных инфекций среди детского населения в возрасте до 5 лет [2]. В нашей стране ежегодно выявляется 3–5,5 тыс. заболевших РВИ, однако уровни заболеваемости в различных регионах республики отличаются более чем в 10 раз. Значительная разница в показателях заболеваемости РВИ в столице и областях страны ставит вопрос о наличии как субъективных, так и объективных причин ее существования.

Цель работы — ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости РВИ в различных регионах Республики Беларусь (2008–2015 гг.) и изучение особенностей генотипического пейзажа циркулирующих ротавирусов.

Материалы и методы. Изучение проявлений эпидемического процесса РВИ в Республике Беларусь проводили по данным официальной статистики на основе ретроспективного эпидемиологического анализа заболеваемости с 1996 г. по 2015 г. Анализ внутригодовой динамики заболеваемости в 7 регионах страны (Брестская, Витебская, Гомельская, Гродненская, Минская и Могилевская области, г. Минск) проводили по среднесезонным данным за 2008–2015 гг.

Для изучения генетического разнообразия ротавирусов, циркулирующих в различных регионах страны в эпидемический сезон 2014 г., было отобрано 210 позитивных на ротавирус проб. Выявление антигена ротавируса в образцах стула проводили с использованием иммуноферментной тест-системы «РОТА-АГ» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (РБ). РНК ротавиру-

сов выделяли из 10% суспензии стула с использованием набора 5X MagMAX-96 Viral Isolation kit (Ambion, США) на автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот MagMAX Express (Applied Biosystems, США). Генотипирование ротавирусов проводили с помощью полугнездовой мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) согласно описанной методике [3, 4].

Проверку статистических гипотез проводили с использованием параметрических (t-критерий Стьюдента) и непараметрических (Фишера) критериев при 5%-м уровне значимости нулевой гипотезы. Для обработки данных использовали электронные таблицы платформ Microsoft Excel 2010.

Результаты и их обсуждение. Диагностика РВИ в Республике Беларусь проводится с 1993 г., а официальная регистрация была начата в 1996 г. За первые десять лет, по данным статистической отчетности, показатель заболеваемости ротавирусным ОГЭ увеличился в 5 раз: с 6,3 на 100 тыс. населения в 1996 г. до 31,6 — в 2006 г. Существенный рост заболеваемости в данный период объясняется повышением качества и охвата лабораторной диагностикой инфекции, что привело к снижению доли возбудителей неустановленной этиологии в структуре ОКИ и существенно повысило долю возбудителей вирусной этиологии, включая ротавирусы.

Ретроспективный эпидемиологический анализ РВИ в следующее десятилетие (2006–2015 гг.) показал, что заболеваемость ротавирусным ОГЭ сохраняет выраженную тенденцию к росту (Тпр = +13,5%; $p < 0,05$), однако в отличие от 1996–2005 гг. максимальные и минимальные показатели в данный период отличались только в 2 раза (27,3 на 100 тыс. населения в 2007 г. и 55,4 — в 2015 г.) (рисунок 1).

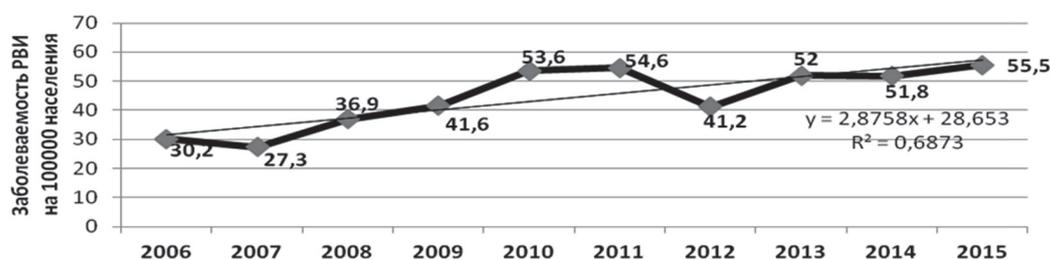


Рисунок 1. — Динамика заболеваемости населения РВИ в Республике Беларусь в 2006–2015 гг.

Сравнительный анализ многолетней динамики заболеваемости в г. Минске и регионах Республики Беларусь за 2008–2015 гг. свидетельствует о существовании значительных (в 1,5–10 раз) различий в уровне регистрируемой заболеваемости в столице и областях страны. Несмотря на то, что в 2008–2015 гг. во всех регионах отмечается тенденция к росту заболеваемости ротавирусным ОГЭ (Тпр от +1,72% в Гродненской области до +30,3% — в Витебской; $p < 0,05$), а в г. Минске эпидемическая ситуация остается стабильной (Тпр = +0,95%; $p < 0,05$), средне-многолетние показатели заболеваемости остаются самыми высокими в столице республики и в Могилевской области (111,3 и 79,9 на 100 тыс. населения соответственно), самыми низкими — в Гомельской и Минской областях (14,2 и 16,5 на 100 тыс. населения соответственно) (рисунок 2).

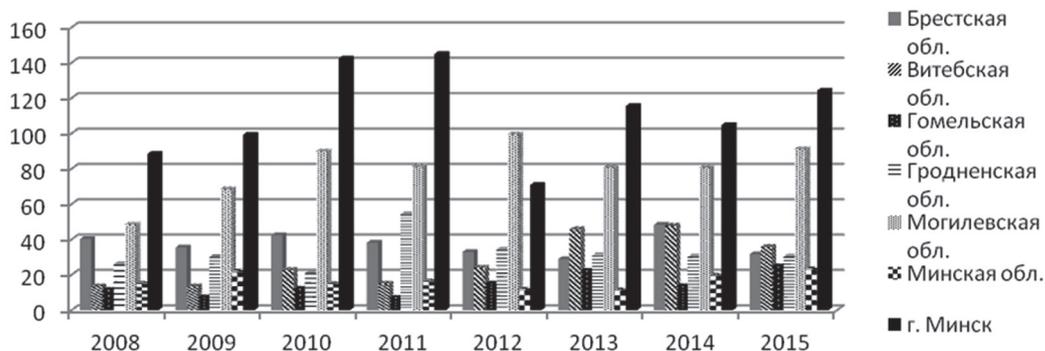


Рисунок 2. — Показатели заболеваемости РВИ в различных регионах Республики Беларусь в 2008–2015 гг.

Значительные различия в показателях заболеваемости могут объясняться несколькими причинами. Согласно данным национального статистического комитета Республики Беларусь, на долю сельского населения областей страны приходится одна треть жителей. Эта часть населения, как правило, имеет более ограниченный доступ к медицинской помощи по сравнению с городским населением. Учитывая, что клинические проявления ротавирусного ОГЭ могут варьировать от тяжелых до легких форм, а у детей первого полугодия жизни и взрослых протекать даже в бессимптомной форме [5], в сельской местности может существенно снижаться обращаемость пациентов со слабо выраженной симптоматикой.

Ротавирусный ОГЭ имеет клинические симптомы, трудно дифференцируемые от других ОКИ, поэтому для постановки диагноза и регистрации случаев заболевания необходимо лабораторное подтверждение ротавирусной этиологии диареи. Как известно, отличительной особенностью РВИ для стран с умеренным климатом является зимне-весенняя сезонность инфекции [6]. В Республике Беларусь до 75% случаев инфекции, выявляемых в течение года, выявляется с декабря по май [7]. Отсутствие или недостаток тест-систем в региональных лабораториях в период сезонного подъема заболеваемости может привести к существенному снижению числа регистрируемых случаев РВИ. Несмотря на то, что для выявления антигена ротавируса в пробах стула во всех регионах страны используются одни и те же отечественные иммуноферментные тест-системы (производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии), результаты анализа сезонного распределения заболеваемости РВИ позволяют предположить существование определенных проблем с их наличием в регионах. Так, анализ данных официальной регистрации свидетельствует о том, что в некоторых областях страны в отдельные месяцы сезонного подъема заболеваемости РВИ не регистрировалась вовсе (в частности, в 2010 и 2015 гг. в Гродненской, Гомельской и Витебской областях). Такая ситуация не могла не отразиться на показателях заболеваемости в данных регионах. Анализ среднесезонной годовой динамики заболеваемости РВИ показал, что в областях с более низкими ее показателями (Брестская, Витебская, Гомельская и Гродненская) сезонный подъем инфекции, согласно данным официальной регистрации, начинался только в январе — на месяц позже по сравнению с г. Минском и Могилевской областью (рисунок 3).

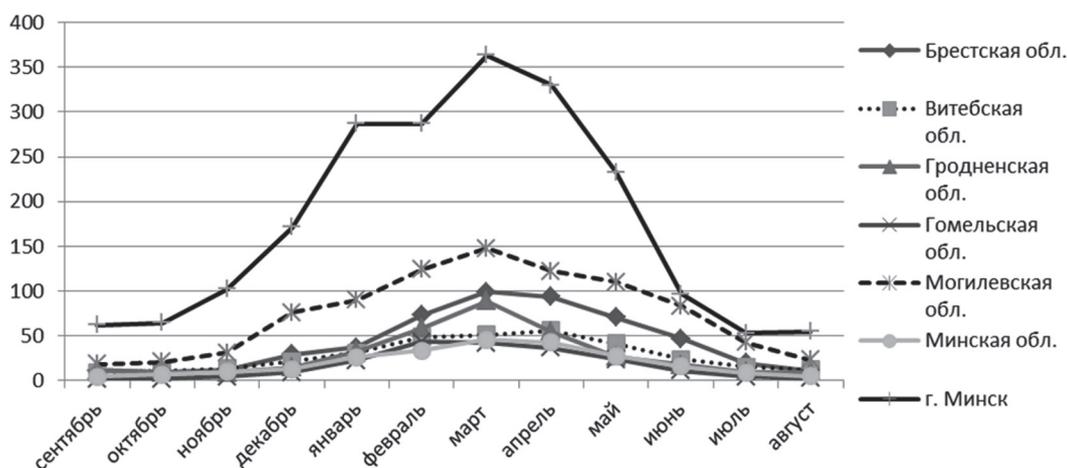


Рисунок 3. — Сезонность РВИ в регионах Республики Беларусь с низкой и высокой заболеваемостью по среднесезонным данным в 2008–2015 гг.

По данным многочисленных исследований известно, что существуют географические различия в распространенности ротавирусов различных генотипов, а генетические варианты, ранее считавшиеся редкими, получают широкое распространение. Так, генотип G12, впервые выявленный на Филиппинах в 1987 г., еще некоторое время назад встречался лишь в африканском регионе, теперь входит в число шести наиболее распространенных в Европе, а в 2014 г. впервые был выявлен в г. Минске [8].

Характерное для РВИ наличие спадов и подъемов заболеваемости также часто связано со сменой доминирующих генотипов и появлением новых, ранее не циркулировавших в популяции, G[P]-комбинаций.

В проведенных ранее исследованиях было установлено, что наибольшее генетическое разнообразие ротавирусов и циркуляция редких генотипов (G12P[8], G3P[9]) в г. Минске выявляется в сезонный подъем заболеваемости, тогда как в межсезонный период генотипический пейзаж был представлен типичными для региона вариантами (G4P[8], G3P[8], G1P[8], G2P[4]) [9]. Таким образом, сезонный подъем инфекции и, соответственно, рост заболеваемости может быть связан с распространением в популяции большего числа генетических вариантов возбудителя.

Нами было проведено генотипирование 210 ротавирусов, циркулировавших в эпидемический сезон 2014 г. в различных регионах страны. По результатам мультиплексной полугнездовой ОТ-ПЦР было установлено, что наибольшее генотипическое разнообразие ротавирусов в разгар инфекции было в регионах с самой высокой заболеваемостью — в г. Минске и Могилевской области, в которых циркулировало шесть (G4P[8], G1P[8], G2P[4], G9P[8], G12P[8] и G3P[9]) и пять генотипов ротавирусов (G4P[8], G3P[8], G1P[8], G2P[4] и G3P[9]) соответственно. В областях со значительно меньшими среднегодовыми показателями заболеваемости сезонный подъем РВИ был обусловлен вирусами четырех генотипов в Брестской (G4P[8], G3P[8], G1P[8], G2P[4]) и Гродненской (G4P[8], G3P[8], G1P[8], G2P[4]) областях и трех — в Витебской (G4P[8], G1P[8], G2P[8]) и Гомельской (G4P[8], G3P[8], G2P[4]) (рисунок 4).

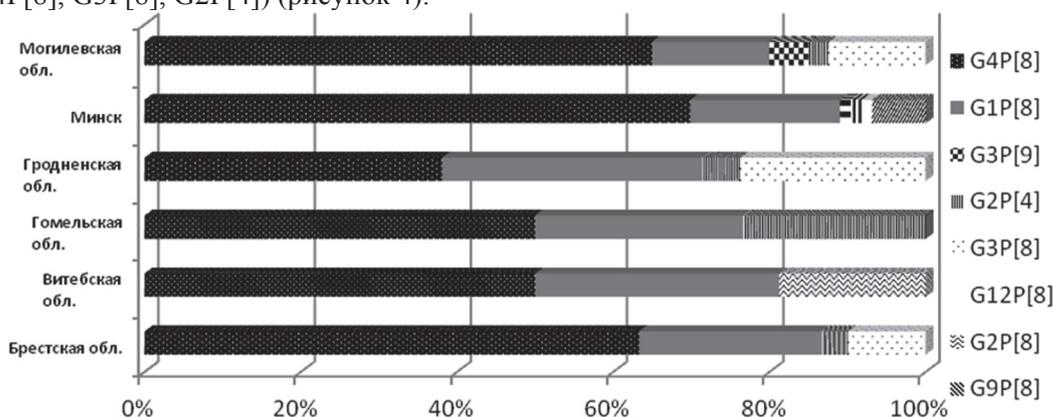


Рисунок 4. — Генотипическое разнообразие ротавирусов, циркулировавших в эпидемический сезон 2014 г. в Республике Беларусь

Во всех регионах Республики Беларусь в эпидемический сезон РВИ были идентифицированы генотипы G4P[8] и G1P[8], на долю которых в стране в целом пришлось 82,3±2,6%. Распространение других G[P]-комбинаций ограничивалась рамками нескольких или одного региона, а их удельный вес был значительно ниже. Интересным являлся тот факт, что в г. Минске и Могилевской области, где регистрируются самые высокие среднегодовые показатели заболеваемости, доля генотипа G1P[8] была в 1,5 раза ниже (17,6±3,2%) по сравнению с Брестской, Витебской, Гомельской и Гродненской областями (27,8±4,2%). Удельный вес генотипа G4P[8] был, наоборот, тем больше, чем выше была заболеваемость в регионе. Так, в г. Минске, Могилевской и Брестской областях данным генотипом было обусловлено 69,8±5,4; 65,0±7,5 и 63,3±8,8% заболеваемости соответственно, по 50,0±8,2% в Витебской и Гомельской областях и 38,0±8,4% — в Гродненской. Таким образом, чем выше был уровень заболеваемости в регионе, тем большим было генетическое разнообразие идентифицируемых ротавирусов и доля генотипа G4P[8] и тем ниже удельный вес ротавирусов генотипа G1P[8].

Заключение. Существенные различия в показателях заболеваемости РВИ в различных регионах Республики Беларусь на фоне тенденции к росту заболеваемости в стране могут быть обусловлены рядом причин. Основные из них — это различия в доступности медицинской помощи для городского и сельского населения страны, разный уровень организации лабораторной диагностики инфекции, различия в генотипическом пейзаже циркулирующих ротавирусов.

Литература

1. Еженедельный эпидемиологический бюллетень [Электронный ресурс] / ВОЗ. — 2013. — № 5. — Режим доступа: http://www.who.int/immunization/documents/WHO_PP_rotavirus_2013_RU.pdf?ua=1. — Дата доступа : 04.08.2016.

2. Multicenter prospective study of the burden of rotavirus acute gastroenteritis in Europe, 2004–2005 / P. Van Damme [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2007. — Vol. 195, suppl. 1. — P. 4–16.
3. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens / V. Gouvea [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 1990. — Vol. 28, № 2. — P. 276–282.
4. 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.
5. Molecular epidemiology of rotavirus infection in a room for convalescing newborns / P.A. Vial [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 1988. — Vol. 157, № 4. — P. 668–673.
6. Global seasonality of rotavirus infections / S.M. Cook [et al.] // *Bull. WHO.* — 1990. — Vol. 68, № 2. — P. 171.
7. Полякова, Н.В. Особенности эпидемического процесса ротавирусной инфекции в г. Минске в 2014 г. / Н.В. Полякова, Г.В. Семейко, Е.О. Самойлович // *Новые исследования молодых ученых 2015: сб. науч. работ.* — Минск, 2015. — С. 124–132.
8. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses / M. Rahman [et al.] // *J. Virol.* — 2007. — Vol. 81, № 5. — P. 2382–2390.
9. Генотипический пейзаж ротавирусов — этиологических агентов острых гастроэнтеритов у детей в г. Минске в 2012–2013 гг. / Н.В. Полякова [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика.* — 2014. — Т. 17. — С. 19–23.

REASONS OF THE DIFFERENT INCIDENCE RATE OF ROTAVIRUS INFECTION IN MINSK CITY AND REGIONS OF BELARUS

Polyakova N.V.¹, Semeiko G.V.², Samoilovich E.O.², Biskina N.M.³

¹*Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus;*

²*State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus;*

³*State Institution “Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health”, Minsk, Republic of Belarus*

The results of the retrospective epidemiological analysis of rotavirus infection (RVI) in Belarus indicate that the incidence of infection increases, both in the capital and in the regions of the country. But rate of the incidence of RVI is higher significantly (1.5–10 times) in Minsk city, than in other regions of the country. The results of the study revealed that the seasonal rise of RVI began a month later in regions with low incidence rate (Brest, Vitebsk, Gomel and Grodno oblasts), than in regions with a high incidence (Minsk, Mogilev region). The absence of reported cases of RVI in some months of the seasonal rise in some regions with a low incidence of RVI reveals some problems with the laboratory diagnosis of infection. Genotyping of rotavirus circulating in the seasonal rise of 2014 suggests that the greatest genetic diversity of rotaviruses (6 genotypes) was observed in the regions with the highest incidence of RVI. The proportion of genotype G4P[8] was the highest and genotype G1P[8] was the lowest in the regions with the highest level of disease.

Keywords: rotavirus infection, epidemiological analysis, genotypic landscape.

Поступила 04.08.2016

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ЛИХОРАДКЕ ЗИКА В МИРЕ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

*Самойлова Т.И., Горбунов В.А., Шиманович В.П.,
Красько А.Г., Рустамова Л.М., Петкевич А.С., Аблова Т.А.*

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

Реферат. Вирус Зика (ВЗ), впервые обнаруженный в 1947 г. при изучении желтой лихорадки в Уганде, оставался в относительной неизвестности в течение почти 70 лет, а затем в течение всего 1 года был занесен в Бразилию с островов Тихого океана и быстро распространился по всей Америке. За последние более чем 50 лет вирус впервые стал причиной такого массового инфекционного заболевания, связанного с увеличением числа случаев микроцефалии и других нарушений центральной

нервной системы у новорожденных. Всемирная организация здравоохранения объявила инфекцию, вызванную ВЗ, как чрезвычайную, имеющую международное значение для общественного здравоохранения. Учитывая масштабы распространения инфекции, серьезные и долгосрочные ее последствия во время беременности и для пострадавшего населения, необходимо быстрое реагирование глобального общественного здравоохранения и научных исследований для ограничения и предотвращения этих последствий путем разработки терапевтических средств, вакцин и улучшенной диагностики. В данном обзоре представлена информация о текущем понимании эпидемиологии, передаче, диагностике и прогнозе в отношении вирусной инфекции Зика.

Ключевые слова: вирус Зика, лихорадка Зика, эпидемиология, диагностика, профилактика.

Введение. Инфекция, вызываемая вирусом Зика (ВЗ; англ. — *Zika virus*, ZIKV), или лихорадка Зика (ЛЗ), ранее не создавала проблему для общественного здравоохранения, вызывая лишь незначительное повышение температуры, сыпь и артралгию у 20% заболевших, при этом у 80% инфицированных болезнь протекает бессимптомно [1]. И лишь начиная с 2007 г., ВЗ вызвал крупные вспышки на островах Тихого океана (особенно на острове Яп в 2007 г. и во Французской Полинезии в 2012–2014 гг.), а в 2015–2016 гг. крупные вспышки были зарегистрированы в Центральной и Южной Америке (особенно в Бразилии). ВОЗ обращает внимание органов здравоохранения многих стран на стремительное эпидемическое распространение ЛЗ. На 01.02.2016 случаи заболевания ЛЗ были зарегистрированы в 27 странах Североамериканского, Южноамериканского и Азиатско-тихоокеанского регионов (Бразилия, Колумбия, Эквадор, Сальвадор, Мексика, Панама, Парагвай, Венесуэла и др.), в результате чего ВОЗ объявила данную ситуацию чрезвычайной в области общественного здравоохранения и имеющую международное значение [2]. Усиленные научные исследования позволили выявить общепринятую к настоящему времени причинную связь между ВЗ и значительным увеличением неврологических нарушений, включая микроцефалию и синдром Гийена–Барре (СГБ), зарегистрированных в этих регионах.

По оценкам экспертов, более 2 млрд человек проживают в регионах, благоприятных для передачи ВЗ (т. е. находящихся под угрозой эпидемии), с прогнозом инфицирования на 2016 г. для Северной и Южной Америки около 4 млн человек. Больше всего случаев заболевания выявляется в Бразилии, где уже зафиксировано около 2 тыс. случаев микроцефалии и неврологических нарушений у новорожденных. В 22 европейских государствах, а также в России отмечены завозные случаи инфекции Зика [3–5]. Массовое распространение ВЗ, как и других тропических инфекций, в Республике Беларусь в настоящее время маловероятно ввиду отсутствия специфических переносчиков. Однако случаи завоза вируса Зика из эндемичных стран исключить нельзя, что обуславливает необходимость принятия превентивных мер, в т. ч. наличие современных методов для своевременного и эффективного выявления возбудителей тропических инфекций в пробах пациентов.

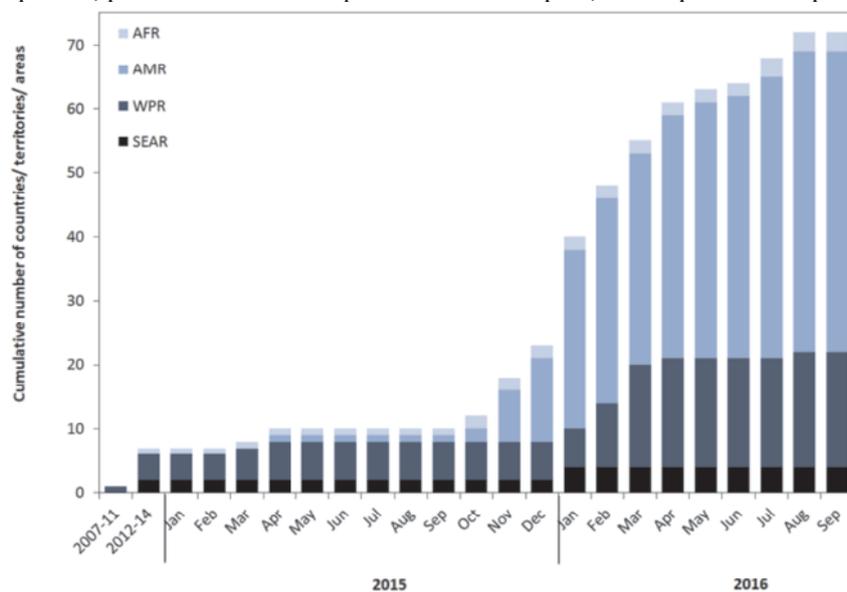
Цель работы — эпидемиологическая оценка сложившейся ситуации по распространению ВЗ в мире, с учетом масштабов и серьезности последствий инфекции во время беременности разработка стратегии и тактики быстрого реагирования в ответ на возможные завозные случаи ВЗ. Для этого были использованы доступные источники информации с сайтов ВОЗ, Европейского центра контроля и профилактики болезней (ECDC), Панамериканской организации здравоохранения (ПАНО), Центров контроля болезней США (CDC), Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия населения (Роспотребнадзор), профессиональной базы данных научной информации Национальной медицинской библиотеки и Национального института здравоохранения США (PubMed) и др. Примечательно, что из 1064 статей о вирусе Зика (ключевое слово «*Zika virus*»), найденных в базе данных PubMed (по состоянию на 18.08.2016), только 52 были опубликованы в период с 1952 (первая публикация по обнаружению вируса) [6] по 2009 гг. (публикация о первой зарегистрированной вспышке за пределами Африки и Азии) [1], а 940 были опубликованы в 2016 г.

Эпидемиология. Вирус Зика — это арбовирус из семейства *Flaviviridae*, переносимый комарами рода *Aedes spp.*, был выделен из нескольких видов комаров этого рода (*A. aegypti*, *A. africanus*, *A. apicoargenteus*, *A. furcifer*, *A. hensilli*, *A. luteocephalus* и *A. vittatus*). Специалисты не исключают вероятность того, что вирус может адаптироваться и к *A. albopictus*, которые распространены в США гораздо больше, нежели остальные виды. Инкубационный период в комарах составляет примерно 10 дней. Резервуары вируса, как правило, обезьяны и люди. Пути передачи — трансмиссивный, по-

ловой, контактный, вертикальный, гемоконтактный; у пациентов с иммунодефицитами может наблюдаться аспирационная передача вируса [7–14].

Вирус был впервые обнаружен у макак-резус в лесу Зика в Уганде в 1947 г. в рамках мониторинга лесной формы желтой лихорадки [6]. Первые доказательства того, что ВЗ может инфицировать людей, были получены на основании данных серологических исследований, проведенных в Уганде [15]. Затем были зарегистрированы спорадические случаи инфицирования человека во всей Африке и некоторых частях Юго-Восточной Азии, но первая крупная вспышка ВЗ была зарегистрирована в 2007 г. на острове Яп в Микронезии, в течение которой было инфицировано более 73% от общей численности населения [1].

Начиная с 2007 г., ВЗ продолжает свою миграцию на восток: в 2012–2014 гг. он обнаружен во Французской Полинезии, в 2014 г. — на острове Пасхи (Чили) [16] и в 2015 г. — в Бразилии, где зарегистрировано до 1,5 млн случаев инфицирования вирусом Зика [18, 19]. Регистрация передачи ВЗ к настоящему времени документально подтверждена в 72 странах и территориях, а с 2015 г. — в 55 странах и территориях, где ранее ВЗ не обнаруживался, были зарегистрированы первые вспышки. На рисунке 1 представлена динамика совокупного числа стран и территорий по регионам ВОЗ, сообщивших о регистрации передачи вируса Зика через комаров в 2007–2014 гг., а также ежемесячно с 1 января 2015 г. по 31 августа 2016 г., а в таблице 1 представлены эти данные с более подробной информацией по странам, регионам и классификацией категорий, к которым эти страны отнесены [19].



AFR — страны Африки; AMR — страны Америки; WPR — страны западной части Тихого океана; SEAR — страны Юго-Восточной Азии

Рисунок 1. — Совокупное число стран и территорий по регионам ВОЗ, сообщивших о регистрации передачи вируса Зика через комаров в 2007–2014 гг., а также ежемесячно с 1 января 2015 г. по 31 августа 2016 г.

В настоящее время ВОЗ классифицирует пораженные страны по 3 основным категориям, определение которых приведено ниже.

Категория 1 — страны, впервые зарегистрировавшие вспышку с 2015 г.:

- лабораторно подтвержден автохтонный, передаваемый комарами случай ЛЗ в районе, где в прошлом (до 2015 г.) не было свидетельств циркуляции вируса, будь то обнаруженный и зарегистрированный случай в самой стране или диагностирован у вернувшихся путешественников в другом государстве-участнике, или

- лабораторно подтвержденный, автохтонный, передаваемый комарами случай вирусной инфекции Зика в районе, где ранее передача была прервана. Предполагается, что размер восприимчивой популяции достиг уровня, вновь обеспечивающего передачу; размер вспышки будет зависеть от размера восприимчивой популяции, или

- увеличение числа случаев лабораторно подтвержденных, автохтонных, передаваемых комарами случаев вирусной инфекции Зика в тех районах, где текущая передача выше 2 стандартных отклонений от базового показателя, или произошло удвоение числа случаев за 4-недельный период. Кластеры лихорадочных заболеваний, особенно, когда эпидемиологически связаны с подтвержденным случаем, должны быть исследованы микробиологически.

Таблица 1. — Страны и территории, в которых зарегистрирована передача вируса Зика через комаров (данные по состоянию на 08.09.2016)

Классификация	Регион	Страна / территория	Всего
Категория 1 — страны, впервые зарегистрировавшие вспышку с 2015 г.	Африка	Кабо-Верде; Гвинея-Бисау	2
	Америка	Ангилья; Антигуа и Барбуда; Аргентина; Аруба; Багамские острова; Барбадос; Белиз; Боливия; Бонайре, Синт-Эстатиус и Саба – Нидерланды; Бразилия; Британские Виргинские острова; Каймановы острова; Колумбия; Коста-Рика; Куба; Кюрасао; Доминика; Доминиканская Республика; Эквадор; Сальвадор; Французская Гвиана; Гренада; Гваделупе; Гватемала; Гайана; Гаити; Гондурас; Ямайка; Мартиника; Мексика; Никарагуа; Панама; Парагвай; Перу; Пуэрто-Рико; Сент-Бартелеми; Санкт-Люсия; Сен-Мартен; Святой Винсент и Гренадины; Синт-Маартен; Суринам; Тринидад и Тобаго; Теркс и Кайкос; Соединенные Штаты Америки; Виргинские острова Соединенных Штатов; Венесуэла (Боливарианская Республика)	46
	Западная часть Тихого океана	Американское Самоа; Фиджи; Маршалловы острова; Микронезия (Федеративные Штаты); Самоа; Сингапур; Тонга	7
Всего по региону:			55
Категория 2 — страны с возможной эндемичной передачей или с зарегистрированной локальной инфекцией Зика в 2016 г.	Юго-Восточная Азия	Индонезия, Таиланд	2
	Западная часть Тихого океана	Малайзия, Филиппины, Вьетнам	3
Всего по региону:			5
Категория 3 — страны с доказательствами локальной инфекции Зика в/до 2015 г., но без регистрации случаев в 2016 г., или где вспышка прекратилась	Африка	Габон	1
	Америка	Остров Пасхи (Чили)*	1
	Южная Азия и Индийский океан	Бангладеш, Мальдивские острова	2
	Юго-Восточная Азия и западная часть Тихого океана	Камбоджа; Острова Кука*; Французская Полинезия*; Лаосская Народно-Демократическая Республика; Новая Каледония; Папуа – Новая Гвинея; Соломоновы острова; Вануату	8
Всего по региону:			12
ВСЕГО:			72
Примечание — * — в этих странах и территориях не были зарегистрированы случаи инфекции, вызванной вирусом Зика в 2015 или 2016 гг.			

Категория 2 — страны с возможной эндемичной передачей или с зарегистрированной локальной инфекцией Зика в 2016 г. с отчетного периода, начиная с 2007 г.:

- страны или территории, которые регистрировали вспышку с последовательным наличием лабораторно подтвержденных, автохтонных, передаваемых комарами случаев заражения вирусом Зика через 12 мес после начала вспышки, или

- страны или территории, где вирус Зика циркулировал в течение нескольких лет с последовательным наличием лабораторно подтвержденных, автохтонных, передаваемых комарами случаев вирусной инфекции Зика, или существуют доказательства существования локальной передаваемой комарами инфекции Зика в 2016 г. Сообщения могут быть от страны или территории, где возникла инфекция, или от 3-й стороны, где случай был впервые зарегистрирован в соответствии с Международными медико-санитарными правилами (ММСП 2005).

Категория 3 — страны с доказательствами локальной инфекции Зика в или до 2015 г., но без регистрации случаев в 2016 г., или где вспышка прекратилась с отчетного периода, начиная с 2007 г.:

- отсутствие подтвержденных случаев заболевания в течение 3 мес. в определенной географической зоне с климатическими условиями, пригодными для круглогодичной арбовирусной передачи, или в течение 12-месячного периода в регионе с сезонным вектором активности.

Информация о текущей передаче вируса Зика полезна для оценки риска для людей, которые недавно вернулись или планируют поездки в страны с активной местной передачей (рисунок 2, таблица 1).

На сайтах ВОЗ, ECDC, PAHO, CDC, Роспотребнадзора [3–5, 19, 20] информация обновляется регулярно в соответствии с изменениями по эпидемиологической ситуации, а также каждый раз, когда страна добавляется или удаляется из списка стран, в которых регистрируется передача вируса Зика, или изменился статус передачи в той или иной стране.

По официальной информации вышеперечисленных организаций, с апреля 2015 г. в Бразилии, а затем и в других странах продолжается эпидемическое распространение инфекции, вызываемой вирусом Зика.

Эпидемиологическая ситуация, связанная с распространением вируса Зика в мире по состоянию на 08.09.2016. В целом оценка глобального риска не изменилась.

На данный момент в 72 странах и территориях (рисунок 1, таблица 1) зарегистрирована передача комарами вирусной инфекции Зика, начиная с 2007 г. (в 70 из них — с 2015 г.). В 55 странах, где вспышки впервые были зарегистрированы в 2015 г., они продолжаются и на данный момент (рисунок 2, таблица 1). В 5 странах выявлены возможная эндемичная передача или свидетельства локальной передачи инфекции Зика в 2016 г. В 12 странах выявлена локальная передача инфекции Зика в или до 2015 г., но в 2016 г. случаи не регистрировались или вспышка закончилась.

С февраля 2016 г. 12 стран сообщили о передаче вирусной инфекции Зика от человека к человеку без участия комаров (в основном половым путем) (таблица 2).

В 20 странах или территориях из числа пораженных зарегистрированы случаи микроцефалии и других пороков развития ЦНС, потенциально связанных с вирусной инфекцией Зика или предполагаемой врожденной инфекцией (таблица 3). В 4 из этих 20 стран зарегистрированы случаи микроцефалии у детей, рожденных от матерей в странах, не эндемичных по передаче ВЗ, но в истории которых сообщалось о недавних путешествиях в страны, неблагополучные по ВЗ.

В 18 странах и территориях зарегистрировано увеличение случаев синдрома Гийена–Барре (СГБ) и/или лабораторного подтверждения вирусной инфекции Зика среди случаев СГБ (таблица 4).

Кроме того, сообщается о 5117 случаях завоза ВЗ на территорию 57 стран и отдельных территорий, в т. ч. в 22 страны Европейского региона, США (2920 случаев завоза), Новую Зеландию (97 завозных случаев), Австралию (44 случая), Китай (19 случаев) и ряд других государств [5].

Общее число пострадавших лиц в странах Американского региона составляет более 494 тыс. человек, в т. ч. 116122 пациента — с лабораторно подтвержденным диагнозом. При этом следует учитывать несоответствие между уровнем зарегистрированной и фактической заболеваемости вследствие бессимптомного протекания значительного числа случаев.

Наиболее сложной в эпидемиологическом плане обстановка сохраняется в Бразилии, где за время эпидемии ЛЗ зарегистрировано 1857 случаев микроцефалии и неврологических нарушений у новорожденных. Общее число случаев заболевания с подозрением ЛЗ на 02.09.2016 составляет более 196 тыс.

Напряженная эпидемическая обстановка сохраняется в Колумбии, Сальвадоре, Гондурасе, Венесуэле и ряде других стран региона.

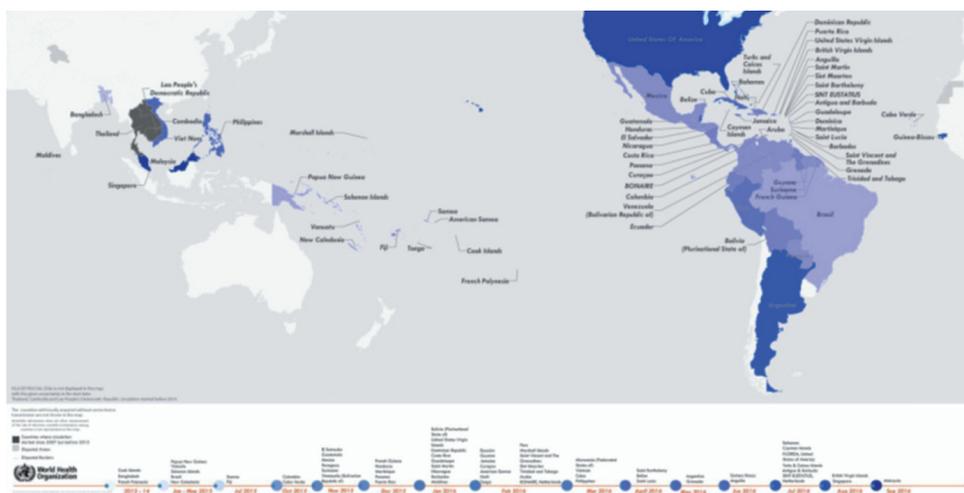


Рисунок 2. — Глобальное распространение вируса Зика, 2013–2016 гг.

Таблица 2. — Страны с передачей вируса Зика без участия комаров от человека к человеку, начиная с февраля 2016 г.

Регион	Страна / территория	Всего
Америка	Аргентина, Канада, Чили, Перу, США	5
Европа	Франция, Германия, Италия, Нидерланды, Португалия, Испания	6
Западная часть Тихого океана	Новая Зеландия	1
	Всего	12

Таблица 3. — Страны и территории, где зарегистрированы случаи микроцефалии* и/или случаи пороков развития ЦНС, потенциально связанных с вирусной инфекцией Зика

Страна/территория (страна завозного случая)	Число случаев микроцефалии или уродства ЦНС, потенциально связанных с вирусной инфекцией Зика
Бразилия	1857
Кабо-Верде	9
Канада	1
Коста-Рика	1
Колумбия	38
Доминиканская Республика	3
Сальвадор	4
Французская Гвиана	3
Французская Полинезия	8
Гаити	1
Гондурас	1
Маршалловы острова	1
Мартиника	10
Панама	5
Парагвай	2
Пуэрто-Рико	1
Словения (из Бразилии)	1

Окончание таблицы 3

Страна/территория (страна завозного случая)	Число случаев микроцефалии или уродства ЦНС, потенциально связанных с вирусной инфекцией Зика
Испания (из Колумбии, Венесуэлы)	2
Суринам	1
США (из разных стран)	21
Примечание — * — микроцефалия является неонатальным пороком развития, при котором размер черепа и масса головного мозга ребенка значительно меньше по сравнению с другими детьми того же возраста и пола. При этом размеры других частей тела нормальны. Сопровождается умственной недостаточностью от легкой до тяжелой степени тяжести.	

Таблица 4. — Страны и территории, где зарегистрированы случаи синдрома Гийена–Барре (СГБ)*, потенциально связанные с вирусной инфекцией Зика

Страна/территория	Характеристика заболеваемости СГБ
Бразилия, Колумбия, Доминиканская Республика, Сальвадор, Французская Гвиана, Французская Полинезия, Гондурас, Ямайка, Мартиника, Суринам, Венесуэла	Зарегистрирован рост заболеваемости СГБ, по крайней мере, с одним случаем СГБ с подтвержденной вирусной инфекцией Зика
Коста-Рика, Гренада, Гваделупа, Гватемала, Гаити, Панама, Пуэрто-Рико	Не зарегистрирован рост заболеваемости СГБ, но по крайней мере зарегистрирован один случай СГБ с подтвержденной вирусной инфекцией Зика
Примечание — * — синдром Гийена–Барре — это состояние, при котором иммунная система человека поражает часть периферической нервной системы, проявляется вялыми парезами, нарушениями чувствительности, вегетативными расстройствами.	

По данным ВОЗ и некоторых неофициальных источников, с 27 августа 2016 г. на территории Республики Сингапур были зарегистрированы первые случаи инфицирования людей вирусом Зика. По состоянию на 11.09.2016 количество случаев по разным данным увеличилось до 329. Заболеваемость регистрируется в нескольких жилых кварталах города. Министерство здравоохранения Сингапура сообщило, что анализ последовательности ВЗ от случаев в Сингапуре указывает на то, что вирус принадлежит к азиатской линии и, вероятно, возник от штамма, циркулировавшего ранее в Юго-Восточной Азии в отличие от случаев, импортируемых из Южной Америки (хотя эти вирусы также относятся к азиатской линии). Несмотря на то, что ранее не сообщалось о неврологических осложнениях, связанных со случаями Зика в Юго-Восточной Азии, необходим дальнейший надзор, поскольку точная связь между эволюцией вируса и его влиянием на неврологические осложнения не ясны. Это же справедливо и в отношении случаев, вызванных африканским штаммом в Гвинее-Бисау: отсутствие неврологических осложнений не следует считать доказательствами их отсутствия. Это связано с недостаточным количеством подтвержденных исследованных случаев как в Юго-Восточной Азии, так и в Африке, чтобы окончательно исключить возможность микроцефалии и других врожденных пороков развития ЦНС или СГБ в этих условиях. Пока не ясно, что является причиной внезапного увеличения числа случаев (>250 случаев с 27 августа) в Сингапуре, учитывая устоявшуюся циркуляцию вируса в регионе на протяжении многих лет [5, 19].

Поскольку в большинстве стран не регистрируется абсолютное число случаев заболеваний, вызванных вирусом Зика, сделать обобщения о глобальной тенденции вспышки вируса Зика не представляется возможным. Тем не менее эпидемиологическая ситуация, связанная с распространением вируса Зика в мире, в настоящее время имеет, по мнению ряда экспертов, статус пандемии [13, 21, 22].

В этой связи 1 сентября 2016 г. состоялось очередное Четвертое совещание Комитета по чрезвычайной ситуации (КЧС), созванное Генеральным директором ВОЗ в соответствии с Международ-

ными медико-санитарными правилами (2005 г.), по вопросам микроцефалии, других неврологических нарушений и вируса Зика [23].

Члены Комитета были проинформированы об осуществлении временных рекомендаций, вынесенных Генеральным директором по итогам трех предыдущих совещаний КЧС. Кроме того, Комитету была предоставлена обновленная информация о положении дел во время проведения Олимпийских игр, прошедших в Бразилии, и после них, последних исследованиях в области географического распространения вируса Зика, естественного течения заболевания, его эпидемиологии, микроцефалии и других осложнений у новорожденных, связанных с вирусом Зика, синдроме Гийена–Барре и нынешнем уровне знаний о передаче вируса Зика половым путем [14, 23].

На совещании также было отмечено, что министерство здравоохранения Бразилии при технической поддержке ВОЗ смогли успешно реализовать надлежащие меры по охране здоровья во время Олимпийских игр. До настоящего времени не сообщалось о подтвержденных случаях инфицирования вирусом Зика среди людей, посещавших Игры, как во время их проведения, так и после них. Отсутствие таких случаев подтверждает выводы об оценке риска в отношении Олимпийских Игр, сделанные в ходе третьего совещания КЧС.

Проанализировав представленные фактические данные, Комитет сделал вывод, что вследствие продолжающегося географического распространения и существенных пробелов в знаниях о вирусе и его последствиях, вирусная инфекция Зика и связанные с ней врожденные и другие неврологические нарушения продолжают представлять собой чрезвычайную опасность в области общественного здравоохранения, имеющую международное значение. Комитет повторно подтвердил рекомендации, представленные им Генеральному директору на предыдущих совещаниях в области общественного здравоохранения по микроцефалии, другим неврологическим нарушениям и вирусу Зика, эпиднадзору, борьбе с переносчиками, информированию о рисках, медицинской помощи, рекомендациям в отношении туристических поездок, научным исследованиям и разработкам продукции в отношении вакцин, лечению и лабораторным тестам. Было отмечено, что в настоящее время все мероприятия на основе этих рекомендаций продолжают оставаться в силе и осуществляться. Комитет также подтвердил свои прежние рекомендации не вводить общих ограничений на поездки и торговлю со странами, зонами и/или территориями, где имеет место передача вируса Зика, включая города Бразилии, где в период с 7 по 18 сентября 2016 г. проходят Паралимпийские игры.

Кроме того, признавая, что последствия, связанные с вирусом Зика, представляют собой долгосрочную проблему, Комитет рекомендовал Генеральному директору рассмотреть возможность создания в рамках ВОЗ соответствующей инфраструктуры и плана по обеспечению долгосрочной координации и эффективного реагирования. Комитет подчеркнул необходимость получения лучшего научного понимания эпидемиологии вируса Зика, клинической картины заболевания и методов профилактики, рекомендуя сфокусироваться на нескольких новых направлениях научных исследований наряду с другими направлениями, рекомендованными ранее, для достижения следующих целей:

- углубить понимание различных генотипов (линий) вируса, включая кросс-реактивность и перекрестный иммунитет между ними, а также их клинические последствия;
- оценить возможные сопутствующие факторы или факторы риска, которые могут повлиять на тяжесть заболевания;
- улучшить понимание природы течения заболевания у детей с врожденной инфекцией, беременных, а также у других детей и взрослых;
- определить продолжительность и локализацию персистенции вируса у людей и ее воздействие на уровень трансмиссивности;
- улучшить определение риска заражения и способов передачи инфекции;
- оценить целесообразность и практическую осуществимость применения эффективных средств борьбы с переносчиками;
- продолжить разработку безопасных и эффективных мер профилактики (например, вакцины).

Принимая во внимание воздействие, которое может оказать вирусная инфекция Зика с ее последствиями, особенно в странах со слабо развитой системой здравоохранения, Комитет также рекомендовал ВОЗ обеспечить соответствующее руководство по эффективному эпиднадзору и контролю болезни, вызываемой вирусом Зика, в странах с высоким уровнем уязвимости и низким потенциалом [23].

Заключение. На основании вышеизложенного можно сделать следующие выводы об эпидемиологической ситуации, связанной с распространением ВЗ в мире, на современном этапе:

1. ВОЗ оказывает странам помощь в борьбе с инфекцией, вызванной ВЗ, выполняя действия, изложенные 16.02.2016 в глобальной стратегии «Стратегический механизм реагирования и план совместных действий» в связи с вирусом Зика [24]:

- определение и установление приоритетности научных исследований в области болезни, вызванной вирусом Зика, и ее осложнений путем созыва экспертов и партнеров;
- усиление эпиднадзора за вирусом Зика и связанными с ним осложнениями;
- усиление потенциала в области информирования о рисках, чтобы обеспечить лучшее понимание рисков, связанных с вирусом Зика, местными сообществами;
- усиление способности лабораторий выявлять вирус;
- поддержка органов здравоохранения в осуществлении стратегий борьбы с переносчиками, направленных на уменьшение популяций комаров *Aedes*;
- подготовка рекомендаций в отношении клинической помощи и последующего наблюдения за людьми, у которых развились осложнения в связи с вирусной инфекцией Зика, в сотрудничестве с экспертами и другими организациями здравоохранения.

2. В целях обеспечения глобальной стандартизации для классификации и отчетности в отношении случаев инфицирования вирусом Зика ВОЗ разработала предварительные определения случая заболевания. В настоящее время разрабатывается руководство ВОЗ по эпиднадзору за этим заболеванием. По мере поступления новой информации ВОЗ будет периодически пересматривать и корректировать эти предварительные определения случаев заболевания [25, 26].

Предполагаемый случай заболевания

Наличие у человека сыпи и/или повышенной температуры и как минимум одного из следующих признаков или симптомов:

- боль в суставах, или
- артрит, или
- конъюнктивит (негнойный/с гиперемией).

Возможный случай заболевания

Предполагаемый случай заболевания с присутствием антител IgM к вирусу Зика при отсутствии данных об инфицировании другими флавивирусами и наличием эпидемиологической связи, т. е. контакте с лицом, заболевание которого подтверждено, или проживание в районе с местной передачей вируса Зика, или поездка в такой район максимум за две недели до наступления симптомов.

Подтвержденный случай заболевания

Лабораторно подтвержденный случай недавнего инфицирования вирусом Зика:

- присутствие РНК или антигена вируса Зика в сыворотке крови или других образцах (например, слюны, тканей, мочи, цельной крови), или
- положительная реакция на антитела IgM к вирусу Зика и титр PRNT90 на вирус Зика ≥ 20 , а коэффициент титра PRNT90 на вирус Зика по отношению к другим флавивирусам ≥ 4 ; исключение других флавивирусов.

Заражение вирусом Зика можно предположить с учетом наличия симптомов и недавних поездок (в район активной передачи вируса Зика либо проживания в таком районе). Диагноз вирусной инфекции Зика можно подтвердить только путем лабораторного анализа крови или других биологических жидкостей, таких как моча, слюна или сперма.

3. Болезнь, вызванная вирусом Зика, обычно протекает в легкой форме и не требует специального лечения. Следует много отдыхать, пить достаточно жидкости и принимать обычные препараты для устранения боли и лихорадки. При усугублении симптомов необходимо обратиться за медицинской помощью и консультацией. В настоящее время вакцины от этой болезни не существует [24].

4. Основными профилактическими мероприятиями против ЛЗ является борьба с переносчиками — кровососущими комарами, особенно в местах проживания. Важно накрывать, опорожнять или очищать потенциальные места размножения комаров внутри и вокруг жилья, например, ведра, бочки, горшки, сточные канавы и использованные автомобильные покрышки. Органы здравоохранения могут также давать указания по распылению инсектицидов [24].

Для защиты от укусов комаров можно носить одежду (желательно светлых тонов), закрывающую как можно большую часть тела, применять физические барьеры, например, устанавливать сетки на окна, закрывать двери и окна, использовать противомоскитную сетку во время сна и применять репелленты согласно инструкции производителя на этикетке. Необходимо уделять особое внимание и оказывать помощь тем, кто не в состоянии обеспечить себе надлежащую защиту, в частности детям, болеющим и пожилым людям. Туристам и жителям пострадавших районов следует защищаться от укусов комаров, принимая указанные выше простейшие меры предосторожности.

Поскольку в нескольких странах выявлены случаи передачи ВЗ половым путем, ВОЗ разработала и регулярно обновляет временное руководство по профилактике передачи ВЗ половым путем [14]. В настоящее время для регионов с активной передачей ВЗ сексуально активным мужчинам и женщинам следует придерживаться более безопасного полового поведения. Для регионов без активной передачи ВЗ ВОЗ рекомендует для мужчин и женщин, которые возвращаются из районов активной передачи вируса, практиковать безопасный секс или воздерживаться от половой активности в течение как минимум 6 мес. [14].

5. Распространение лихорадки Зика в Республике Беларусь в настоящее время маловероятно в связи с отсутствием на территории страны переносчиков, однако случаи завоза из эндемичных стран исключить нельзя. Это обуславливает необходимость принятия превентивных мер, в т. ч. наличие современных методов для своевременного и эффективного выявления возбудителей тропических лихорадок в пробах от пациентов. В РНПЦ эпидемиологии и микробиологии в настоящее время имеются необходимые комплектующие и разработана технология диагностики вируса Зика с использованием метода полимеразной цепной реакции. Порядок забора, транспортировки и тестирования биологического материала от пациентов с подозрением вирусной трансмиссивной лихорадки Денге, Чикунгунья, Зика и др., а также оперативная информация о ситуации, связанной с распространением ЛЗ в мире, размещены на сайте центра — www.belriem.by. Ситуация находится на постоянном контроле Министерства здравоохранения Республики Беларусь с целью недопущения завоза и распространения ЛЗ среди населения страны.

Литература

1. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia / M.R. Duffy [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 2009. — Vol. 360, № 24. — P. 2536–2543.
2. Заявление ВОЗ о первом совещании Комитета Международных медико-санитарных правил по чрезвычайной ситуации в связи с вирусом Зика. 1 февраля 2016 г. [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. Центр СМИ. — 2016. — Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/ru/#>. — Дата доступа: 18.08.2016.
3. Epidemiological update: Outbreaks of Zika virus and complications potentially linked to the Zika virus infection [Electronic resource] / European Centre for Disease Prevention and Control. — Mode of access: http://ecdc.europa.eu/en/press/epidemiological_updates. — Date of access: 24.08.2016.
4. All Countries & Territories with Active Zika Virus Transmission [Electronic resource] / Centers for Disease Control and Prevention. CDC. — Mode of access: <http://www.cdc.gov/zika/geo/active-countries.html>. — Date of access: 06.09.2016.
5. Об эпидемиологической ситуации, связанной с распространением вируса Зика в мире на 09.09.2016 [Электронный ресурс] / Роспотребнадзор. — Режим доступа: http://rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=7042. — Дата доступа: 12.09.2016.
6. Dick, G.W.A. Zika virus. Isolations and serological specificity / G.W.A. Dick, S.F. Kitchen, A.J. Haddow // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* — 1952. — Vol. 46, № 5. — P. 509–520.
7. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014 / D. Musso [et al.] // *Euro Surveill.* — 2014. — Vol. 19, № 14. — pii: 20761.
8. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA / B.D. Foy [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* — 2011. — Vol. 17, № 5. — P. 880–882.
9. Potential sexual transmission of Zika virus / D. Musso [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* — 2015. — Vol. 21, № 2. — P. 359–361.
10. Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? / J.M. Mansuy [et al.] // *Lancet Infect. Dis.* — 2016. — Vol. 16, № 4. — P. 405.
11. Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France, April 2016 / T. Freour [et al.] // *Euro Surveill.* — 2016. — Vol. 21, № 23. — doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.23.30254.

12. Petersen, L.R. Zika virus / L.R. Petersen, D.J. Jamieson, M.A. Honein // *N. Engl. J. Med.* — 2016. — Vol. 375, № 3. — P. 294–295.
13. Boeuf, P. The global threat of Zika virus to pregnancy: epidemiology, clinical perspectives, mechanisms, and impact / P. Boeuf // *BMC Med.* — 2016. — Vol. 14, № 1. — P. 112.
14. Prevention of sexual transmission of Zika virus. Interim guidance. [Electronic resource] / WHO. — Mode of access: <http://who.int/csr/resources/publications/zika/sexual-transmission-prevention/en/>. — Date of access: 14.09.2016.
15. Dick, G.W. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda; Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses / G.W. Dick // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* — 1953. — Vol. 47, № 1. — P. 1348.
16. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014 / J. Tognarelli [et al.] // *Arch. Virol.* — 2016. — Vol. 161, № 3. — P. 665–668.
17. Musso, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil / D. Musso // *Emerg. Infect. Dis.* — 2015. — Vol. 21, № 10. — P. 1887.
18. Campos, G.S. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil / G.S. Campos, A.C. Bandeira, S.I. Sardi // *Emerg. Infect. Dis.* — 2015. — Vol. 21, № 10. — P. 1885–1886.
19. WHO. Zika situation report [Electronic resource]. — Mode of access: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/249597/1/zikasitrep1Sept16-eng.pdf?ua=1>. — Date of access: 05.09.2016.
20. PAHO Regional Zika Epidemiological Update (Americas) [Electronic resource] / Pan American Health Organization; WHO Regional Office for Americas. — Mode of access: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599&Itemid=41691&lang=en. — Date of access: 06.09.2016.
21. Fauci, A. Zika virus in the Americas – yet another arbovirus threat / A. Fauci, D.M. Morens // *N. Engl. J. Med.* — 2016. — Vol. 374, № 7. — P. 601–604.
22. Imperato, P.J. Convergence of a virus, mosquitoes, and human travel in globalizing the Zika epidemic / P.J. Imperato // *J. Commun. Health.* — 2016. — Vol. 41, № 3. — P. 674–679.
23. Четвертое совещание Комитета по чрезвычайной ситуации в соответствии с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) по вопросам микроцефалии, других неврологических нарушений и вируса Зика: заявление ВОЗ 2 сентября 2016 г. [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://who.int/mediacentre/news/statements/2016/zika-fourth-ec/ru/>. — Дата доступа: 06.09.2016.
24. Zika virus. Fact sheet. Updated 6 September 2016 [Electronic resource] / WHO. — Mode of access: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>. — Date of access: 09.09.2016.
25. Zika virus disease. Interim case definition. 12 Feb. 2016 [Electronic resource] / WHO. — Mode of access: <http://www.who.int/csr/disease/zika/case-definition/en/>. — Date of access: 14.09.2016.
26. Тестирование на вирусную инфекцию Зика в лабораторных условиях. Временное руководство ВОЗ [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.who.int/csr/resources/publications/zika/laboratory-testing/ru/>. — Дата доступа: 06.09.2016.

CURRENT EPIDEMIOLOGICAL SITUATION FOR ZIKA VIRUS INFECTION IN THE WORLD

*Samoilova T.I., Gorbunov V.A., Shimanovich V.P.,
Krasko A.G., Rustamova L.M., Petkevich A.S., Ablova T.A.*

*State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus*

Zika virus (ZV), first discovered in 1947 in the study of yellow fever in Uganda, remained in relative obscurity for nearly 70 years, and then, for the period of just 1 year ZV was introduced into Brazil from the Pacific Islands and spread rapidly throughout the Americas. ZV has caused the first such a massive infection, associated with increased cases of microcephaly and other disorders of the central nervous system in neonates in more than past 50 years. The World Health Organization would declare the situation as a Public Health Emergency of International Concern. Given the magnitude of the current pandemic, serious and long-term consequences of infection during pregnancy and the affected population, it is necessary a rapid global public health and research response to ZV to control and prevent its impacts through the development of therapeutics, vaccines and improved diagnostics. This review describes the current understanding of the epidemiology, transmission, diagnosis of ZV infection and, the forecast of the infection.

Keywords: Zika virus infection, epidemiology, diagnostic, prevention.

Поступила 14.09.2016

РОЛЬ БОКАВИРУСА ЧЕЛОВЕКА В РАЗВИТИИ ТЯЖЕЛЫХ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

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

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

Реферат. В данной работе показана роль бокавируса человека в развитии тяжелых острых респираторных инфекций у детей раннего возраста. Установлена корреляция между развитием вирусемии и тяжестью течения заболевания, ассоциированного с бокавирусом.

Ключевые слова: бокавирус человека, вирусемия, тяжелые острые респираторные инфекции.

Введение. Первые сообщения об открытии бокавируса человека (HBoV) появились в сентябре 2005 г. и стали результатом вирусологических исследований сотрудников Каролинского института (Швеция) при скрининге мазков из дыхательных путей у детей с признаками острой респираторной инфекции (ОРИ). Исследователи использовали метод случайной ПЦР-амплификации и метагеномное секвенирование. Полученные результаты обрабатывали с помощью биоинформатических ресурсов [1]. С момента открытия показана активная циркуляция вируса во многих странах мира и его выявление не только в респираторных мазках, но и в сыворотки крови, спинномозговой жидкости, моче и фекалиях у пациентов с признаками ОРИ. Частота выявления бокавируса в назофарингиальных мазках варьировала от 1,5–21,5% [2]. Бокавирус человека — это ДНК-содержащий вирус, принадлежащий к семейству *Parvoviridae*, роду *Bocavirus*. Название рода *Bocavirus* является результатом комбинации первых букв названий описанных ранее вирусов, принадлежащих к этому роду: бычьего парвовируса (*bovine parvovirus*) и минутного вируса собак (*canine minute virus*). В настоящее время известно 4 генотипа бокавируса (HBoV 1–4). HBoV 1 является причиной респираторных заболеваний у детей, HBoV 2–4 наиболее часто выявляется у пациентов с симптомами гастроэнтерита. По данным литературных источников, наиболее восприимчивыми к HBoV являются дети раннего возраста [3–5].

Для детекции вируса в настоящее время применяют молекулярные методы диагностики (полимеразная цепная реакция и секвенирование), поскольку лабораторная модель для культивирования вируса не получена. Инфицирование HBoV может приводить к тяжелым заболеваниям верхних и нижних дыхательных путей. В зависимости от степени выраженности клинических симптомов многим пациентам с бокавирусной инфекцией требуется госпитализация, а при развитии осложнений необходимо лечение в отделении интенсивной терапии и реанимации. В клинической практике одним из критериев тяжести респираторного заболевания являются процессы, вызванные циркуляцией вируса в крови (вирусемия). Степень вирусемии прямо коррелирует с явлениями общего токсикоза, тяжестью состояния пациента, лихорадкой и состоянием иммунной системы, реакция которой в значительной степени определяет характер течения инфекционного процесса и его исход, а также развитие осложнений. Выявление генетического материала в плазме и сыворотки крови было описано для таких респираторных вирусов, как корона-, риновирусы, вирус гриппа птиц и человека. В работе зарубежных авторов описаны случаи выявления ДНК бокавируса в сыворотки крови у детей с признаками острой респираторной вирусной инфекцией. Тем не менее нет таких исследований, в которых было бы показано потенциальное соотношение между выявлением ДНК HBoV в периферической крови и тяжестью заболевания.

Цель работы — изучение роли бокавируса в развитии тяжелых острых респираторных инфекций и выявление корреляции тяжести заболевания с развитием вирусемии методом ПЦР в режиме реального времени.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили назофарингиальные мазки, полученные от госпитализированных детей с признаками тяжелых острых респираторных инфекций (ТОРИ), а также образцы сывороток крови данных пациентов, полученные в острой фазе заболевания и в период выздоровления. Исследования выполнялись в рамках дозорного надзора за гриппом и другими острыми респираторными вирусными инфекциями. Мазки собирали в транспортную среду и хранили при температуре -20°C до исследования. Венозную кровь, полученную без антикоагулянтов, отстаивали при комнатной температуре (+15–20°C) до полного образования сгустка.

После образования сгустка сыворотку центрифугировали при 1500 об./мин в течение 10 мин. После центрифугирования сыворотку собирали в стерильные пробирки и хранили при температуре - 20°C до исследования. Доставка образцов осуществлялась с соблюдением холодовой цепи в соответствии с инструкцией № 121-1210 «Комплексная диагностика гриппа» от 18.01.2011 [6]. Каждый образец сопровождался направлением, содержащим паспортные данные пациента, дату заболевания и забора материала, клинический диагноз. Полученные образцы были тестированы на наличие генетического материала бокавируса человека.

Для выделения ДНК вируса использовали набор «НуклеСорб» (РБ) согласно инструкции производителя. Выявление генетического материала вируса проводили с использованием диагностических наборов «ОРВИ-ген» (РБ). Определение концентрации и чистоты препарата ДНК оценивали путем определения отношения оптической плотности при 260 и 280 нм (A260/280) на спектрофотометре IMPLEN P330 (Германия). В исследованиях использовали ДНК с показателем оптической плотности в диапазоне от 1,8 до 2,1.

Постановку ПЦР в режиме реального времени проводили на приборе Rotor Gene 6000 (Corbett research, Австралия). Для исключения неспецифических реакций и для обнаружения наличие ингибиторов ПЦР реакции в каждом эксперименте присутствовал отрицательный и положительный контроль.

Статистический анализ результатов проводили с применением программного обеспечения Microsoft Excel. Определение частоты проявления качественных признаков основывалось на сравнении эмпирических распределений с помощью критерия χ^2 . Различия считались достоверными при $p < 0,05$, высоко достоверными — $p < 0,001$, недостоверными — $p > 0,05$.

Результаты и их обсуждение. По данным литературных источников, инфицирование НВовV может приводить к тяжелым заболеваниям верхних и нижних дыхательных путей, требующих госпитализации. Наиболее восприимчивыми к НВовV являются дети раннего возраста, поэтому объектом нашего исследования стали назофарингиальные мазки и образцы сыворотки крови от госпитализированных детей с клиническими проявлениями ТОРИ. Назофарингиальные мазки исследованы на наличие генетического материала респираторного бокавируса. ДНК вируса было выявлено в 57 образцах. Образцы сыворотки крови от данных пациентов были исследованы на наличии НВовV.

В сыворотках, полученных в острую фазу заболевания (первые три дня после госпитализации), наличие генетического материала бокавируса было выявлено в 45 (78,9%) образцах. Это показывает возможность генерализации бокавирусной инфекции и развитие системного заболевания, следовательно, повышается риск развития осложнений. Возрастная структура детей, у которых в образцах сыворотки крови выявлена ДНК НВовV, представлена на рисунке.

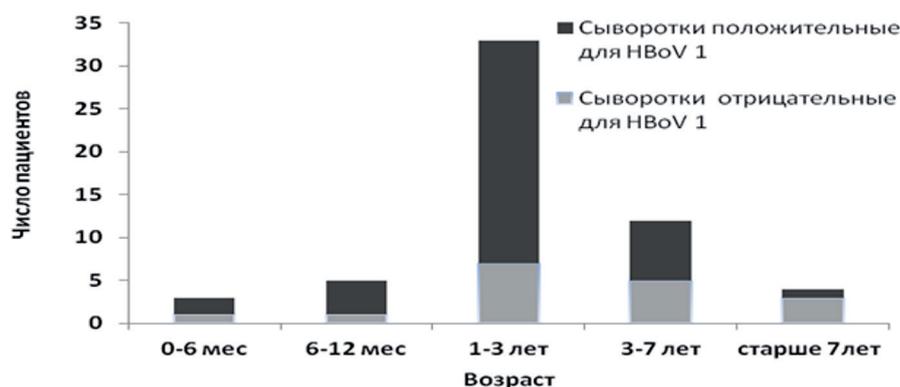


Рисунок — Возрастная структура детей с положительными для НВовV образцами сыворотки

Из числа всех положительных находок 73,3% сывороток относились к возрастной категории от 1 года до 3 лет. По данным литературных источников, именно эта возрастная категория пациентов является наиболее восприимчивой к возбудителю, и, следовательно, риск развития осложнений или затяжного течения заболевания в этой группе будет наиболее высоким. Низкая заболеваемость детей первого года жизни может быть связана с наличием трансплацентарного иммунитета. Сниже-

ние тяжести заболевания у детей старше 7 лет обусловлено наличием более зрелой иммунной системы, а также присутствием факторов пассивного иммунитета.

Длительность заболевания при бокавирусной инфекции в нашем исследовании варьировала от 10 до 35 дней (в среднем 20 дней). Для изучения динамики и времени циркуляции вируса в крови были исследованы образцы сывороток крови пациентов, полученные в период выздоровления. Генетический материал вируса выявлен в 22 (38,6%) случаях. Как показывают результаты исследования, НВoV может активно циркулировать в периферической крови в течение длительного времени, что не исключает возможности последующей его персистенции в организме. В литературе описаны случаи присутствия НВoV в респираторном тракте и выявление его при повторной госпитализации в течение 1–6 мес [7, 8].

Для изучения диапазона нозологических проявлений бокавирусной инфекции проведен анализ направлений, сопровождающих каждый клинический образец. Заболевания протекали с различной степенью выраженности клинических симптомов. Среди госпитализированных детей лечение в отделении интенсивной терапии и реанимации (ОИТР) проходило 37 (64,9%) пациентов. С клиническим диагнозом «пневмония» в ОИТР было госпитализировано 22 (59,5%) ребенка, причем в двух случаях заболевание осложнилось плевритом. Клинические проявления обструктивного бронхита с выраженным синдромом интоксикации и дыхательных расстройств наблюдались у 15 (21,6%) человек. В образцах сыворотки у всех детей, нуждавшихся в лечении в ОИТР, методом ПЦР в режиме реального времени был выявлен генетический материал бокавируса человека ($p < 0,05$, критерий χ^2).

Заключение. В нашей стране это первое исследование, проведенное методом ПЦР в режиме реального времени для выявления корреляции тяжести течения заболевания с развитием вирусемии при бокавирусной инфекции. Данные исследования свидетельствуют, что при генерализации процесса и появлении вирусемии бокавирусная инфекция имеет тяжелое течение и для лечения требуется госпитализация. Среди факторов, которые могут повлиять на противовирусный ответ следует отметить возраст пациента и вирусную нагрузку, которая может коррелировать с тяжестью заболевания. Обнаружение вируса в сыворотке крови в течение длительного срока позволяет предположить, что повышенная восприимчивость к вирусу детей раннего возраста играет существенную роль в индукции развития тяжелых клинических проявлений заболевания или осложнений.

Литература

1. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples / T. Allander [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2005. — Vol. 102, № 36. — P. 12891–12896.
2. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? / O. Schildgen [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2008. — Vol. 21, № 2. — P. 291–304.
3. Сивец, Н.В. Эпидемиологические аспекты бокавирусной инфекции у госпитализированных детей в Республике Беларусь в 2010–2014 гг. / Н.В. Сивец, Н.П. Шмелева, Н.В. Грибкова // *Здравоохранение*. — 2014. — № 10. — С. 36–39.
4. Шмелева, Н.П. Изучение спектра возбудителей ОРВИ у госпитализированных детей с применением Real Time PCR / Н.П. Шмелева, Н.В. Сивец, Н.В. Грибкова // *Молекулярная диагностика-2010: сб. материалов конф.* — М., 2010. — Т. 6. — С. 223–225.
5. Clinical significance of different virus load of human bocavirus in patients with lower respiratory tract infection / W. Jiang [et al.] // *Sci. Rep.* — 2016. — Vol. 6. — doi: 10.1038/srep20246.
6. Комплексная диагностика гриппа: инструкция по применению № 121-1210: утв. постановлением Гл. гос. сан. врача Респ. Беларусь 18.01.2011.
7. Human bocavirus in children with acute lymphoblastic leukemia / M. Koskenvuo [et al.] // *Eur. J. Pediatr.* — 2008. — Vol. 167, № 9. — P. 1011–1015.
8. Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study / N. Bastien [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2007. — Vol. 45, № 2. — P. 610–613.

ROLE OF HUMAN BOCAVIRUS IN DEVELOPMENT OF SEVERE ACUTE RESPIRATORY TRACT INFECTION IN CHILDREN

Sivets N.V., Shmialiova N.P., Gribkova N.V., Lapo T.P.

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

In the paper we show the role of human bocavirus in the development of severe acute respiratory infections in young children. It was found the correlation between the viremia development and severity of the disease associated with bocavirus.

Keywords: human bocavirus, viremia, severe acute respiratory infections, children.

Поступила 06.09.2016

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ДЕТЕЙ С СИНДРОМОМ ОСТРОГО ВЯЛОГО ПАРАЛИЧА В БЕЛАРУСИ В 2015 г.

Ухова И.Ф.¹, Самойлович Е.О.¹, Ермолович М.А.¹, Свирчевская Е.Ю.¹, Ясинская Л.А.²

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

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

Реферат. В 2015 г. в Беларуси регистрация случаев острого вялого паралича (ОВП) и обследование 61 ребенка с этим синдромом проводились в соответствии с критериями ВОЗ. У 2 (3,3%) детей были обнаружены аденовирусы, от 1 (1,6%) ребенка — ПВ серотипа 2. Молекулярно-генетическое исследование изолированных ПВ показало, что они являлись вакцинными штаммами с гомотипичной организацией генома. Все случаи ОВП были классифицированы как ОВП неполиомиелитной этиологии.

Ключевые слова: полиовирус, острый вялый паралич, Беларусь.

Введение. По данным ВОЗ, в 2015 г. ареал распространения дикого полиовируса (ПВ) был ограничен территориями двух стран мира — Афганистана и Пакистана. По сравнению с 2014 г. число зарегистрированных случаев паралитического полиомиелита уменьшилось с 359 до 74. Все выделенные в этих странах ПВ по-прежнему относились к серотипу 1. В то же время ВОЗ подчеркивает, что передача дикого ПВ даже между двумя странами создает потенциальную угрозу их мирового распространения [1].

На фоне снижения ареала циркуляции диких ПВ серьезную проблему представляет тенденция по распространению вакцино-родственных ПВ (ВРПВ), которые в результате длительного размножения вакцинных штаммов Себина в организме иммунодефицитных лиц или длительной циркуляции в популяции с низким уровнем охвата вакцинацией против полиомиелита способны значительно дивергировать от вакцинных штаммов и приобретать нейровирулентные свойства, а следовательно, вызывать вспышки паралитического полиомиелита. Так, в 2015 г. вспышки полиомиелита, вызванные такого рода вирусами, произошли в 7 странах мира, причем в Пакистане, Гвинее, Лаосе и Мьянме возбудителем явился ВРПВ серотипа 2, а в Нигерии, на Мадагаскаре и Украине — серотипа 1. Особую настороженность вызвали данные о выделении циркулирующих ВРПВ серотипа 1 в Закарпатской области на юго-западе Украины, полученные в июле 2015 г. Как известно, уровень охвата вакцинацией среди детей в возрасте до 1 года в стране в 2014 г. составлял около 50%, в 2015 г. — около 14%. ВРПВ были изолированы от 2 непривитых против полиомиелита детей в возрасте 10 мес. и 4 лет [1, 2].

В Республике Беларусь позднее 2007 г., когда ВРПВ серотипа 2 с уровнем дивергенции от оригинального вакцинного вируса 1,88% был выявлен от ребенка с иммунодефицитом, ВРПВ изолированы не были [3].

В 2015 г. Глобальной комиссией по сертификации искоренения полиомиелита было объявлено о достижении эрадикации дикого ПВ серотипа 2. Последний случай полиомиелита, обусловленный этим серотипом, был зарегистрирован в 1999 г. В резолюции 68-й сессии Всемирной Ассамблеи Здравоохранения на 2016 г. был запланирован ряд мероприятий, направленных на разработку национальных планов по замене трехвалентной оральной полиомиелитной вакцины (тОПВ) на бивалентную с содержанием вакцинных штаммов серотипов 1 и 3, а также на проведение национальной политики по уничтожению остающихся запасов тОПВ, завершение внедрения в национальные календари стран прививок трехвалентной инактивированной полиомиелитной вакциной (ИПВ) и поддержание высокого уровня охвата детей плановой иммунизацией. Всем странам рекомендовано максимально усилить надзорные мероприятия с целью получения убедительных доказательств приостановления выделения вакцинного штамма Себина серотипа 2 как из образцов стула людей, так и из окружающей среды.

Одним из ключевых моментов надзора за полиомиелитом по-прежнему является надзор за заболеваниями с синдромом острого вялого паралича у детей в возрасте до 15 лет. Для обеспечения адекватного надзора ВОЗ разработаны основные критерии оценки качества проводимых мероприятий: выявление и регистрация случаев, сбор двух образцов стула в течение 14 дней от момента паралича, транспортировка образцов в аккредитованную ВОЗ лабораторию в течении 72 ч, изолирование и идентификация вирусов, молекулярно-генетическое исследование ПВ с целью определения их происхождения — вакцинный, дикий или ВРПВ.

В данном исследовании отражены результаты клинико-эпидемиологического и вирусологического обследования случаев ОВП у детей до 15 лет, выявленных в Беларуси в 2015 г. при выполнении надзора за полиомиелитом, проводимого в соответствии с планом мероприятий по поддержанию статуса страны, свободной от полиомиелита.

Материалы и методы. Все исследования по выделению, идентификации и молекулярно-генетическому изучению вирусов от детей с ОВП были проведены в аккредитованном ВОЗ Национальном референс-центре по полиомиелиту (НРЦП), созданном на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Образцы стула детей с синдромом ОВП вирусологически исследованы с помощью перевиваемых культур клеток человека RD, HEp2C и линии мышечных клеток L20B. Суточный монослой клеток первоначально заражали 10% фекальной суспензией каждой из проб, а затем проводили пассирование в течении 7 дней с ежедневным микроскопированием монослоя.

Идентификацию ПВ осуществляли в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к трем серотипам ПВ (ПВ1, ПВ2, ПВ3), неполиомиелитных энтеровирусов — в реакции нейтрализации с использованием типоспецифических сывороток к энтеровирусам (Институт общественного здравоохранения, Билтховен, Нидерланды), аденовирусов — в ПЦР с использованием диагностической тест-системы «Adenovirus-EPh» («АмплиСенс», РФ) [4, 5].

Молекулярно-генетическая характеристика ПВ была выполнена на основании анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) двух значимых областей генома вируса, кодирующих N-концевую часть структурного белка VP1 (ПДРФ-1) и фрагмент неструктурного белка вирусной 3D-полимеразы (ПДРФ-3D1). Рестрикционное картирование амплифицированных фрагментов длиной 480 и 291 п.о. проводили с использованием эндонуклеаз («Promega», США) *HpaII*, *HaeIII*, *DdeI* и *RsaI*, *HaeIII*, *DdeI* соответственно для ПДРФ-1 и 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 [6].

Результаты и их обсуждение. В 2015 г. в стране был официально зарегистрирован 61 случай заболевания с синдромом ОВП у детей до 15 лет. Еще у одного ребенка в возрасте 23 мес. после подачи экстренного донесения был диагностирован закрытый перелом локтевой кости и случай был исключен из регистрации.

Национальный показатель регистрации ОВП в 2015 г. составил 4,0 на 100 тыс. детей в возрасте до 15 лет, что полностью соответствует показателю, рекомендованному ВОЗ, а именно не менее 1 на 100 тыс. Уровень выявления случаев ОВП в регионах республики колебался от 2,9 в Брестской и Гродненской областях до 5,3 — в Могилевской области (таблица 1).

Таблица 1. — Заболеваемость ОВП и показатели сбора двух образцов стула от детей в регионах страны в 2015 г.

Регионы	Случаи ОВП		С двумя образцами стула, собранными в течение 14 дней от начала паралича	
	абс.	0/000	абс.	0/000
Брестская область	7	2,9	6	85,7
Витебская область	8	4,6	8	100,0
Гомельская область	11	4,7	9	81,8
Гродненская область	5	2,9	2	40,0
г. Минск	14	4,8	14	100,0
Минская область	7	3,0	6	85,7
Могилевская область	9	5,3	9	100,0
Всего	61	4,0	54	88,5

Эпидемиологическое расследование всех случаев было проведено в течении первых 24 ч после регистрации. Все заболевшие дети были осмотрены врачами-неврологами как при госпитализации, так и через 60 дней после начала паралича для выявления остаточных неврологических симптомов.

Важным критерием качества надзора за ОВП является показатель своевременного сбора проб стула от пациентов — не менее чем у 80% пациентов должны быть собраны по 2 образца стула в течение первых 14 дней от начала паралича с интервалом в 24–48 ч.

В течение анализируемого периода времени от всех 61 заболевших детей были собраны по два образца стула с интервалом 24–48 ч между пробами. Все 122 образца стула были доставлены в НРЦП в трехдневный срок в соответствии с режимом доставки инфекционного материала и соблюдением условий холодовой цепи.

В то же время рекомендованные сроки сбора образцов от начала паралича были соблюдены не у всех пациентов. Так, у 7 детей из Гродненской (3), Гомельской (2), Брестской (1) и Минской (1) областей по ряду причин образцы стула были забраны в сроки позднее 14 дней от начала развития заболевания. Основной причиной несоблюдения сроков явилось позднее обращение родителей заболевших детей за медицинской помощью и, как следствие, позднее установление диагноза ОВП. Другой причиной несвоевременного сбора материала являлась неправильная постановка диагноза при первичном обращении в медицинское учреждение и поздняя последующая консультация детей с параличом врачами-неврологами.

В соответствии с критериями ВОЗ адекватно обследованными считались 54 ребенка, что составляет 88,5% от выявленных случаев ОВП (таблица 1).

Возрастное распределение случаев показало, что все заболевшие дети были старше 5 мес. и должны были получить курс первичной вакцинации против полиомиелита (три дозы вакцины); 7 (44,3%) обследованных детей были в возрасте от 6 мес. до 5 лет и 34 (55,7%) ребенка в возрасте от 6 до 14 лет. Однако только 57 из 61 ребенка получили полный курс вакцинации. Один ребенок вакцинирован не был, двое детей получили 1–2 дозы вакцины и еще у одного ребенка сведения о вакцинации отсутствовали. В соответствии с критериями ВОЗ эти 4 случая ОВП у детей, получивших менее трех доз вакцины или не имеющих информации о вакцинации против полиомиелита, были отнесены к «горячим» случаям, что потребовало особо тщательного внимания к клинико-эпидемиологическому и вирусологическому их обследованию.

В 3 из 4 «горячих» случаев отсутствие необходимой по возрасту вакцинации было обусловлено состоянием здоровья детей. Двое детей из Гродненской и Минской областей в соответствии с медицинскими показаниями прививались по индивидуальным календарям и не успели получить пол-

ный курс вакцинации, а непривитой ребенок из Гомельской области имел длительный медотвод от вакцинации.

Сведений о прививках не было у одного ребенка в возрасте 12 лет, который являлся гражданином Украины и до появления симптомов ОВП проживал на территории Беларуси около 4 мес.

Все 122 образца стула, полученные от детей с ОВП, были вирусологически исследованы в соответствии с рекомендациями ВОЗ на трех перевиваемых культурах клеток — L20B, RD, HEp2C. В результате вирусы были обнаружены в 3 образцах стула (4,9%) из 61 пациента. У всех детей вирусы выявлялись как в первом, так и во втором образцах.

От 1 (1,6%) ребенка был изолирован ПВ и еще у 2 (3,3%) детей выявленный в культуре клеток HEp2C ЦПА был представлен характерными для аденовируса клетками округлой формы. С помощью диагностической ПЦР к аденовирусам было подтверждено присутствие в данных образцах ДНК аденовируса (таблица 2).

Таблица 2. — Случаи ОВП с выделением кишечных вирусов в 2015 г.

Эпидномер/ возраст	Заключительный диагноз/ дата заболевания/ дата обследования	Вакцинация	№ штамма/ вирус/ год выделения
ВУ501-15-05 1 год 4 мес.	Монопарез нижней конечности/ 12.01.2015/ 13–14.01.2015	V3 ИПВ 02.07.2014	37381/ Аденовирус/2015
			37382/ Аденовирус/2015
ВУ304-15-16 3 года	Нейропатия левого седалищного нерва/ 03.03.2015/ 05–06.03.2015	Не проводилась	37411/ Аденовирус/2015
			37412/ Аденовирус/2015
ВУ501-15-31 2 года 1 мес.	Невропатия правого малоберцо- вого нерва/ 10.06.2015/10–14.06.2015	V5 ОПВ 05.06.2015	37465/ ПВ2/2015
			37466/ ПВ2/2015

Один из аденовирусов был изолирован от ребенка из г. Минска в возрасте 1 год и 4 мес., получившего в первый год жизни 3 дозы ИПВ. Ребенок был госпитализирован в стационар с высокой температурой и нарушением походки. Из образцов стула, собранных на 2 и 3-й дни заболевания, был выделен аденовирус. Обследование заболевшего врачами-неврологами при госпитализации и на 60-й день после появления паралича показало, что у ребенка был легкий монопарез нижней конечности без остаточных неврологических нарушений.

От непривитого ребенка из Гомельской области в возрасте 3 лет из образцов стула, собранных на 3 и 4-й дни заболевания, также был изолирован аденовирус. Клинические проявления ОВП у ребенка развились после стационарного лечения по поводу внегоспитальной очаговой пневмонии. При осмотре ребенка с диагностированной нейропатией левого седалищного нерва через 60 дней от начала заболевания остаточных параличей выявлено не было.

Являлись ли аденовирусы этиологическими агентами вызванных у детей заболеваний в нашем исследовании установлено не было.

В связи с тем, что в последние годы в Беларуси дети прививаются в соответствии с комбинированной ИПВ-ОПВ схемой вакцинации против полиомиелита частота выделения ПВ от детей с ОВП существенно снизилась. Так, в 2014 г. ПВ обнаруживались только у 2 (5,0%) из 40 детей с синдромом ОВП. Все изолированные вирусы относились к серотипу 3 и обнаруживались у детей в обоих образцах стула [7].

Единственный случай с выделением ПВ в 2015 г. был выявлен в г. Минске у ребенка в возрасте 2 года 1 мес. Родители заболевшего обратились за медицинской помощью в связи с появлением у ребенка прихрамывания на правую ногу при ходьбе, после чего ребенок был госпитализирован с ди-

агнозом «невропатия правого малоберцового нерва». В обоих образцах стула, собранных на 3 и 4-й дни от начала заболевания, был обнаружен ПВ (37465/ПВ2/2015 и 37466/ПВ2/2015). Ребенок прививался в соответствии с календарем прививок и получил дозу ОПВ (вторая ревакцинация) за 5 дней до начала развития заболевания. В течение недели от начала паралича все клинические проявления у ребенка исчезли. При осмотре врачами-неврологами через 60 дней никаких неврологических нарушений выявлено не было.

При серотипировании обнаруженного ПВ в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к ПВ трех серотипов было показано, что данный вирус присутствует в образце в виде мотипа, относящегося к серотипу 2.

Молекулярно-генетическое исследование штаммов 37465/ПВ2/2015 и 37466/ПВ2/2015 с помощью ПДРФ-анализа, основанного на рестрикционном картировании двух дистальных областей генома ПВ, кодирующих основной структурный белок VP1 и белок вирусной 3D-полимеразы, представило убедительные данные о принадлежности выявленных вирусов к вакцинным и их гомотипичной организации генома.

При сравнении рестрикционных профилей штаммов с профилями рестрикции эталонных вакцинных штаммов Себина серотипов 1, 2 и 3 было показано, что профили рестрикции исследуемых штаммов по сайтам рестрикции HpaII, HaeIII и DdeI в области VP1 полностью соответствуют профилям рестрикции эталонных штаммов Себина серотипа 2, что подтверждает их вакцинное происхождение.

Согласно результатам, полученным в ПДРФ-3D1 при рестрикции эндонуклеазами *RsaI*, *HaeIII*, *DdeI*, серотип анализируемых штаммов полностью совпадал, что свидетельствовало о нереккомбинантной природе вирусов.

На основании результатов вирусологического, молекулярно-генетического изучения вирусов и динамического клинического наблюдения случай был классифицирован как ОВП неполиомиелитной этиологии.

Вся информация по результатам вирусологических исследований случаев ОВП в 2015 г. еженедельно представлялась в Европейское региональное бюро ВОЗ в формате базы данных по заболеваниям, сопровождающихся синдромом ОВП (Laboratory Data Management System, LDMS).

В соответствии с МКБ-10 и на основании клинико-лабораторных данных Республиканской комиссией по диагностике полиомиелита была проведена заключительная классификация случаев ОВП.

Все (61) случаи ОВП у детей до 15 лет, зарегистрированные в 2015 г., были классифицированы как паралитические заболевания неполиомиелитной этиологии. Преобладающими нозологическими формами являлись инфекционно-аллергические нейропатии и мононевропатии нижней конечности — 32,8 и 23,0% соответственно. В число других паралитических синдромов вошли поражения нервных сплетений, энцефаломиелиты и нейромиалгический синдром.

Таким образом, в Республике Беларусь в 2015 г. выявление и расследование заболеваний с синдромом ОВП проводилось своевременно и в соответствии с требованиями, определенными ВОЗ. В течении года был зарегистрирован 61 случай ОВП у детей в возрасте до 15 лет. Показатель регистрации случаев составил 4,0 на 100 тыс. детей и был более 1,0 на 100 тыс. во всех регионах страны.

Эпидемиологическое расследование всех случаев было проведено в первые сутки от начала заболевания. Образцы стула у 88,5% заболевших были собраны в первые 14 дней. В нескольких случаях причинами несвоевременного сбора образцов явилось позднее обращение родителей за медицинской помощью.

Все образцы стула от детей были своевременно и в удовлетворительном состоянии доставлены в НРЦП. При вирусологическом исследовании образцов от 1 ребенка из г. Минска были изолированы 2 штамма ПВ, от 2 детей из г. Минска и Гомельской области — 4 штамма аденовирусов. В «горячих» случаях ПВ выделены не были, от 1 непривитого ребенка был выделен аденовирус.

Молекулярно-генетическое исследование штаммов 37465/ПВ2/2015 и 37466/ПВ2/2015 показало, что они являлись вакцинными и не были генетически модифицированы. Ни одного дикого или ВРПВ обнаружено не было.

На основании полученных данных все случаи ОВП были классифицированы как ОВП неполиомиелитной этиологии. Ни в одном из случаев с выделением вирусов остаточных явлений, характерных для полиомиелита, у детей не выявлено.

Литература

1. ВОЗ. Полиомиелит [Электронный ресурс]: информ. бюлл. — 2016. — № 114. — Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/ru/>. — Дата доступа: 01.09.2016.
2. Global Polio Eradication Initiative. Data and monitoring [Electronic resource]. — Mode of access: <http://www.polioeradication.org/dataandmonitoring/poliothisweek.aspx>. — Date of access: 01.09.2016.
3. 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. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, НИИ эпидемиологии и микробиологии. — Минск: ГУ РНМБ, 2008. — Вып. 1. — С. 319–322.
4. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита / ВОЗ. — Женева, 2005. — 112 с.
5. Adenovirus isolation rates in acute flaccid paralysis patients / О.Е. Ivanova [et al.] // J. Med. Virol. — 2012. — Vol. 84, № 1. — P. 75–80.
6. The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay / J. Balanant [et al.] // Virology. — 1991. — Vol. 184, № 2. — P. 645–654.
7. Молекулярно-генетическая характеристика вирусов, изолированных от детей с синдромом острого вялого паралича в Беларуси в 2012–2015 гг. / И.Ф. Ухова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. — Минск: ГУ РНМБ Минск, 2015. — Вып. 8. — С. 25–30. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

CLINICAL EPIDEMIOLOGICAL AND VIROLOGICAL EXAMINATION OF CHILDREN WITH A SYNDROME OF ACUTE FLACCID PARALYSIS IN BELARUS IN 2015

Uhava I.F.¹, Samoilovich E.O.¹, Yermalovich M.A.¹, Svirchevskaya E.Yu.¹, Yasinskaya L.A.²

*¹State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus;*

²Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus

In 2015 in Belarus registration of children with acute flaccid paralysis (AFP) syndrome and examination of 61 children with this syndrome were done with according to indicators of WHO. From two (3.3%) children were isolated adenoviruses, from a (1.6%) child — PV2. According to RFLP analysis polioviruses were vaccine strain with gomotypical genome organization. All AFP cases were classified as AFP of non-polio etiology.

Keywords: poliovirus, acute flaccid paralysis syndrome.

Поступила 06.09.2016

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ СЛЕЖЕНИЕ ЗА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Ханенко О.Н.¹, Коломиец Н.Д.¹, Тонко О.В.¹, Романова О.Н.², Каранкевич М.В.³, Красько А.Г.⁴

¹Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь;

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

*³Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии», Минск, Республика Беларусь;*

*⁴Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии
и микробиологии», Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Сформулированы подходы по осуществлению эпидемиологического слежения за легионеллезной инфекцией с использованием научно обоснованной концепции предэпидемической диагностики, основанной на своевременном распознавании предпосылок и предвестников возникновения легионеллеза. Определены допустимые показатели уровней контаминации *Legionella pneumophila* водных систем. Представлена методология анализа эпидемиологических рисков, связанных с развитием нозокомиального легионеллеза.

Ключевые слова: легионеллезная инфекция, эпидемиологическое слежение, лабораторная диагностика, эпидемиологические риски.

Введение. Легионеллезная инфекция остается одной из актуальных проблем здравоохранения. По данным ВОЗ, ежегодные показатели заболеваемости легионеллезной инфекцией варьируют в широких пределах, составляя в странах с высоким уровнем эпидемиологического надзора и отчетности (страны Европы, Австралии и США) в расчете на 1 млн жителей около 10–15 случаев [1].

В Республике Беларусь ежегодно регистрируются лишь единичные случаи заболевания легионеллезом при прогнозируемом количестве заболевших 100–150 человек в год, что, несомненно, свидетельствует о необходимости совершенствования подходов по осуществлению эпидемиологического слежения за инфекцией.

Цель работы — усовершенствование подходов к эпидемиологическому слежению за легионеллезной инфекцией в Республике Беларусь.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, моча, сыворотка крови 60 пациентов с пневмониями в возрасте от 2 до 60 лет, находившихся на лечении в больничных организациях здравоохранения Республики Беларусь. Критерием для включения явилось наличие пневмонии, имеющей клинические признаки легионеллеза [2, 3].

Для выделения и культивирования легионелл использовали буферный угольно-дрожжевой агар с α -кетоглутаровой кислотой (среда BCYEa) с добавлением L-цистеина и пиррофосфата железа. Для ускоренной идентификации легионелл применяли наборы для латекс-агглютинации: NEW Legionella latex Test производства Oxoid (Великобритания), позволяющий серотипировать *L. pneumophila* серогрупп 1–14 и *Legionellas pp.* Для обнаружения растворимого антигена в моче использовали иммунохроматографический тест производства «Oxoid» (Великобритания) в модификации, предназначенной для выявления антигенов *L. pneumophila* серогрупп 1 и 6. Для определения антител к легионеллам в сыворотке крови была использована тест-система Diagnostic Automation/Cortez Diagnostics, Inc. (США), позволяющая реализовать метод иммуноферментного анализа для качественного определения суммарных антител IgG/IgM/IgA к *L. pneumophila* серогруппы 1–6 в сыворотке крови человека.

Отбор проб воды осуществлялся в соответствии с требованиями СТБ ГОСТ Р 51592-2001 «Вода. Общие требования к отбору проб» и СТБ ГОСТ Р 51593-2001 «Вода питьевая. Отбор проб» и других действующих ТНПА на методы отбора. Доставку проб осуществляли в контейнерах, защищенных от солнечного света, при температуре +6–24°C. Начинали исследование немедленно при поступлении проб в лабораторию (от момента отбора проб время не превышало 2 ч). Для исследования воды использовали качественный и количественный микробиологический метод обнаружения легионелл, рекомендованный стандартами ИСО [4, 5]. Для ускоренной идентификации легионелл применяли наборы для латекс-агглютинации: NEW Legionella latex Test производства Oxoid (Великобритания), позволяющий серотипировать *L. pneumophila* серогрупп 1–14 и *Legionella spp.*

Для характеристики эпидемиологических особенностей легионеллезной инфекции использован эпидемиологический метод, включающий описательно-оценочные и аналитические приемы. Полученные цифровые данные обработаны с использованием методов статистики, адекватных поставленным задачам и объемам выборочных совокупностей. Для оценки частоты и структуры изучаемых явлений рассчитывали относительные показатели (р) со статистическими ошибками (Sp).

Результаты и их обсуждение. Будучи сугубо информационной системой, эпидемиологическое слежение служит, как известно, основой для разработки стратегии, тактики, рационального планирования, реализации, корректировки и повышения эффективности санитарно-противоэпидемических мероприятий. При этом обязательно должна учитываться эпидемиологическая характеристика инфекции [6, 7].

Легионеллез — сапронозная инфекция, возбудитель которой относят к водным микроорганизмам — сапрофитам, для человека являющихся случайными паразитами, реализующими свою патогенность. Одной из важнейших особенностей экологии легионелл считают их способность к образованию биопленок в совокупности с другими микроорганизмами, а также паразитирование в течение определенной части жизненного цикла в организме ряда простейших (амебы и инфузории). Обитающие в естественных водоемах легионеллы практически не представляют собой эпидемиологической опасности, поскольку накапливаются в незначительных количествах (не более чем 10^3 КОЕ/л). При температуре воды более 60°C легионеллы не выживают, от 60 до 50°C — теряют способность к размножению и постепенно погибают, ниже 20°C — остаются в состоянии вынуж-

денного покоя, не размножаясь, и лишь температурная зона выше 20°C и ниже 50°C является благоприятной для их размножения. В жидких средах при температуре 25°C легионеллы могут сохраняться 112 дней, при температуре 4°C — 150 дней. Легионеллы могут выживать в водопроводной воде до 1 года, в дистиллированной — 2–4 мес. Микроорганизмы быстро, за 1 мин, погибают под воздействием 70% спирта, 1% раствора формалина, 0,002% раствора фенола, в течение 10 мин — в 3% растворе хлорамина [2].

Высокие адаптивные способности легионелл в сочетании с благоприятными условиями выживания в техногенной среде позволяют им интенсивно размножаться в низкотемпературной системе водяного отопления; при аккумулировании холодной и горячей воды; наличии редко используемых кранов для нее; использовании водораспылительных насадок [2, 8, 9].

Потенциальными источниками инфицирования легионеллами могут быть: системы водоснабжения; градирни и испарительные конденсаторы; СПА-бассейны/природные бассейны, термальные источники; фонтаны/разбрызгиватели; оборудование для дыхательной терапии (аппараты для искусственного дыхания); герметично закрытые почвы/компост; моечные установки и омыватели стекол автомобилей; оборудование с водяным охлаждением.

В эпидемиологии легионеллеза по характеру приобретения инфекции различают три основные группы заболеваний: внебольничная пневмония легионеллезной этиологии (эпидемические вспышки и спорадические случаи), нозокомиальный легионеллез (внутрибольничная инфекция) и легионеллез, связанный с поездками и путешествиями (travel-associated legionellosis). Восприимчивость всеобщая, однако, чаще болеют мужчины. Факторами риска, предрасполагающими к заражению, являются первичные и вторичные иммунодефицитные состояния, иммуносупрессивная терапия, курение, некоторые хронические заболевания, например, диабет, сердечно-сосудистая патология [1, 8–10].

При осуществлении эпидемиологического слежения за легионеллезной инфекцией важным является своевременное распознавание факторов риска, проявление или активизация которых способны обусловить возникновение или активизацию эпидемического процесса, т. е. выявление предпосылок возникновения легионеллеза, среди которых:

- температура воды в системе водоснабжения между 20 и 50°C (температура воды является особенно важным фактором в управлении рисками при легионеллезной инфекции с безопасными критериями ниже 20 или выше 50°C);
- изношенность коммунальных сетей и устаревшее оборудование;
- эксплуатация системы водоснабжения с созданием условий, способствующих накоплению легионелл (застаивание воды, накопление отложений и другие факторы, приводящие к формированию и росту биопленок);
- использование систем кондиционирования с водным охлаждением (климатизации) с нарушениями эксплуатации, включая своевременную замену фильтров;
- использование медицинского оборудования, эксплуатация которого сопровождается выделением мелкодисперсного аэрозоля в условиях, когда отсутствует или утерян контроль в отношении рисков, связанных с легионеллезной инфекцией.

Предвестники осложнения эпидемиологической ситуации — это признаки начавшейся активизации процесса, свидетельствующие о возникшей возможности перерастания сложившейся ситуации в манифестные проявления эпидемического процесса [6]. В случае легионеллеза — это, в первую очередь, превышение допустимых показателей уровней контаминации легионеллами водных систем, потенциально опасных в отношении распространения легионеллезной инфекции.

Всего из исследованных нами 67 образцов воды, взятых из различных водных объектов, из которых 37 (55%) — из кранов подачи горячей воды, в 7 (18,9±6,4%) образцах горячей воды и 4 (13,3±6,2%) холодной воды были обнаружен рост колоний *Legionella spp.* Серотипирование выделенных штаммов позволило отнести их к *L. pneumophila* серогрупп 2–14. Концентрация легионелл в положительных образцах находилась в пределах $3,0 \times 10^3$ – $5,0 \times 10^4$ КОЕ/л, при этом каких-либо достоверных различий между образцами горячей и холодной воды установлено не было.

При исследовании проб объектов окружающей среды больничных организаций здравоохранения легионеллы были обнаружены в 16 (15,7±3,6%) из 102 исследованных образцов. Выделенные микроорганизмы были типированы методом агглютинации в одном случае как *L. pneumophila*

серогруппы 1 и в 15 случаях как *L. pneumophila* серогруппы 2–14. Легионеллы выделяли из горячей воды, воды приточно-вытяжных теплообменников, бойлеров, холодной воды и смывов с сеточек душа. Хотя в основном наблюдалась низкоуровневая контаминация от $2,0 \times 10^2$ до $6,0 \times 10^3$ КОЕ/л, в одном из смывов с сеточки душа она достигла концентрации способной вызвать инфицирование — $5,0 \times 10^4$ КОЕ/л.

По результатам исследований и на основании изучения литературных источников нами определены следующие допустимые показатели уровней контаминации *L. pneumophila* различных объектов окружающей среды (таблица 1).

Таблица 1. — Допустимые показатели уровней контаминации *L. pneumophila* различных объектов окружающей среды

Объекты окружающей среды	Допустимые показатели концентрации <i>L. pneumophila</i>
Вода различных объектов окружающей среды, вода бассейнов, аквапарков и др.	Не более 100 КОЕ/л
Система охлаждения промышленных предприятий и кондиционирования воздуха в общественных зданиях	Не более 10000 КОЕ/л
Система водоснабжения	Не более 1000 КОЕ/л
Джакузи общественного пользования	Не более 10 КОЕ/л
Вихревые ванны	Не более 10 КОЕ/л
Системы водоснабжения организаций здравоохранения	Не более 50 КОЕ/л
Системы водоснабжения стационарных учреждений социального обслуживания	Не более 50 КОЕ/л
Смывы с объектов (оборудования для кондиционирования и вентиляции, водонагревательных и охладительных систем, медицинской техники и изделий медицинского назначения и т. д.)	0
Соскобы биопленок с поверхности водопроводного, промышленного, лабораторного и иного оборудования, связанного с циркуляцией и хранением воды	0

Сочетание высокой концентрации легионелл в водной среде с источником мелкодисперсного аэрозоля позволяет возбудителю легко проникать в респираторные отделы легких, где происходит контакт с альвеолярными макрофагами и активное его размножение. Важными факторами являются также восприимчивость человека и вирулентность штамма легионелл. Хотя величина инфицирующей дозы не установлена, известно, что заражение здоровых людей происходит при наличии значительного количества легионелл в воде (более 10^4 КОЕ/л). После экспозиции легионеллезная пневмония (болезнь легионеров) развивается у 5–10% лиц, в то время как лихорадка Понтиак может развиваться у 80–100% людей, оказавшихся в зоне действия контаминированного источника. Для иммуносупрессивных пациентов эта доза может быть значительно меньше, особенно если экспозиция была связана с *L. pneumophila* серогруппы 1, вызывающей нозокомиальную инфекцию, в т. ч. болезнь легионеров и острый альвеолит [2, 8–10].

Для ранжирования эпидемиологических рисков мы рассмотрели 2 ситуации:

- обнаружение *L. pneumophila* серогруппы 1;
- обнаружение *L. pneumophila* серогруппы 2–14.

Вероятность присутствия оценивалась как возможная (1 балл) и вероятная (2 балла).

Уровень риска развития заболевания определялся по следующим категориям: В — «высокий», С — «средний», Н — «низкий». Анализировалась степень эпидемиологической опасности при воз-

действию на пациентов из группы риска или не отнесенных к ней. Результаты данных исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2. — Ранжирование эпидемиологических рисков по вероятности возникновения и значимости последствий (уровень риска развития заболевания)

Характеристика объекта	<i>L. pneumophila</i> серогруппы 1	<i>L. pneumophila</i> серогруппы 2–14	Вероятность присутствия	Уровень риска	
				для пациентов групп риска	для других пациентов
Вода приточно-вытяжного теплообменника	+		1	В	В
		+	2	В	С
Вода из кранов горячего водоснабжения	+		1	В	В
		+	2	В	С
Вода из кранов холодного водоснабжения	+		1	В	С
		+	1	В	Н
Вода из бойлера	+		1	В	В
		+	2	В	С
Слив (вода) со шлангов подачи воды, ванн для подводного массажа и умывальников	+		1	В	С
		+	1	В	Н
Смывы с сеточек душа	+		1	В	В
		+	2	В	В
Смывы с вентиляционных решеток	+		1	В	С
		+	1	В	Н
Смывы с аппаратов ИВЛ	+		1	В	В
		+	1	В	В

Для пациентов из групп риска присутствие в любом из анализируемых объектов *L. pneumophila* серогруппы 1, *L. pneumophila* серогруппы 2–14 отнесено нами по значимости последствий к высокому уровню риска развития заболевания. В этом случае особое внимание следует уделить системам, образующим мелкодисперсный аэрозоль.

Для пациентов, не входящих в группу риска, в случае контаминации *L. pneumophila* серогруппы 1 высокую степень риска развития легионеллеза представляют такие объекты, как вода приточно-вытяжного теплообменников, горячая вода, вода из бойлеров, сеточки душа, аппараты ИВЛ. Вода из кранов холодного водоснабжения, слив (вода) со шлангов подачи воды, ванн для подводного массажа и умывальников, вентиляционные решетки в данном случае могут быть отнесены к среднему уровню риска развития легионеллеза.

В случае контаминации *L. pneumophila* серогруппы 2–14 для пациентов, не относящихся к группе риска, высокую значимость будут иметь аппараты ИВЛ и сеточки душа; средняя степень риска может быть связана с водой приточно-вытяжного теплообменника, горячей водой и водой из бойлеров. Холодная вода, сливы из шлангов, вентиляционные решетки могут быть отнесены к объектам с низкой степенью риска.

Поскольку до начала наших исследований клинический диагноз легионеллезной инфекции не устанавливался, мы исследовали сыворотки крови от 40 пациентов с пневмониями неустановленной этиологии и 20 пациентов со злокачественными новообразованиями и пневмонией на наличие антител к легионеллам в ИФА. Данный метод не входит в стандарты клинической диагностики, рекомендованные ВОЗ, однако нами этот метод был использован для предварительных скрининговых

исследований. Всего было получено 4 положительных результата: 1 из 40 проб и 3 из 21 пробы от 20 пациентов со злокачественными новообразованиями. Один из обследованных пациентов имел в моче растворимый антиген легионелл. Этот тест был поставлен с помощью иммунохроматографического теста производства «Oxoid» (Великобритания) в модификации, предназначенной для выявления антигенов *L. pneumophila* серогрупп 1 и 6. По рекомендации ВОЗ данный тест является одним из экспертных методов лабораторной диагностики легионеллеза. Парные сыворотки от этого пациента оказались положительными. Таким образом, была подтверждена легионеллезная инфекция у одного пациента.

Заключение. Эпидемиологическое слежение за легионеллезной инфекцией должно основываться на использовании научно обоснованной концепции предэпидемической диагностики со своевременным распознаванием предпосылок и предвестников возникновения легионеллеза и внедрением в практическое законодательство допустимых показателей уровней контаминации *L. pneumophila* водных систем, а также методологических подходов по анализу эпидемиологических рисков.

Литература

1. Легионеллез [Электронный ресурс] // Информ. бюлл. ВОЗ. — 2014. — № 285. — Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs285/ru/>. — Дата доступа: 01.11.2014.
2. Профилактика, диагностика и лечение легионеллеза / И.С. Тартаковский [и др.]. — М.: Студия МДВ, 2013. — 344 с.
3. Fatal hospital-acquired *Legionella pneumonia* in a neonate / Y. Shachor-Meyouhas [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 2010. — Vol. 29, № 3. — P. 280–281.
4. ISO 11731:1998 «Water quality detection and enumeration of *Legionella*».
5. ISO 117312:2004 «Water quality Detection and enumeration of *Legionella*. Part 2: Direct membrane filtration for waters with low bacterial count».
6. Черкасский, Б.Л. Эпидемиологический диагноз / Б.Л. Черкасский. — М.: Медицина, 1990. — 208 с.
7. Брико, Н.И. Эпидемиология: учебник / Н.И. Брико, В.И. Покровский. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. — 368 с.
8. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet). Operating procedures [Electronic resource] / European Centre for Disease Prevention and Control. — 2012. — Mode of access: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/1202-ted-eldsnet-operatingprocedures.pdf>. — Date of access: 02.10.2015.
9. EWGLI Technical Guidelines for the Investigation, Control and of Travel Associated Legionnaires disease [Electronic resource] / The European Working Group for Legionella Infections. — 2011. — Mode of access: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/eldsnet/documents/ewgli-technical-guidelines.pdf>. — Date of access: 02.10.2015.
10. *Legionella and the prevention of legionellosis* / J. Bartram [et al.]. — Geneva: WHO, 2007. — 252 pp.

EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE FOR LEGIONELLA INFECTION

Hanenko O.N.¹, Kolomiets N.D.¹, Tonko O.V.¹, Romanova O.N.², Karankevich M.V.³, Krasko A.G.⁴

¹State Educational Institution “Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education”,
Minsk, Republic of Belarus;

²Educational Institution “Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus;

³State Institution “Republican Research & Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology & Immunology”,
Minsk, Republic of Belarus;

⁴State Institution “Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus

The approaches for the implementation of epidemiological surveillance for *Legionella* infection with the use of evidence-based concept of pre-epidemic diagnosis based on the timely recognition of assumptions and precursors occurrence of legionellosis. The permissible indicators of contamination levels of *Legionella pneumophila* water systems. The methodology of the analysis of the epidemiological risks associated with the development of nosocomial *Legionella* infection.

Keywords: *Legionella* infection, epidemiological surveillance, laboratory diagnosis, epidemiological risks.

Поступила 29.07.2016

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
БИОПТАТОВ СИНОВИАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКИ И СУСТАВНОГО ХРЯЩА,
СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ
С АВАСКУЛЯРНЫМ НЕКРОЗОМ ГОЛОВКИ БЕДРА**

Асташонок А.Н.¹, Рубаник Л.В.¹, Мурзич А.Э.², Эйсмонт О.Л.², Пашкевич Л.А.²,
Мохаммади Т.², Полещук Н.Н.¹

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

²Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр травматологии
и ортопедии», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Обследовано 89 пациентов с аваскулярным некрозом головки бедра (АНГБК). С использованием молекулярно-биологического и иммуноферментного анализа в синовиальной жидкости у некоторых из них обнаружены видоспецифические антитела и ДНК возбудителей (*Chlamydia trachomatis*, вирусу простого герпеса I и II типов, цитомегаловирусу, вирусу Эпштейна–Барр). Наиболее часто как в сыворотке крови, так и синовиальной жидкости детектировались IgG к МOMP и плазмидному белку pgp3 *C. trachomatis*. Охарактеризованы ультраструктурные параметры репаративно-дистрофических изменений в поверхностном и глубоком коллагеново-эластическом комплексе синовиальной оболочки и матриксе суставного хряща. Полученные данные указывают на особую роль хламидийной инфекции и герпесвирусов в патогенезе заболевания.

Ключевые слова: аваскулярный некроз головки бедра, микробиологический анализ, синовиальная оболочка, суставной хрящ, электронная микроскопия.

Введение. Число случаев заболеваний, связанных с хроническим воспалением костно-суставной системы, в последние годы неуклонно растет [1, 2]. Среди них АНГБК является наиболее тяжелой формой патологии, при которой происходит гибель участка субхондральной кости и ее коллапс [3]. В конечном счете поражение синовиальной оболочки, суставного хряща, элементов костного мозга и кости на более поздних стадиях болезни приводит к дегенеративным изменениям головки бедра и артрозу тазобедренного сустава.

Страдают АНГБК как мужчины, так и женщины трудоспособного (30–55 лет) возраста [1, 4]. В большинстве стран мира АНГБК — основная причина эндопротезирования. Эпидемиологические исследования показали, что в Западной Европе, США заболеваемость составляет более 600 тыс. случаев в год, т. е. 15–20% всех болезней опорно-двигательного аппарата [4]. В Республике Беларусь также отмечается неуклонный рост данной патологии среди лиц молодого и среднего возраста, что и обуславливает актуальность исследований.

В последние годы активно обсуждается информация о возможной роли инфекционных агентов в суставной патологии. Об этом свидетельствуют данные обнаружения специфических антител и антигенов возбудителей в суставной жидкости и периартикулярных тканях пораженных суставов. Имеются сообщения о детекции в синовиальной жидкости и оболочке, хрящевой ткани различных патогенов, таких как *C. trachomatis*, *Borrelia burgdorferi*, *M. pneumoniae*, вирусов семейства *Herpesviridae* (цитомегаловируса, вируса Эпштейна–Барр, вируса герпеса II и VI типов), парвовируса B19, вируса краснухи и т. д. [5–7]. Однако истинная роль бактериальных и вирусных агентов в патогенезе АНГБ остается малоизученной.

Цель работы — микробиологический и электронно-микроскопический анализ биоптатов синовиальной оболочки и суставного хряща, синовиальной жидкости и сыворотки крови, полученной от пациентов с аваскулярным некрозом головки бедра.

Материалы и методы. За 2014–2016 гг. проведено комплексное лабораторное обследование 89 пациентов с АНГБ, находящихся на стационарном лечении в Государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии» г. Минска. Возраст пациентов — от 18 до 57 лет (41±11 лет), соотношение мужчин и женщин — 4:1. Объектами исследования являлись: сыворотка крови, синовиальная жидкость, синовиальная оболочка, суставной хрящ.

Взятие синовиальной жидкости осуществлялось по показаниям путем выполнения пункции тазобедренного сустава. Образцы биоптатов синовиальной оболочки, суставного хряща забирали при проведении плановой операции эндопротезирования и помещали во флакон со стерильным физиологическим раствором. Всего исследовано 85 сывороток крови, 59 образцов синовиальной жидкости, 51 образец синовиальной оболочки и 53 образца суставного хряща.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Для выявления противохламидийных антител классов IgM, IgA и IgG использовали ИФА наборы «Хламибест *C.trachomatis*-IgM», «Хламибест *C.trachomatis*-IgA» и «Хламибест *C.trachomatis*-IgG». Обнаружение IgG к белку теплового шока (сHSP60) хламидий проводили с помощью набора реagens «Хламибест сHSP60-IgG». Выявление IgG к главному белку наружной мембраны (МOMP) и плазмидному белку pgp3 *Chlamydia trachomatis* проводили, используя набор «Хламибест МOMP+pgp3-IgG». Для выявления специфических антител к вирусам семейства *Herpesviridae* использовали тест-системы «ВектоВПГ-IgG», «ВектоВПГ-IgM», «ВектоЦМВ-IgG», «ВектоЦМВ-IgM», «ВектоВЭБ-VCA-IgM», «ВектоВЭБ-EA-IgG». Все тест-системы производства АО «Вектор-Бест» (РФ).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Выделение нуклеиновой кислоты из синовиальной ткани и жидкости проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ) согласно инструкции производителя.

Выявление ДНК хламидий проводили с помощью ПЦР набора «АмплиСенс *Chlamydia trachomatis*-Eph». Наличие ДНК герпесвирусов определяли с использованием ПЦР-наборов «АмплиСенс HSVI,II-EPh», «АмплиСенс CMV-EPh» и «АмплиСенс EBV-EPh». Обнаружение ДНК микоплазм осуществляли с использованием ПЦР наборов «АмплиСенс *Mycoplasma genitalium*-FL», «АмплиСенс *Mycoplasma hominis*-FL», «АмплиСенс *Ureaplasma urealyticum/Ureaplasma parvum*-FL». Детекцию ДНК парвовируса В19 проводили с помощью ПЦР набора «АмплиСенс *Parvovirus B19*-FL». Все наборы производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (РФ).

Электронная микроскопия. Образцы исследуемого материала (синовиальная оболочка, суставной хрящ) нарезают на серию из 20–40 фрагментов небольшого размера (до 1 мм³) и далее фиксируют в 2,5% глутаровом альдегиде, приготовленном на 0,1 М какодилатном буфере (pH = 7,4). После трехкратного промывания в буфере последующую фиксацию проводили 1% OsO₄. Затем образцы промывали в том же буфере, обезживали этанолом возрастающей концентрации (30; 50; 70; 96 и 100%), после чего дополнительно обрабатывали ацетоном и заливали смесью смолы марки Spurr (EM0300, Sigma). Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Ultracut E («Reichert», Австрия), контрастировали 1% уранилацетатом и лимонно-кислым свинцом и исследовали на микроскопе JEM-1011 («Jeol», Япония) при инструментальных увеличениях: x10 000–x100000.

Результаты и их обсуждение. Проведено комплексное лабораторное обследование пациентов с аваскулярным некрозом головки бедра с использованием серологических, молекулярно-биологических и электронно-микроскопических методов.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Методом ИФА в синовиальной жидкости у 2 из 59 (3,4%) пациентов обнаружены IgA к МOMP *Chlamydia trachomatis* в титре 1:5. У 5 (8,5%) человек отмечались IgG в титре от 1:5 до 1:80; IgG к МOMP и плазмидному белку pgp3 *Chlamydia trachomatis* выявлены в 8 (13,6%) образцах СЖ в титрах от 1:5 до 1:10. Иммуноглобулины класса М к МOMP *Chlamydia trachomatis* и IgG к белку теплового шока (HSP60) хламидий отмечены по 1 из 59 (1,7%) исследуемых образцов.

IgG к вирусу простого герпеса (ВПГ) 1 и 2-го типа определены у всех обследованных пациентов. Серопозитивными по IgG к цитомегаловирусу (ЦМВ) были 94,9% СЖ. В трех образцах (5,1%) IgG к ЦМВ не обнаружено. При этом IgM к ВПГ 1 и 2-го типа и ЦМВ у них также не обнаруживались. Ни в одном из исследованных случаев не были обнаружены специфические IgM к капсидному антигену вируса Эпштейна–Барр. В 5 случаях (8,5%) выявлены IgG к раннему антигену вируса Эпштейна–Барр.

Дополнительно проведенный ИФА анализ 85 сывороток крови пациентов с признаками некроза головки бедра показал следующие результаты. IgM к МOMP *Chlamydia trachomatis* отмечен у 3 (3,5%) пациентов; IgA к МOMP *Chlamydia trachomatis* в титре от 1:5 до 1:10 были обнаружены в 7 образцах (8,2%), IgG — в 16 случаях (18,8%) в титрах от 1:5 до 1:160; IgG к МOMP и плазмидному белку pgp3 *Chlamydia trachomatis* выявлены в 20 (23,5%) сыворотках в титрах от 1:5 до 1:20.

Шесть сывороток (7,1%) были положительными при исследовании на IgG к белку теплового шока (сHSP60) хламидий.

Серопозитивными по IgG к ВПГ 1 и 2-го типа были 83 из 85 (97,7%) сывороток крови, в двух образцах (2,3%) IgG не обнаружены. При этом IgM к ВПГ 1 и 2-го типа детектированы в 7 (8,2%) случаях; IgG к цитомегаловирусу определены у всех 85 (100%) обследованных пациентов. В 13 из 85 (15,3%) сыворотках выявлены антитела класса М к ЦМВ. При исследовании на специфические IgM к капсидному антигену вируса Эпштейна–Барр 4 сыворотки из 85 (4,7%) были положительными; IgG к раннему антигену вируса Эпштейна–Барр обнаружены в 6 образцах (7,1%).

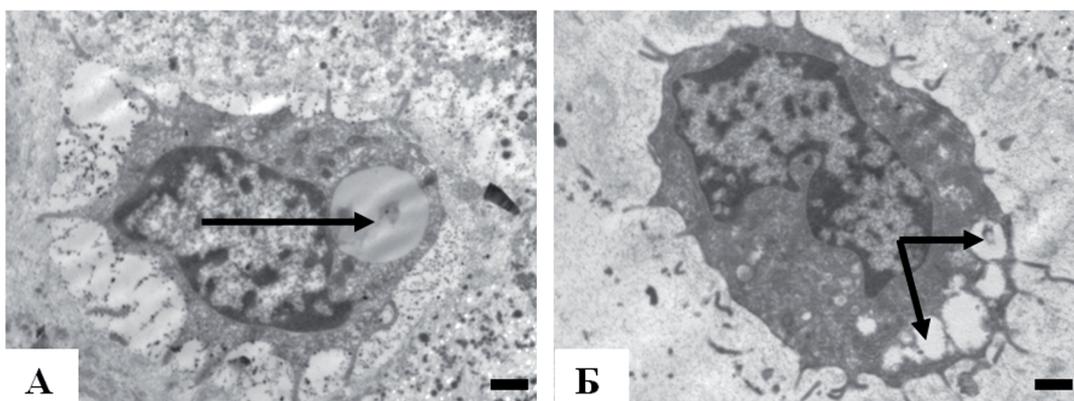
Молекулярно-генетический анализ. Результаты ПЦР-исследования синовиальной жидкости тазобедренного сустава 59 пациентов показали наличие ДНК ВПГ 1 и 2-го типа в 3 (5,1%) образцах, ДНК цитомегаловируса — в 2 (3,4%), ДНК вируса Эпштейна–Барр — в 9 (15,3%). В 3 (5,1%) образцах обнаружена ДНК *S. trachomatis*.

В синовиальной оболочке у 1 из 51 (2,0%) пациента обнаружена ДНК цитомегаловируса и у 1 (2,0%) — фрагмент НК плазмиды *S. trachomatis*. НК вируса Эпштейна–Барр обнаружена в 9 (17,7%) образцах.

В хрящевой ткани тазобедренного сустава в 2 из 53 (3,8%) случаев детектирована ДНК *S. trachomatis*. В 1 случае (1,9%) обнаружена ДНК ВПГ 1 и 2-го типа. В 4 случаях (7,6%) обнаружена ДНК вируса Эпштейна–Барр.

Электронно-микроскопический анализ

Суставной хрящ. Ультраструктурные исследования показали, что во всех исследованных биоптатах суставного хряща обнаруживались признаки нарушения клеточно-матриксной архитектоники (рисунок 1).



А — липидсодержащая вакуоль умеренной электронной плотности в цитоплазме хондроцита;
Б — формирование множества электронно-прозрачных вакуолей в цитоплазме хондроцита

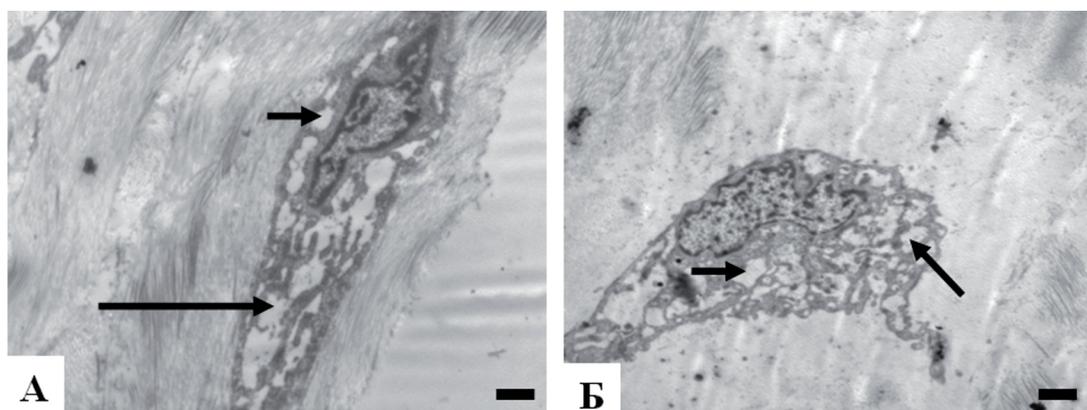
Рисунок 1. — Электронные микрофотографии участков ультратонких срезов хондроцитов суставного хряща пациентов с аваскулярным некрозом головки бедра (маркерный отрезок — 100 нм)

В хондроцитах I и II типа чаще отмечались собственно дистрофические изменения, реже — репаративно-восстановительные процессы. Ультраструктура клеток с грубыми дистрофическими проявлениями характеризовалась компактизацией ядрышка с потерей гранулярного компонента и исчезновением примембранного хроматина. В некоторых случаях отмечалась полная сегрегация гранулярного и фибриллярного компонента ядрышка. Внутриядерный хроматин был представлен плотными глыбками с перераспределением вдоль внутренней ядерной мембраны. Ядерные поры не просматривались. В цитоплазме обращали на себя внимание грубые изменения гранулярного эндоплазматического ретикулума с потерей рибосом и разбуханием цистерн. Цитоплазма заполнялась вакуолями за счет гиперплазии мембран аппарата Гольджи. Выявленные изменения указывали на частичное или даже полное блокирование белкового синтеза и гибели клеток по типу гидропической дистрофии.

Несколько другой тип изменений, который отмечался в 15% случаях, выявлен в хондроцитах, примыкающих к зонам дегградации коллагенсодержащего матрикса. Цитоплазма этих хондроцитов характеризовалась повышенным содержанием вторичных лизосом и фаголизосом, заполняющих до 1/3 ее площади на фоне накопления микрофиламентов, образующих плотные тяжи. Митохондрии выглядели гиперхромными. Выявленные изменения указывали, с одной стороны, на активацию макрофагальной функции хондроцитов, а с другой — на снижение их секреторной и возможно коллагенобразующей функции.

Значительно реже (около 10%) отмечались хондроциты, в цитоплазме которых происходило накопление одиночных или множественных «липидсодержащих» включений. Последние могут быть связаны с аккумуляцией кальция и нарушением его клеточного обмена. Известно, что митохондрии хондроцитов принимают участие в активном транспорте кальция и минерализации внеклеточного матрикса. Выявленные изменения, на наш взгляд, отражают процесс нарушения выхода кальция из клетки, что приводит в дальнейшем к ее «минерализации».

Синовиальная оболочка. При исследовании биоптатов синовиальной оболочки наблюдались очаги деструкции синовиальных клеток (рисунок 2). Отмечены структурные признаки нарушения целостности капилляров (явление стаза), дислипидемия, изменения белкового и энергетического аппарата синовиоцитов: расширение мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи, набухание митохондрий преимущественно в «фибробластоподобных» (В-клетки) синовиоцитах.



А, Б — гиперплазия мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, разрыхление цитоплазмы синовиоцита, митохондрии с просветленным матриксом и единичными кристами

Рисунок 2. — Ультраструктура синовиоцитов при аваскулярном некрозе головки бедра (маркерный отрезок — 100 нм)

Таким образом, в результате электронно-микроскопического изучения синовиальной жидкости и синовиальной ткани пациентов были отмечены разнонаправленные ультраструктурные изменения хондроцитов суставного хряща и синовиоцитов (А- и В-клеток) тазобедренного сустава, отражающие как процессы собственно дистрофии, так и внутриклеточные восстановительно-репаративные реакции в сохранившихся клетках, не вовлеченных в патологический процесс. Описана картина морфологических изменений клеточных органелл и охарактеризованы патогномичные признаки, которые могут являться маркерами развития аваскулярного некроза головки бедра.

Заключение. У обследованных пациентов с АНГБК комплексный микробиологический анализ позволил выявить различные патогены в очагах локального повреждения соединительнотканых элементов опорно-двигательного аппарата. Специфические антитела к *S. trachomatis* и вирусов группы герпеса (ВПГ 1 и 2-го типа, цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барр) выявлены не только в сыворотке крови, но и синовиальной жидкости. Полученные данные указывают на возможность становления генерализованной формы инфекционного процесса с повреждением локальных участков гемо-тканевого барьера. Ультраструктурный анализ позволил выявить и охарактеризовать в хондроцитах I и II типа как собственно дистрофические, так и репаративные процессы. Это в совокупности свидетельствует об особой роли микробно-вирусных ассоциаций в патогенезе АНГБК.

Литература

1. Нирнберг, Д. Идиопатический аваскулярный некроз головки бедра / Д. Нирнберг, М. Идельман, М. Штейн // Междунар. мед. журн. — 1998. — № 2. — С. 179–182.
2. Проценко, Г.А. Асептический некроз костной ткани в ревматологии / Г.А. Проценко // Украин. ревматолог. журн. — 2012. — № 3. — С. 52–57.
3. Сустав: морфология, клиника, диагностика, лечение / И.Н. Павлова [и др.]. — М.: Мед. информ. агентство, 2011. — 552 с.
4. Насонова, В.А. Остеонекроз тазобедренного сустава / В.А. Насонова // Cons-Med. — 2003. — № 8. — С. 1–11.
5. Detection of rubella, mumps, and measles virus genomic RNA in cells from synovial fluid and peripheral blood in early rheumatoid arthritis / D. Zhang [et al.] // J. Rheumatol. — 1997. — Vol. 24, № 7. — P. 1260–1265.
6. Geipel, U. Pathogenic organisms in hip joint infections / U. Geipel // Int. J. Med. Sci. — 2004. — Vol. 6, № 5. — P. 234–240.
7. Современное состояние проблемы диагностики и лечения аваскулярного некроза головки бедра у взрослых / А.В. Белецкий [и др.] // Мед. новости. — 2013. — № 7. — С. 25–30.

MICROBIOLOGICAL AND ELECTRON MICROSCOPICAL ANALYSIS OF BIOPSY SPECIMENS OF THE SYNOVIUM, ARTICULAR CARTILAGE, SYNOVIAL FLUID AND SERUM OF PATIENTS WITH AVASCULAR NECROSIS OF THE FEMORAL HEAD

Astashonok A.N.¹, Rubanik L.V.¹, Murzich A.E.², Eysmont O.L.², Pashkevich L.A.², Mohammadi T.², Poleschiuk N.N.¹

¹State Institution “Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus;

²State Institution “Republican Research & Practical Center for Traumatology & Orthopedics”,
Minsk, Republic of Belarus

In this study 89 patients with avascular necrosis of the femoral head were involved. Using molecular biological and immunoassay in the synovial fluid of some of them antibodies and DNA to *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex virus types I and II, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus were found. Most frequently in serum and synovial fluid were detected IgG to MOMP protein and plasmid (pgp3) protein of the *C. trachomatis*. The ultrastructural parameters of reparative and degenerative changes in the surface and deep-collagen complex, elastic matrix and synovial membrane of the articular cartilage were characterized. The findings point to the special role of chlamydial infection and herpes viruses in the pathogenesis of the disease.

Keywords: avascular necrosis of the femoral head, microbiological analysis, the synovium, articular cartilage, electron microscopy.

Поступила 16.09.2016

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С КЛЕЩЕВЫМ ЭНЦЕФАЛИТОМ, БОЛЕЗНЬЮ ЛАЙМА И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ДЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Дракина С.А.¹, Князева О.Р.¹, Щерба В.В.², Анисько Л.А.², Самойлова Т.И.¹, Красько А.Г.¹

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

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

Реферат. Представлены результаты исследования 236 образцов сыворотки крови от пациентов с клещевыми инфекциями, различными клиническими проявлениями и воспалительными демиелинизирующими заболеваниями ЦНС и лиц, отмечавших присасывание клещей без клинических проявлений на наличие антител (АТ) к клещевому энцефалиту (КЭ), болезни Лайма (ЛБ), гранулоцитарному анаплазмозу человека (ГАЧ) и моноцитарному эрлихиозу человека (МЭЧ). АТ к КЭ выявлялись только у пациентов с клиническим диагнозом КЭ. АТ к ЛБ обнаружены во всех 3 пред-

ставленных группах: при КЭ — у 3 пациентов, что может указывать на микст-инфекцию (КЭ+ЛБ), в сыворотках от пациентов с демиелинизирующими заболеваниями и с различными поражениями нервной системы — в 36,6% случаях. АТ к ГАЧ определены в сыворотках крови у лиц, имевших присасывание клещей в анамнезе без клинических проявлений. АТ к МЭЧ отсутствовали.

Ключевые слова: антитела, клещевой энцефалит, болезнь Лайма, гранулоцитарный анаплазмоз человека, моноцитарный эрлихиоз человека.

Введение. Природно-очаговые инфекции, переносимые клещами, представляют собой серьезную проблему для практического здравоохранения республики. Известно, что клещи рода *Ixodes* (*I. persulcatus*, *I. ricinus*) являются переносчиками вирусных, бактериальных и протозойных инфекций. В одном переносчике может обнаруживаться до 8 патогенных для человека агентов. Из них на территории Республики Беларусь наиболее широко распространены клещевой энцефалит, вызываемый вирусом клещевого энцефалита (КЭ), и клещевой боррелиоз (ЛБ или болезнь Лайма), вызываемый спирохетами комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Выявляются также гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ), моноцитарный эрлихиоз (МЭЧ), риккетсиозы, бабезиоз, возбудитель туляремии [1, 2]. При присасывании клеща человеку может передаваться как моноинфекция, так и несколько инфекций в различных сочетаниях и разнообразных клинических проявлениях [3, 4].

Цель работы — изучение частоты выявления специфических к возбудителям клещевых инфекций (КИ) антител (АТ) как при клещевых инфекциях, так и различных клинических проявлениях преимущественно с поражением ЦНС и у лиц с присасыванием клещей в анамнезе.

Материалы и методы. Исследовано 236 образцов сыворотки крови от пациентов с клещевыми инфекциями на наличие антител к КЭ, ЛБ и ГАЧ, которые проходили лечение в УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска. По клиническим диагнозам распределение было следующим: КЭ — 51 пациент, ЛБ — 185.

106 образцов сывороток — на КЭ, ЛБ, ГАЧ и МЭЧ от пациентов с различными клиническими проявлениями и воспалительными демиелинизирующими заболеваниями ЦНС (ДЗ), отрицавшие присасывание клеща и госпитализированные в РНПЦ неврологии нейрохирургии.

64 сыворотки — от лиц, отмечавших присасывание клещей и обратившиеся по этому поводу в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

На Лайм-боррелиоз сыворотки крови исследовали методом НРИФ (тест-система для выявления суммарных антител к возбудителю болезни Лайма методом непрямой иммунофлуоресценции «НИФМ-Лайм-АТ»), на КЭ — методом ИФА (тест-система для выявления суммарных антител к вирусу клещевого энцефалита методом иммуноферментного анализа «ИФА-КЭ-АТ», разработанная в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии), на МЭЧ и ГАЧ — методом ИФА с применением тест-систем: ГАЧ-ИФА-IgM, ГАЧ-ИФА-IgG, МЭЧ-ИФА-IgM, МЭЧ-ИФА-IgM фирмы «Омникс» (г. Санкт-Петербург, РФ). Результат НРИФ и ИФА оценивали по нарастанию титров антител общепринятыми методами, а при использовании тест-систем фирмы «Омникс» — по коэффициенту серопозитивности (КС) в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты и их обсуждение. У всех пациентов диагноз КЭ подтвержден на основании клинической картины и выявлением методом ИФА антител класса IgM — у 48 пациентов и IgG — у 39 пациентов (таблица 1). Кроме того, в сыворотках крови у 3 пациентов выявлены антитела класса IgM и IgG к возбудителю болезни Лайма в титрах 1:16 и 1:64 соответственно и у 16 — IgG в титрах 1:64–1:1024.

Таблица 1. — Результаты серологических исследований у пациентов с клещевым энцефалитом (n = 51)

Маркер и метод	Клещевой энцефалит	%
Ig M к КЭ (ИФА)	48/51	94,1
Ig G к КЭ (ИФА)	39/51	76,5
Ig M к ЛБ (НРИФ)	3/51	5,5
Ig G к ЛБ (НРИФ)	18/51	38,5

Диагноз ЛБ наряду с клинической симптоматикой подтвержден серологическими исследованиями и методом ПЦР (таблица 2).

Таблица 2. — Результаты серологических исследований у пациентов с Лайм-боррелиозом на различных стадиях заболевания (n = 185)

Маркер и метод	1-я стадия	2-я стадия	3-я стадия
Ig M к КЭ (ИФА)	–	–	–
Ig G к КЭ (ИФА)	–	–	–
Ig M к ЛБ (НРИФ)	21/37	8/13	2/4
Ig G к ЛБ (НРИФ)	49/82	45/48	35/37
Ig M к ЛБ (ИФА)	17/34	4/9	1/3
Ig G к ЛБ (ИФА)	6/30	2/5	1/2

Как представлено в таблице 2, в 1-й стадии ЛБ при отрицательных серологических данных клинический диагноз устанавливался по патогномичному признаку — мигрирующей эритеме, что является «золотым стандартом» диагностики болезни Лайма на начальной стадии развития. Наличие отрицательных серологических данных на 1-й стадии объясняется тем, что развитие клинической картины предшествовало нарастанию концентрации антител в сыворотке крови. Иммуный ответ на внедрение боррелий несколько отсрочен, поэтому выработка антител начинается с 3–6-й недели от момента заражения.

Во 2-й стадии диагноз был подтвержден серологически в 96% случаев, у 1 пациента выявлена ДНК возбудителя методом ПЦР.

Серологическое подтверждение поздней диссеминированной стадии Лайм-боррелиоза составило 100%, титр антител составлял от 1:64 до 1:1024 при исследовании в НРИФ.

Результаты исследования сывороток крови на наличие антител к клещевым инфекциям пациентов с различными клиническими проявлениями и воспалительными демиелинизирующими заболеваниями ЦНС представлены в таблице 3. В обеих группах выявлены АТ к ЛБ, которые определялись в титрах 1:64–1:128. В 5 случаях наличие антител подтверждено в иммуноблоте, что может указывать на течение болезни Лайма под маской ДЗ [3]. АТ к другим клещевым бактериальным инфекциям отсутствовали.

Таблица 3. — Результаты исследования сывороток крови пациентов с различными клиническими проявлениями и воспалительными демиелинизирующими заболеваниями ЦНС на наличие антител к ЛБ, ГАЧ и МЭЧ

№ группы	Количество пациентов	Диагноз заключительный	Антитела к		
			ЛБ**	ГАЧ*	МЭЧ*
1	15	Артрит. Нарушение мозгового кровообращения и пр.	7	0	0
2	91	Демиелинизирующее заболевание ЦНС	36	н/и	н/и
ИТОГО	106		43	0	0
Примечания: 1 — * — метод ИФА. 2 — ** — метод НРИФ.					

В таблице 4 представлены данные серологического обследования 54 сывороток крови на наличие антител к возбудителю ГАЧ и 10 — от пациентов с хроническими заболеваниями нервной системы, имевших в анамнезе присасывание клещей и обратившихся в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Из таблицы видно, что у людей, отмечавших присасывание клещей, обнаружены антитела к возбудителю ГАЧ в 9,3% случаев. У 1 пациента были выявлены ранние антитела (IgM), у 2 — одновременно IgM и IgG, у остальных регистрировались только антитела класса IgG. Анти-

тела к возбудителям МЭЧ не выявлены. При исследовании сывороток крови пациентов с хроническим поражением нервной системы, которые в анамнезе отмечали присасывание клещей, антитела к ГАЧ обнаружены у 1 пациента.

Таблица 4. — Выявление антител к возбудителю ГАЧ в сыворотках крови пациентов, имевших в анамнезе присасывание клеща

Сыворотки крови	Количество	Из них положительных, абс. (%)	В т. ч.	
			IgM	IgG
От лиц, имевших в анамнезе присасывание клеща	54	5 (9,3%)	1 + 2*	4
От пациентов с хроническим поражением нервной системы (в анамнезе — присасывание клеща)	10	1 (10,0%)	0	1
Всего	64	6 (9,4%)		

Примечание — * — у 2 пациентов обнаружены одновременно IgM и IgG.

Анализ данных лабораторного исследования сывороток показал, что антитела к КЭ выявлялись только в группе с пациентов с клиническим диагнозом КЭ. Что касается антител к ЛБ, то они выявлены во всех 3 представленных группах: при КЭ выявлены у 3 пациентов, что может указывать на микст-инфекцию (КЭ+ЛБ), в сыворотках от пациентов с демиелинизирующими заболеваниями и с различными поражениями нервной системы в 36,6% случаях. С одной стороны, это может указывать на хроническое течение ЛБ с поражением нервной системы, с другой — на то, что боррелии могут являться триггером аутоиммунного процесса в нервной системе. Антитела к ГАЧ обнаружены в сыворотках крови у лиц, обратившихся в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии по поводу присасывания клещей без клинических проявлений.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности микст-инфекций, что подтверждается литературными данными [4]. ЛБ может протекать под «маской рассеянного склероза» [5, 6]. Это может указывать на хроническое течение ЛБ у пациентов либо на развитие аутоиммунного процесса в организме, стартовой точкой которого является инфицирование боррелиями. Эта проблема в настоящее время требует дальнейшего изучения. Наличие антител к возбудителю ГАЧ свидетельствует о «проэпидемичивании» населения и бессимптомном течении ГАЧ при других клещевых инфекциях. Антитела к МЭЧ не обнаружены в сыворотках как от пациентов, так и среди здоровых лиц, обратившихся по поводу укуса клещей.

Полученные результаты указывают на необходимость более широкого исследования распространения клещевых инфекций, в т. ч. микст-инфекций, среди пациентов с патологиями опорно-двигательного аппарата и нервной системы.

Литература

1. Infection and co-infection rates of *Anaplasma phagocytophilum* variants, *Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi*, and the rickettsial endosymbiont in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) from sites in Indiana, Maine, Pennsylvania, and Wisconsin / F.E. Steiner [et al.] // J. Med. Entomol. — 2008. — Vol. 45, № 2. — P. 289–297.
2. Зараженность иксодовых клещей патогенными для человека возбудителями инфекций в Минске / Н.П. Мишаева [и др.] // Здоровоохранение. — 2011. — № 1. — С. 26–29.
3. Функционирование очагов смешанных клещевых инфекций на территории России / А.Н. Алексеев [и др.] // Мед. паразитология. — 1996. — № 4. — С. 9–16.
4. Клинические варианты микст-инфекций (КЭ + ЛБ) / С.О. Вельгин [и др.] // Журн. эпидемиологии и инфекц. болезней. — 2007. — № 3. — С. 38–41.
5. Schmuzhard, E. Multiple sclerosis and Lyme borreliosis // Wien Klin. Wochenschr. — 2002. — Vol. 114, № 13–14. — P. 539–554.
6. К вопросу о возможности течения иксодового клещевого боррелиоза под «маской» рассеянного склероза (клинический и иммунологический аспекты) / А.В. Субботин [и др.] // Медицина в Кузбассе. — 2008. — № 5. — С. 145–148.

DETECTION OF ANTIBODIES TO THE CAUSATIVE AGENTS OF TICK-BORNE INFECTIONS IN THE SERUM OF PATIENTS WITH TICK-BORNE ENCEPHALITIS, LYME DISEASE, AND INFLAMMATORY DEMYELINATING DISORDERS

Drakina S.A.¹, Knyazeva O.R.¹, Szczerba V.V.², Anisko L.A.², Samoilova T.I.¹, Krasko A.G.¹

¹State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology",
Minsk, Republic of Belarus;

²Health Care Institution "Municipal Hospital for Infectious Diseases", Minsk, Republic of Belarus

The results of the study for 236 serum samples from patients with tick-borne infections, various clinical manifestations and inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system and from persons who noted sucking mites, without clinical manifestations for the presence of antibodies (AB) to tick-borne encephalitis (TBE), Lyme disease (LB), human granulocytic anaplasmosis (HGA), and human monocytic ehrlichiosis (HME) are presented. Antibodies to TBE were detected only in patients with a clinical TBE diagnosis. AT to LB were founded in all 3 groups represented: with TBE — in 3 patients, which may indicate to a mixed infection (TBE + LB); in the sera of patients with demyelinating disease and various nervous system disorders — in 36.6% of cases. AT to HGA were identified in the serum of individuals who had a history of sucking ticks without clinical manifestations. AT to HME were no founded.

Keywords: antibodies, tick-borne encephalitis, Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis.

Поступила 16.09.2016

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Касницкая Т.Н.¹, Счесленок Е.П.¹, Семижон П.А.¹, Федорович Е.В.², Красько А.Г.¹, Владыко А.С.¹

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

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

Реферат. С использованием бактериологических, биохимических и молекулярно-генетических методов исследования охарактеризованы изоляты *Yersinia pseudotuberculosis* «Могилев» и *Yersinia pseudotuberculosis* 1201, выделенные из органов грызунов. Подтверждена их видовая принадлежность и показана возможность серотипирования изолятов с использованием мультиплексной полимеразной цепной реакции.

Ключевые слова: псевдотуберкулез, *Yersinia pseudotuberculosis*.

Введение. Псевдотуберкулез — острое инфекционное заболевание, вызываемое *Yersinia pseudotuberculosis*, имеющее алиментарный механизм заражения, характеризующееся полиморфной экзантемой, выраженными явлениями общей интоксикации, полиорганной симптоматикой с преимущественным поражением органов желудочно-кишечного тракта, имеющее склонность к рецидивирующему течению.

В настоящее время псевдотуберкулез является серьезной медицинской и социальной проблемой. Заболевание встречается как в виде спорадических случаев, так и эпидемических вспышек. Медико-биологическое значение проблемы псевдотуберкулеза обусловлено повсеместным распространением данного заболевания, фено- и генотипической близостью *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*, выраженным полиморфизмом клинических проявлений инфекции, затрудняющих клиническую диагностику, а также тем, что псевдотуберкулез регистрируется во всех возрастных группах, но особенно часто — среди детей дошкольного и школьного возраста [1].

В современных условиях уже недостаточно осуществлять лишь контроль заболеваемости и распространения инфекций среди населения. Назрела необходимость иметь достоверные данные о циркуляции ведущих вариантов возбудителя псевдотуберкулеза, появлении на территории новых, ранее не регистрировавшихся, геногрупп *Y. pseudotuberculosis*, что приобретает принципиальное

значение для поиска конкретных путей и факторов передачи инфекции, а также позволяет повысить эффективность санитарно-противоэпидемических мероприятий [2]. Без решения этого вопроса невозможно достичь управления эпидемическим процессом при псевдотуберкулезе, как и при большинстве бактериальных инфекций в целом.

В этой связи чрезвычайно актуально изучение молекулярно-генетических и биохимических характеристик изолятов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на территории республики, с целью получения современных знаний о возбудителе.

Цель работы — изучение молекулярно-генетических и биохимических характеристик изолятов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на территории Республики Беларусь.

Материалы и методы. Подготовку проб полевого материала (суспензия кишечника грызунов) проводили согласно приложению 1 к Санитарным правилам и Ветеринарным правилам [3].

В работе использованы изоляты *Yersinia pseudotuberculosis*: бактериальная культура *Y. pseudotuberculosis* «Могилев» (выделенная из кишечника желтогорлой мыши) и бактериальная культура *Y. pseudotuberculosis* 1201 (выделенная из кишечника полевой мыши). Для изоляции культур бактерий из проб кишечника грызунов использовали традиционный бактериологический метод с «холодовым» обогащением и последующим высевом материала на 3; 7; 10 сут.

После выделения чистой культуры бактерии культивировали при 26°C на жидких питательных средах LB и MacConkey. Дифференцирующий агар для иерсиний (ЦИН-агар) использовали для получения отдельных колоний бактерий с целью последующего накопления и оценки биохимических свойств культуры.

Для оценки биохимических свойств бактериальных штаммов использовали тест-систему «API 20 E», фирмы «bioMerieux» (Франция).

Для выделения бактериальной ДНК из штаммов *Y. pseudotuberculosis* использовали набор реагентов «ДНК-сорб-В» фирмы «АмплиСенс» (РФ). Все манипуляции проводились согласно прилагаемой инструкции.

Для постановки мультиплексной полимеразной цепной реакции с целью О-генотипирования *Yersinia pseudotuberculosis* осуществляли выделение геномной ДНК из изолированных колоний, используя метод кипячения [4]. Для выделения использовали одну изолированную колонию, которую инокулировали в 50 мкл 25 mM раствора NaOH. Полученную смесь прогревали при 100°C в течение 10 мин, после чего добавляли к смеси 50 мкл 80 mM Tris/HCl буфера (pH = 7,5) для нейтрализации действия щелочи. Центрифугировали полученную смесь при 20000g в течение 5 мин при 4°C. Супернатант переносили в новую 1,5 мл пробирку, 1 мкл использовали для постановки ПЦР.

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

Изучение генетических особенностей родственных связей между штаммами и популяциями иерсиний было проведено на основе *gyrB*-генотипирования. Для выявления гена *gyrB* использовали пары праймеров: YgirF-5'-GTATGAAAAGGGCTGGATGC-3', YgirR-5'-TTTATCTTTGGTCTGTDAGGAG-3', длина продукта амплификации — 900 п.о. [5]. Для ПЦР был использован прибор IQ5 (Bio-Rad, США), программа: 1 цикл 95°C — 5 мин; 35 циклов: 94°C — 20 с, 55°C — 20 с, 72°C — 40 с.

Аmplифицированные фрагменты ДНК анализировали в 2% агарозном геле. Электрофорез вели при напряжении тока 10 В/см геля в ТРИС-ацетатном буфере (pH = 8,0). ДНК визуализировали окрашиванием геля бромистым этидием с последующим просмотром в УФ-свете на трансиллюминаторе.

Секвенирование фрагментов гена *gyrB* проводили с использованием набора «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США) согласно прилагаемой инструкции. Предварительно фрагменты ДНК были извлечены из агарозного геля и очищены с использованием набора «QIAquick Gel Extraction Kit» (Qiagen, США). Электрофорез и анализ продуктов реакции осуществляли на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программ Clustal X, GenDoc, MEGA 4,0.

Таблица 1. — Биохимические свойства изолятов *Yersinia pseudotuberculosis*

Изоляты иерсиний Тест или субстрат	<i>Y. pseudotu-berculosis</i> «Могилев»	<i>Y. pseudotu-berculosis</i> 1201
β-галактозидаза	+	+
Аргининдигидролаза	–	–
Лизиндекарбоксилаза	–	–
Орнитиндекарбоксилаза	–	–
Цитрат Симмонса	+	–
Сероводород	–	–
Мочевина	+	+
Триптофандезаминаза	–	–
Индол	–	–
Фогес-Проскауэра 26°C	–	–
Желатиназа	–	–
D-глюкоза	+	+
D-маннит	+	+
Инозит	–	–
D-сорбит	–	–
L-рамнозу	+	+
D-сахароза	–	–
Мелибиоза	–	–
Амигдалин	–	+
L-арабиноза	+	+
Цитохромоксидаза	–	–

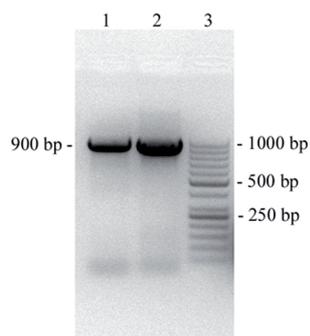
Анализ изолятов с использованием тест-системы «API 20E» показал очень хорошую идентификацию для изолята *Y. pseudotuberculosis* 1201 — 99,8% и хорошую идентификацию для изолята *Y. pseudotuberculosis* «Могилев» — 98,8% (рисунок 2).



А — *Yersinia pseudotuberculosis* «Могилев»; Б — *Yersinia pseudotuberculosis* 1201

Рисунок 2. — Идентификация бактерий по биохимическим свойствам

Анализ нуклеотидной последовательности участка гена *gyrB*, кодирующего В-субъединицу ДНК-гиразы, методом секвенирования использовали для подтверждения видовой принадлежности изолятов. С использованием пары праймеров Ygir R и Ygir F были амплифицированы ДНК-фрагменты размером 900 п.о., которые после предварительной очистки были взяты в реакцию секвенирования (рисунок 3).



Дрожки: 1 — ПЦР-продукт, полученный на матрице ДНК *Y. pseudotuberculosis* «Могилев»;
 2 — ПЦР-продукт, полученный на матрице ДНК *Y. pseudotuberculosis* 1201;
 3 — ДНК маркер GeneRuler 50 bp DNA ladder

Рисунок 3. — Электрофоретический анализ продуктов амплификации

Последовательности анализировали с использованием программы MEGA v.4.0. Нуклеотидная последовательность участков гена *gyrB* *Yersinia pseudotuberculosis*, штамм IP 31758, GenBank: CP000720.1 (последовательность в геноме 4685573–4686417), *Yersinia pseudotuberculosis*, штамм ATCC6904, GenBank: CP008943.1 (последовательность в геноме 2719809–2720653) и *Yersinia pestis*, штамм A1122, GenBank: CP002956.1 совпадают на 99–100% с анализируемыми аналогичными последовательностями изолятов *Y. pseudotuberculosis* «Могилев» и *Y. pseudotuberculosis* 1201 (таблица 2).

Таблица 2. — Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности участка гена *gyrB*

Accession	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
CP000720.1	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 31758, complete genome	1561	1561	100%	0.0	100%
CP008943.1	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> strain ATCC 6904, complete genome	1555	1555	100%	0.0	99%
CP002956.1	<i>Yersinia pestis</i> A1122, complete genome	1555	1555	100%	0.0	99%

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности участка гена *gyrB* изолята *Y. pseudotuberculosis* «Могилев» с аналогичной последовательностью гена *gyrB* *Y. pestis* показал высокий уровень гомологии (99%): была выявлена только одна замена — C/A (рисунок 4), что позволяет предположить о принадлежности выделенного изолята к наиболее патогенному серотипу *Y. pseudotuberculosis* 0:1b [6].

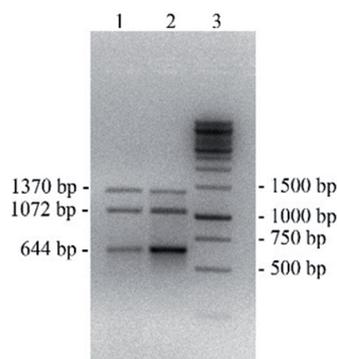
```

«Могилев» 361   AGGCACCGCTGAAAGTGGTGGGTGAAACTGAGCAAACCGGGACCACTGTGCGTTTCTGGC 420
                |||
31758 4686057  AGGCACCGCTGAAAGTGGTGGGTGAAACTGAGCAAACCGGGACCACTGTGCGTTTCTGGC
4685998
                |||
6904 2720169  AGGCACCGCTGAAAGTGGTGGGTGAAACTGAGCAAACCGGGACCACTGTGCGTTTCTGGC
2720228
                |||
A1122 1144252  AGGCACCGCTGAAAGTGGTGGGTGAAACTGAGCAAACCGGGACTACTGTGCGTTTCTGGC
1144311
  
```

Рисунок 4. — Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *gyrB* *Y. pseudotuberculosis* («Могилев», 31758, 6904) и *Y. pestis* (A1122).

Метод мультиплексной ПЦР был использован для определения серотипов изолятов *Y. pseudotuberculosis*. Данный методический подход позволяет проводить идентификацию и серо-

типирование иерсиний на основе генетической организации O-аg геномных кластеров серотипов *Y. pseudotuberculosis* (0:1a, 0:1b, 0:1c, 3) [6]. В результате постановки мультиплексной ПЦР с 4 парами праймеров к различным областям O-аg геномных кластеров *Y. pseudotuberculosis* (Ypf-14159, Ypr-15549; Ypf-5270, Ypr-6342; Ypf-17770, Ypr-18414; Ypf-7170, Ypr-7698) амплифицировались три специфических ДНК-фрагмента, свидетельствующие о принадлежности изолятов к серотипу 0:1b (рисунок 5).



Дорожки: 1 — ПЦР-продукт, полученный на матрице ДНК *Y. pseudotuberculosis* 1201;
2 — ПЦР-продукт, полученный на матрице ДНК *Y. pseudotuberculosis* «Могилев»;
3 — ДНК маркер GeneRuler 1 kb DNA ladder

Рисунок 5. — Электрофоретический анализ продуктов амплификации

Показано, что изоляты *Y. pseudotuberculosis*, штамм «Могилев», выделенный из желтогорлой мыши, и штамм 1201, выделенный из полевой мыши, относятся к наиболее патогенному для человека серотипу 0:1b.

Заключение. В работе дана молекулярно-генетическая и биохимическая характеристика изолятов *Y. pseudotuberculosis*, подтверждающая их видовую принадлежность. Анализ изолятов с использованием тест-системы «API 20E» показал очень хорошую идентификацию для изолята *Y. pseudotuberculosis* 1201 — 99,8% и хорошую идентификацию для изолята *Y. pseudotuberculosis* «Могилев» — 98,8%. Секвенирование нуклеотидной последовательности участков генов *gyrB* изолятов выявило совпадение на 99–100% с аналогичными последовательностями штаммов *Y. pseudotuberculosis*, представленными в базе данных GenBank. С использованием мультиплексной ПЦР для идентификации и серотипирования иерсиний, выделенных из объектов окружающей среды (кишечник грызунов), на основе генетической организации O-аg геномных кластеров выявлен серотип 0:1b *Y. pseudotuberculosis*.

Изоляты *Y. pseudotuberculosis* 1201 и *Y. pseudotuberculosis* «Могилев» зарегистрированы в Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии и в дальнейшем могут быть использованы в качестве референс-штаммов при сравнительном изучении изолятов *Y. pseudotuberculosis*, циркулирующих на территории республики.

Литература

1. Псевдотуберкулез / Г.П. Сомов [и др.]. — М.: Медицина, 2001. — 254 с.
2. Иерсинии и иерсиниозы / Под ред. Г.Я. Ценовой. — СПб., 2006. — С. 21, 143.
3. Санитарные правила и ветеринарные правила «Состояние здоровья населения в связи с влиянием микробиологического фактора среды обитания человека. Иерсиниозы»: утв. постановлением М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, М-ва сель. хоз-ва и прод. Респ. Беларусь 31.12.2002 № 150/35.
4. A molecular scheme for *Yersinia enterocolitica* patho-serotyping derived from genome-wide analysis / D. Garzetti [et al.] // Int. J. Med. Microbiol. — 2013. — Vol. 304, № 3–4. — P. 275–283.
5. The molecular phylogeny of the *gyrB* gene: a molecular marker for systematic characterization of the genus *Yersinia* / A.M. Stenkova [et al.] // Adv. Exp. Med. Biol. — 2012. — Vol. 954. — P. 53–56.
6. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* / T. Bogdanovich [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41, № 11. — P. 5103–5112.

MOLECULAR GENETIC AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS ISOLATES

Kasnitskaya T.N.¹, Scheslenok E.P.¹, Semizhon P.A.¹, Fedorovich E.V.², Krasko A.G.¹, Vladyko A.S.¹

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

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

Isolates of *Yersinia pseudotuberculosis* "Mogilev" and *Yersinia pseudotuberculosis* 1201 taken from organs of rodents, were characterized using bacteriological, biochemical and molecular genetic methods. It was confirmed their species. Using multiplex polymerase chain reaction was demonstrated the possibility of serotyping of isolates.

Keywords: pseudotuberculosis, *Yersinia pseudotuberculosis*.

Поступила 05.09.2016

ДИАГНОСТИКА ГНОЙНЫХ МЕНИНГОЭНЦЕФАЛИТОВ ТЕСТ-СИСТЕМОЙ «D-ЛАКТАМ»

Кубраков К.М.¹, Семенов В.М.¹, Чулков А.А.¹, Акуленок О.М.²

¹Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, Республика Беларусь;

²Учреждение здравоохранения «Витебская областная клиническая больница», Витебск, Республика Беларусь

Реферат. Целью данной работы было определить возможность применения тест-системы «D-лактамы» для диагностики бактериальных менингоэнцефалитов (МЭ), основанной на количественной детекции D-лактата в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ). Получены данные о специфичности и чувствительности тест-системы у нейрохирургических пациентов с послеоперационными и посттравматическими МЭ (n = 24) и вертеброгенными заболеваниями позвоночника (n = 58). В ходе ROC-анализа достоверно (p < 0,001) установлено, что уровень D-лактата в ЦСЖ, превышающий 0,2041 ммоль/л, указывает на наличие у пациента МЭ с чувствительностью 100% (95% ДИ: 80,5...100) и специфичностью 77,6% (95% ДИ: 66,4...87,5), при этом площадь поля под кривой AUC = 0,938 (95% ДИ: 0,872 ...0,979), что позволяет считать определение уровня D-лактата в ЦСЖ хорошим методом диагностики бактериальной этиологии МЭ.

Ключевые слова: менингоэнцефалит, D-лактамы, нейрохирургия, микроорганизм.

Введение. В нейрохирургических отделениях хирургические вмешательства выполняются на чувствительной нервной ткани, генерируя тем самым многие факторы риска послеоперационных осложнений, наиболее частыми из которых являются гнойные менингиты и менингоэнцефалиты (МЭ), а также вентрикулиты [1].

К возникновению МЭ могут приводить такие инвазивные процедуры, как трепанация черепа, дренирование желудочковой системы, спинномозговая пункция, спинальная анестезия, а также черепно-мозговая травма, особенно открытая, проникающая [2].

При краниотомии в 0,8–1,5% случаев развивается МЭ [2, 3]. Нозокомиальные МЭ при установке вентрикулярных шунтов диагностируются в 4–17% случаев [4, 5]. Люмбальные катетеры, которые устанавливаются с целью диагностики и лечения гидроцефалии, являются источником внутрибольничных МЭ в 5% случаев [6]. Риск развития бактериальных менингитов при люмбальной пункции составляет 1:50000. По данным Вагг Е.Т. (2006), в США ежегодно диагностируется 80 таких случаев, большинство из них связаны с миелографией и спинальной анестезией [6]. По данным многих авторов, частота нозокомиальных МЭ при черепно-мозговых травмах составляет 1,4–13,1%, достигая при проникающих повреждениях с ликвореей от 10 до 37% [6–8].

Менингиты в настоящее время во всем мире остаются одними из самых распространенных форм поражения ЦНС. Высокая летальность (10–25%), тяжелые последствия (гидроцефалия, снижение слуха, геми- и тетраплегии) после перенесенного бактериального менингита (41–50%) сохраняют актуальность данной патологии и сейчас. Установление этиологии менингита в ранние сроки

заболевания является важным моментом, определяющим выбор рациональной терапии. Однако, как свидетельствуют данные литературы, на этапе первичного диагноза частота диагностических ошибок достигает 50–70%. Причем особую сложность представляет дифференциальная диагностика бактериальных и асептических менингитов, особенно в первые дни заболевания.

Результаты бактериологических посевов положительны лишь в 40% случаев и многим стационарам не доступны. Положительный ответ с указанием возбудителя зачастую появляется у врача не ранее 3–5 сут. В связи с наметившимся в последнее время сглаживанием лабораторных показателей при МЭ наибольшую актуальность на современном этапе представляет разработка новых методов ранней дифференциальной диагностики МЭ [8].

Первые работы по исследованию лактата в крови датируются 1925 г. Авторы исследований, оценивающих роль D-лактата в дифференциальной диагностике между бактериальным, вирусным и асептическим менингитами, пришли к выводу, что D-лактат является хорошим показателем и одним из лучших маркером по сравнению с обычными анализами [9, 10]. Но проблемы остаются из-за низкого качества тест-систем, отсутствия надлежащего «золотого стандарта» диагностики МЭ и ограниченную применимость метода.

Цель работы — определение диагностической ценности тест-системы «D-лактам» для диагностики гнойных МЭ, основанной на количественной детекции D-лактата в цереброспинальной жидкости.

Материалы и методы. В нейрохирургическом отделении УЗ «Витебская областная клиническая больница» находились на лечении 24 пациента с тяжелой и средне-тяжелой черепно-мозговой травмой (n = 19), опухолями головного мозга (n = 5). Медиана возраста составила 53 (46–61) года. У 21 (87,5%) пациента были выполнены операции по поводу острых субдуральных гематом, опухолей головного мозга. На 4–6-е сут нахождения в стационаре у всех пациентов (n = 24) были выявлены клинические признаки МЭ, подтвержденные общим и бактериологическими анализами ЦСЖ.

Бактериологический анализ ликвора проводили в Республиканском научно-практическом центре «Инфекция в хирургии» и бактериологической лаборатории УЗ «ВОКБ» с помощью тест-систем (ID 32 E, ID 32 S) на микробиологическом анализаторе АТВ Expression и методом стандартных бумажных дисков (Becton Dickinson, США).

Для определения диагностических порогов концентрации D-лактата в ЦСЖ был изучен ликвор 58 пациентов, госпитализированных в плановом порядке в нейрохирургическое отделение УЗ «ВОКБ» по поводу вертеброгенных заболеваний позвоночника на этапе дооперационного обследования.

Качественная и количественная оценка D-лактата в ЦСЖ определялась с помощью тест-системы «D-Лактам» (ООО «Сивитал», РБ), результат теста был готов через 1,5 ч.

Статистический анализ результатов исследования проводился аналитическим пакетом Statistica 10.0 и SPSS 19 с расчетом частоты признака, 95% доверительного интервала (95% ДИ), медианы и интерквартильного интервала Me (LQ-UQ). Для проверки нормальности распределения изучаемых признаков применялся тест Колмогорова–Смирнова. Уровень достоверности нулевой гипотезы (p) для принятия решения о значимости полученных результатов статистической обработки во всех тестах был принят равным или менее 0,05.

Эффективность диагностических методов (в частности, результатов клинической апробации тест-системы для определения и количественной оценки D-лактата в ЦСЖ) определялась при помощи ROC-анализа с построением ROC-кривых и расчетом «отсечных» значений D-лактата, соответствующих оптимальному сочетанию чувствительности и специфичности метода. При этом была использована программа для статистических расчетов MedCalc 10.2.

Результаты и их обсуждение. Клинические симптомы МЭ у 24 пациентов включали общеинфекционный, гипертензионно-гидроцефальный и менингеальный синдромы. В периферической крови отмечался лейкоцитоз ($>10,3 \times 10^9/\text{л}$) со сдвигом лейкоцитарной формулы влево, ускоренная СОЭ (>29 мм/ч).

Ликвор забирался при спинномозговых пункциях в положении на боку с измерением ликворного давления и отправлялся в клиническую лабораторию на общий, биохимический и бактериологический анализы, а также на D-лактат. Учитывались цвет и прозрачность ликвора, содержание глюкозы, белка, хлоридов, клеточный состав.

У пациентов с МЭ (n = 24) ликворное давление было повышено до 195 (175–225) мм вод. ст. Цвет варьировал от желтоватого до зеленого. Консистенция и его прозрачность были обусловлены повышенным содержанием белка и клеток. Содержание белка — 2,9 (1,4–5,9) г/л. При микроскопии количество лейкоцитов у 11 (45,8%) пациентов не поддавалось подсчету, у оставшихся 54,2% в среднем составляло 1446 в 1 мкл, при этом в 98% случаях преобладали нейтрофилы.

При бактериологическом исследовании (n = 24) были выделены 24 микроорганизма, из них 10 изолятов *A. baumannii* — 41,67% (95% ДИ: 20,40–62,90), по 4 штамма *P. aeruginosae* и род *Staphylococcus* — 16,67% (95% ДИ: 5,39–32,70), 3 изолята представители семейства *Streptococcaceae* — 12,50%, 2 штамма род *Enterococcus* — 8,30% и 1 возбудитель *K. pneumoniae* — 4,17%.

При количественном определении ликвора на D-лактат у пациентов с МЭ его медиана составила 0,48 (0,26–0,75) ммоль/л. Уровень D-лактата колебался в пределах от минимального выявленного уровня 0,21 ммоль/л до максимального — 3,59 ммоль/л.

Достоверной корреляции между процентным содержанием лейкоцитов в ЦСЖ (R = 0,42; p = 0,16), содержанием белка (R = 0,31; p = 0,20) и концентрацией D-лактата выявлено не было.

Ликвор пациентов (n = 58) с вертеброгенными заболеваниями позвоночника был бесцветный, прозрачный, характеризовался нормотензией — 110 (90–135) мм вод. ст., с наличием белка Me = 0,48 (0,32–0,79) г/л и цитоза Me = 4 клетки в 1 мкл. Медиана концентрации D-лактата в ЦСЖ составила 0,17 (0,11–0,20) ммоль/л, максимальное значение было 0,45 ммоль/л, минимальное — 0,05 ммоль/л.

Достоверных ранговых корреляций (Spearman) между концентрацией D-лактата в ЦСЖ и цитозом (R = 0,11; p = 0,40), концентрацией белка (R = -0,15; p = 0,24) выявлено не было.

Анализ при сравнении двух групп пациентов показал, что концентрация D-лактата в ЦСЖ при МЭ достоверно выше, чем у пациентов с вертеброгенными заболеваниями позвоночника (p < 0,001 U test по Mann–Whitney).

Для определения диагностической ценности концентрации D-лактата в ЦСЖ для диагностики МЭ нами был выполнен ROC-анализ, который позволил установить точку (значение D-лактата ликвора) диагностического разделения наличия бактериальной флоры МЭ. В результате анализа достоверно (p < 0,001) установлено, что уровень D-лактата в ЦСЖ, превышающий 0,2041 ммоль/л, указывает на наличие у пациента бактериального МЭ с чувствительностью 100% (95% ДИ: 80,5...100) и специфичностью 77,6% (95% ДИ: 66,4...87,5), при этом площадь поля под кривой AUC = 0,938 (95% ДИ: 0,872...0,979), что позволяет считать определение уровня D-лактата в ЦСЖ хорошим методом диагностики бактериальной этиологии МЭ (рисунок).

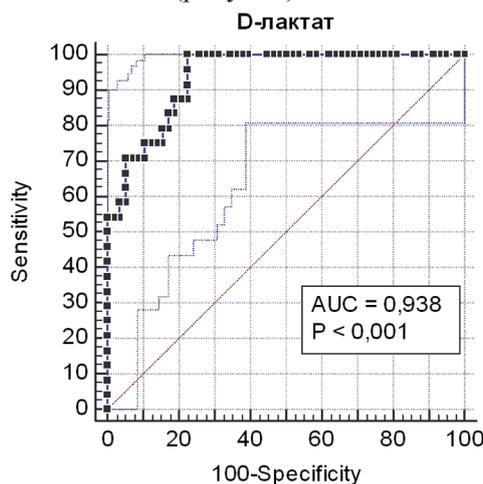


Рисунок — ROC-кривая (определение наличия бактериального МЭ по уровню D-лактата в цереброспинальной жидкости пациентов)

При анализе группы пациентов с бактериальным МЭ установлено, что практически у всех пациентов концентрация D-лактата в ЦСЖ была выше 0,20 ммоль/л.

Заключение:

1. Тест-система «D-Лактам» позволяет осуществлять качественную и количественную оценку D-лактата в цереброспинальной жидкости.

2. Определение уровня D-лактата в ликворе, превышающего 0,2041 ммоль/л, с высокой степенью достоверности ($p < 0,001$) указывает на наличие у пациента бактериального менингоэнцефалита.
3. Установлена высокая чувствительность 100% (95% ДИ: 80,5...100) и специфичность 77,6% (95% ДИ: 66,4...87,5), AUC = 0,938 (95% ДИ: 0,872 ...0,979) тест-системы «D-Лактам» для определения D-лактата в цереброспинальной жидкости ($p < 0,001$).
4. Тест-система «D-Лактам» может применяться как метод ранней диагностики гнойных менингоэнцефалитов в нейрохирургической и неврологической практике.

Литература

1. Wałaszek, M. The analysis of the occurrence of nosocomial infections in the neurosurgical ward in the district hospital from 2003 to 2012 / M. Wałaszek // *Przegl. Epidemiol.* — 2015. — Vol. 69, № 3. — P. 507–514.
2. van de Beek, D. Nosocomial bacterial meningitis / D. van de Beek, J.M. Drake, A.R. Tunkel // *N. Engl. J. Med.* — 2010. — Vol. 362, № 2. — P. 146–154.
3. Risk factors for adult nosocomial meningitis after craniotomy: role of antibiotic prophylaxis / A.M. Korinek [et al.] // *Neurosurgery.* — 2006. — Vol. 59, № 1. — P. 126–133.
4. McClelland, S. Postoperative central nervous system infection: incidence and associated factors in 2111 neurosurgical procedures / S. McClelland, W.A. Hall // *Clin. Infect. Dis.* — 2007. — Vol. 45, № 1. — P. 55–59.
5. Characteristics and treatment outcome of cerebrospinal fluid shunt-associated infections in adults: a retrospective analysis over an 11-year period / A. Conen [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 47, № 1. — P. 73–82.
6. Baer, E.T. Post-dural puncture bacterial meningitis / E.T. Baer // *Anesthesiology.* — 2006. — Vol. 105, № 2. — P. 381–393.
7. Risk of death in patients with post-traumatic cerebrospinal fluid leakage-analysis of 1773 cases / K.H. Liao [et al.] // *J. Chin. Med. Assoc.* — 2016. — Vol. 79, № 2. — P. 58–64.
8. The clinical diagnostic significance of cerebrospinal fluid D-lactate for bacterial meningitis / Z. Chen [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* — 2012. — Vol. 413, № 19–20. — P. 1512–1515.
9. CSF markers for diagnosis of bacterial meningitis in neurosurgical postoperative patients / W.M. Tavares [et al.] // *Arq. Neuropsiquiatr.* — 2006. — Vol. 64, № 3A. — P. 592–595.
10. Бактериальные патогены как продуценты D-лактата / В.М. Семенов [и др.] // *Журн. инфектологии.* — 2014. — Т. 6, № 2. — С. 90.

THE TEST SYSTEM «D-LACTAM» FOR THE DIAGNOSIS OF PURULENT MENINGOENCEPHALITIS

Kubrakov K.M.¹, Semenov V.M.¹, Shulkou A.A.¹, Akulenok O.M.²

¹Educational Establishment “Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University”, Vitebsk, Republic of Belarus;

²Health Care Institution “Vitebsk Regional Hospital”, Vitebsk, Republic of Belarus

The purpose of this study was to determine the possibility of using «D-lactam» test system for the diagnosis of bacterial meningoencephalitis (ME), based on the quantitative detection of D-lactate in the cerebrospinal fluid (CSF). The data on the specificity and sensitivity of the test system in neurosurgical patients with postoperative and posttraumatic ME ($n = 24$) and vertebrogonic spine disease ($n = 58$). In the course of the ROC analysis it was found that the level of D-lactate in CSF was significantly ($p < 0,001$) greater than 0.2041 mmol/L, indicating the presence of the patients' ME with sensitivity of 100% (95% ДИ: 80.5...100) and specificity of 77.6% (95% CI: 66.4...87.5) in this area under the curve AUC = 0.938 (95% CI: 0,872 ...0,979), which suggests that the definition of the level of D-lactate in CSF is a valid method of diagnosis of bacterial etiology of ME.

Keywords: meningoencephalitis, D-lactam, neurosurgery, microorganism.

Поступила 31.08.2016

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВЕНТИЛЯТОР-АССОЦИИРОВАННОЙ ПНЕВМОНИИ

Окулич В.К., Мамась А.Н., Земко В.Ю.

Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, Республика Беларусь

Реферат. Статья отражает результаты исследования этиологической структуры и антибиотикочувствительности возбудителей вентилятор-ассоциированной пневмонии. Возникновение вентилятор-ассоциированной пневмонии возможно через 48 ч и ранее, особенно у лиц, находящихся в критическом состоянии. Микробиологические исследования проводились на базе бактериологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии». Резистентность бактерий к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом. Установленные факторы риска возникновения внутрибольничных пневмоний требуют усиления самоконтроля состояния объектов госпитальной среды, обеспечения безопасности ИВЛ и разработки профилактических рекомендаций.

Ключевые слова: вентилятор-ассоциированная пневмония, этиологическая структура, антибиотикочувствительность.

Введение. Вентилятор-ассоциированная пневмония является одной из актуальных проблем интенсивной терапии и пульмонологии в настоящее время. Это наиболее распространенное осложнение среди пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), получающих респираторную поддержку. Как показывают клинические наблюдения, возникновение вентилятор-ассоциированной пневмонии возможно через 48 ч и ранее, особенно у пациентов, находящихся в критическом состоянии. По мнению Б.Р. Гельфанда, применительно к вентилятор-ассоциированной пневмонии этот срок следует сократить до 24 ч. Частота развития и характер вентилятор-ассоциированной пневмонии, вызываемого тем или иным возбудителем, зависит, прежде всего, от микробиологического пейзажа конкретного отделения и им же определяется. Вентилятор-ассоциированная пневмония развивается у 8–28% пациентов, находящихся на продленной искусственной вентиляции легких (ИВЛ), и является непосредственной причиной летального исхода у лиц в критическом состоянии в 10–50% случаев [1–3]. Кроме этого, развитие вентилятор-ассоциированной пневмонии продлевает срок пребывания в отделении интенсивной терапии, увеличивая затраты на лечение вдвое [4]. В связи с этим важной представляется своевременная диагностика данного заболевания с целью максимально раннего начала комплексного лечения, в первую очередь адекватной антибиотикотерапии.

Цель работы — изучение структуры возбудителей вентилятор-ассоциированной пневмонии и их антибиотикорезистентность в ОРИТ ВОКБ с июня 2015 г. по февраль 2016 г.

Материалы и методы. Проанализированы результаты бактериологического исследования мокроты у 49 пациентов, находившихся на лечении в ОРИТ. Критерием для отбора служила длительность ИВЛ не менее 48 ч. У всех пациентов проводился забор мокроты методом эндотрахеальной аспирации или бронхоальвеолярного лаважа.

Выделено и подвергнуто бактериологическому исследованию 54 изолята грамотрицательных и грамположительных аэробных, факультативно анаэробных микроорганизмов и грибов. Микробиологические исследования проводились на базе бактериологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии». Для выделения стрептококков использовали 5% кровяной Колумбия-агар, стафилококки выделяли на высокоселективном желточно-солевом агаре с азидом натрия, для кишечной группы бактерий использовали среду Эндо с генциан-фиолетовым, псевдомонады выделяли на среде ЦПХ, посев на микробы группы протей производили по методу Шукевича. Резистентность бактерий к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием Microsoft Office Excel.

Результаты и их обсуждение. В результате исследования установлены следующие клинико-эпидемиологические особенности вентилятор-ассоциированной пневмонии и факторы риска ее развития: в демографической структуре преобладают мужчины (64,1%) старшей возрастной группы (50 лет и старше), а средний возраст пациентов составил $50,4 \pm 12,0$ лет. Возрастной диапазон у па-

циентов составляет от 18 до 75 лет. Длительность госпитализации составила преимущественно от 10 до 59 дней, в среднем — 44,5 дня.

Данные о контингенте пациентов, требующих по каким-либо причинам искусственного замещения функций легких, представлены в таблице. Наиболее часто развитие вентилятор-ассоциированной пневмонии регистрируется у пациентов хирургического профиля. Несомненным является вклад основной патологии в формирование вентилятор-ассоциированной пневмонии. Среди многочисленных причин, приведших к необходимости хирургического лечения и проведения пролонгированной ИВЛ, основное место в многопрофильной больнице занимают черепно-мозговые травмы. Их частота составила 22,45%.

Таблица — Популяционный состав пациентов с вентилятор-ассоциированной пневмонией

Причина ИВЛ	Количество пациентов	Абс., %
Гнойно-воспалительные заболевания любой локализации	13	26,54
Патология органов брюшной полости (ЖКБ, острый панкреатит)	6	12,24
Черепно-мозговые и сочетанные травмы	11	22,45
ОНМК	10	20,41
Тяжелая кардиологическая патология (ИБС с сердечной недостаточностью)	5	10,20
Миастения	1	2,04
Кома неясной этиологии	2	4,08
Термический ожог	1	2,04

Нами проанализированы сроки возникновения ВАП: в среднем она развивалась на $6,0 \pm 5,25$ сут, 52,7% составили ранние пневмонии, возникшие в течение первых 5 сут после интубации трахеи или наложения трахеостомы. При этом отмечено, что более раннему развитию пневмонии способствовали характер и тяжесть основной патологии, а также частота и объем оперативных вмешательств. В минимально короткие сроки пневмония развивалась у пациентов, находящихся в коме или имеющих синдром полиорганной недостаточности.

Установленные факторы риска возникновения внутрибольничных пневмоний требуют усиления самоконтроля состояния объектов госпитальной среды, обеспечения безопасности ИВЛ и разработки профилактических рекомендаций.

Нами проанализирована этиологическая структура вентилятор-ассоциированной пневмонии. При исследовании отделяемого дыхательных путей у интубированных пациентов в 35,8% случаев выделялись ассоциации микроорганизмов. Из них ассоциации бактерий (грамотрицательных или грамотрицательных и грамположительных) — 23,1% и ассоциации бактерий с грибами — 12,8%.

Грамотрицательная флора составила 61,5% выделенных изолятов, грамположительная флора — 38,5%, грибы рода *Candida* — 12,8% случаев (в ассоциации с другими возбудителями). Установлено, что в посевах мокроты *Staphylococcus aureus* выделялся в 33,3% случаев, *Acinetobacter spp.* — в 33,3%, *Pseudomonas aeruginosa* — в 15,4%, *Klebsiella pneumoniae* — в 7,7%, *Candida* — 12,8%, *Streptococcus spp.* — 2,6%.

Среди грамположительной флоры в основном встречался *Staphylococcus aureus* (93,3%). Наиболее частыми представителями грамотрицательной флоры оказались *Acinetobacter spp.* (54,2%) и *Pseudomonas aeruginosa* (25,0%). Грибковая флора представлена грибами рода *Candida spp.*

При анализе чувствительности к антибиотикам получены следующие результаты: *Staphylococcus aureus* был чувствителен к ванкомицину в 100% случаев, к амикацину — в 38,5%

случаев. Все штаммы *Staphylococcus aureus* были метициллин-резистентны, также 100% штаммов было резистентно к офлоксацину, ципрофлоксацину, левофлоксацину, 92,3% — клиндамицину.

Среди изолятов *Pseudomonas aeruginosa* установлена чувствительность к колистину в 100% случаев, амикацину — 16,6%. К меропенему, имипенему, цефепиму, цефтазидиму, цефоперазону, ципрофлоксацину было резистентно 100% штаммов.

Изоляты *Acinetobacter spp.* были чувствительны к ампициллину в сочетании с сульбактамом в 46,2% случаев, к цефоперазону в сочетании с сульбактамом в 92,3% случаев, но в 100% случаев была выявлена резистентность к амикацину, меропенему, имипенему, левофлоксацину, цефоперазону, цефепиму, ципрофлоксацину.

Все изоляты *Klebsiella pneumoniae* были чувствительны к имипенему, в 66,7% случаев — к меропенему и амикацину, но резистентны к амоксициллину, цефотаксиму, цефтазидиму, ципрофлоксацину, цефоперазону, офлоксацину в 100% случаев.

Заключение:

1. Современной эпидемиологической особенностью вентилятор-ассоциированной пневмонии является преобладание в этиологической структуре грамотрицательной микрофлоры, представленной в более половины случаев *Acinetobacter spp.*

2. В отделении реанимации и интенсивной терапии Витебской областной клинической больницы, исходя из данных о резистентности полученных штаммов, для лечения пневмонии, вызванной *Staphylococcus aureus*, рекомендуется использовать ванкомицин или линезолид, *Pseudomonas aeruginosa* — колистин, *Acinetobacter spp.* — цефоперазон в сочетании с сульбактамом, а *Klebsiella pneumoniae* — имипенем.

3. Необходимо продолжить мониторинг отделений реанимации, пульмонологического и торакального отделений и других с целью своевременного принятия адекватных решений по назначению и коррекции антибактериальной терапии.

Литература

1. Chastre, J. Ventilator-associated pneumonia / J. Chastre, J.Y. Fagon // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2002. — Vol. 165, № 7. — P. 867–903.
2. Ewig, S. The pulmonary physician in critical care * 4: Nosocomial pneumonia / S. Ewig, T. Bauer, A. Torres // Thorax. — 2002. — Vol. 57, № 4. — P. 366–371.
3. International Conference for the Development of Consensus on the Diagnosis and Treatment of Ventilator-associated Pneumonia / J. Rello [et al.] // Chest. — 2001. — Vol. 120, № 3. — P. 955–970.
4. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database / J. Rello [et al.] // Chest. — 2002. — Vol. 122, № 6. — P. 2115–2121.

ETIOLOGICAL STRUCTURE AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF PATHOGENS OF VENTILATOR-ASSOCIATED PNEUMONIA

Okulich V.K., Mamas A.N., Ziamko V.Y.

*Educational Establishment "Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University",
Vitebsk, Republic of Belarus*

The article reflects the results of a study of the etiological structure and antibiotic susceptibility of pathogens of ventilator-associated pneumonia. The emergence of ventilator-associated pneumonia is possible in 48 hours and informed, especially in patients who are in critical condition. Microbiological studies were conducted on the basis of the bacteriological laboratory of the Republican scientific-practical center "Infection in surgery". Resistance of bacteria to antibiotics was determined by disco-diffusion method. Established risk factors for nosocomial pneumonia are demanding greater self-control over a condition of objects of hospital environment, security of mechanical ventilation and the development of prevention recommendations.

Keywords: ventilator-associated pneumonia, etiological structure, antibiotic susceptibility.

Поступила 15.08.2016

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ АСПЕКТЫ КЛЕБСИЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Пронько Н.В., Рыбак Т.Г.

Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
Гродно, Республика Беларусь

Реферат. Проанализированы клинико-эпидемиологические особенности течения клебсиеллезной кишечной инфекции у детей. Установлено, что для нее характерна склонность к поражению детей раннего возраста. Высокая заболеваемость клебсиеллезной инфекцией отмечается у детей первых лет жизни. При вспышках острых кишечных инфекций, возникающих в детских коллективах, пациентов необходимо обследовать на условно-патогенную кишечную группу, что позволит оптимизировать не только способы лечения, но и противоэпидемические мероприятия.

Ключевые слова: острые кишечные инфекции, клебсиеллезная инфекция, дети.

Введение. В инфекционной патологии детского возраста все большую значимость приобретает условно-патогенная флора (УПФ), такая как клебсиеллы, протей, синегнойная палочка, цитробактер, энтеробактер и др. [1, 2]. Внимание к изучению острых кишечных инфекций (ОКИ), вызванных условно-патогенной флорой (УПФ), было привлечено их тяжестью и склонностью к поражению детей ранней возрастной группы [3, 4]. До настоящего времени не установлена роль ряда условно-патогенных микробов в этиологии кишечных заболеваний у детей, недостаточно полно изучены клинические аспекты диарей, вызванных УПФ, зависимость особенностей клиники от состояния преморбидного фона, возраста пациентов [5, 6]. Возрастание частоты клебсиеллеза, схожесть местных изменений желудочно-кишечного тракта с другими кишечными инфекциями делает значимым изучение данной патологии [7].

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

Материалы и методы. Объектом данного исследования стали 47 пациентов в возрасте от 1 мес. до 14 лет с подтвержденной клебсиеллезной инфекцией (КИ), находившихся на стационарном лечении в отделении детских кишечных инфекций Гродненской областной инфекционной клинической больницы (ГОИКБ) на протяжении 2005–2014 гг. и выписанных с клиническим выздоровлением. Клинический материал основывался на анализе историй болезни, журналах приемного отделения пациентов с подтвержденной КИ. У всех пациентов диагноз был подтвержден выделением возбудителей. У 18 детей выделена *Klebsiella pneumoniae*, у 15 — *Klebsiella oxytoca* и у 14 — *Klebsiella fridlandery*. Стандартный алгоритм обследования пациентов включал общеклинические и биохимические исследования. Для расшифровки этиологического диагноза проводилось комплексное лабораторное обследование, включающее посев испражнений на кишечную группу бактерий, ПЦР-диагностику фекалий на наличие РНК вирусов. Диагноз КИ устанавливали на основании тщательного изучения анамнеза, совокупности клинико-эпидемиологических и лабораторных данных. Обследование проводилось согласно клиническим протоколам, утвержденным МЗ РБ. Статистическую обработку полученных данных проводили по общепринятым критериям вариационной статистики. При сравнении двух независимых групп использовали t-критерий Стьюдента, а трех независимых групп — метод ANOVA. Достоверными считали различия в группах при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Как показали исследования, за последние годы в этиологической структуре бактериальных ОКИ возрос удельный вес УПФ (стафилококка, протей, клебсиеллы, цитробактера, энтеробактера). Так, если в 2005 г. среди пациентов, госпитализированных в детское отделение ГОИКБ, на долю ОКИ, вызванных УПФ, приходилось до 6,9% от числа бактериологически подтвержденных кишечных инфекций, то в 2014 г. их доля увеличилась до 17,2%.

Удельный вес КИ в структуре острых кишечных инфекций, согласно данным литературы, велик и составляет от 3 до 7% [1, 2]. При анализе структуры расшифрованных ОКИ у детей установлено, что КИ составила 17,2% от числа подтвержденных кишечных инфекций, вызванных УПФ. В 2005 г. на долю КИ у детей, госпитализированных в ГОИКБ, приходилось только 2,1% от числа бактериологически подтвержденных кишечных инфекций. В 2014 г. их доля увеличилась до 10,8%. Самым большим был удельный вес ОКИ протейной этиологии — 29,1% случаев, стафилококковая

кишечная инфекция отмечалась в 26,4% случаев, реже регистрировалась КИ, на долю которой приходилось лишь 10,8% случаев.

При анализе возрастной структуры пациентов установлено, что КИ отмечалась среди всех возрастных групп. В возрасте от 1 мес. до 1 года было 26 (55,3%) пациентов; от 1 до 3 лет — 15 (31,9%); от 4 до 6 лет — 4 (8,5%). В возрасте от 7 до 14 лет было только 2 (4,3%) пациента. Таким образом, наиболее уязвимой является группа детей первых лет жизни, где случаи КИ отмечались более чем в 87%.

Таблица 1. — Общая характеристика пациентов с клебсиеллезной инфекцией

Показатели	Абсолютное число, n = 47	%
Мужской пол	24	51,1±8,4
Женский пол	23	48,9±8,4
Легкая форма	—	—
Среднетяжелая форма	46	97,9±3,9
Тяжелая форма	1	2,1±1,9**
Организованный детский коллектив	18	38,3±7,9
Неорганизованный детский коллектив	29	61,7±3,8*
Примечания: 1 — * — статистически значимое (p<0,01) отличие при сравнении организованных и неорганизованных детей с КИ. 2 — ** — статистически значимое (p<0,05) отличие при сравнении среднетяжелых и тяжелых форм заболеваний.		

Как видно из таблицы 1, существенных различий по полу не отмечено, преобладала среднетяжелая форма КИ. Детей, посещающих детские дошкольные учреждения, оказалось 38,3%, не посещающих детские дошкольные учреждения — 61,7%.

Нами не отмечено сезонности в динамике заболеваемости КИ. Случаи клебсиеллеза регистрировались равномерно в течение года. КИ в основном протекала в виде моноинфекции — 44 случая (93,6%), сочетанная инфекция отмечена у 3 пациентов (6,4%): наблюдалось сочетанное выделение клебсиеллы со стафилококками.

Дети поступали в стационар в первые дни от начала заболевания в состоянии средней тяжести или ближе к тяжелому. В большинстве случаев заболевание протекало по типу энтероколита — 36 человек (76,6%), реже — топическим диагнозом был гастроэнтероколит — 11 (23,4%). КИ началась остро с появления срыгивания, вялости, метеоризма, изменения характера и кратности стула, повышения температуры. Наблюдалась потеря массы тела и жидкий стул с примесью слизи. При поступлении в стационар у пациентов были выражены слабость, жажда, мраморность кожных покровов, поведение ребенка менялось, отмечалось беспокойство, тахикардия. В первые 3 дня заболевания поступил 41 пациент (87,2%), в более поздние сроки — 6 (12,8%).

Фебрильная лихорадка отмечена у 24 пациентов (51,1%), субфебрильная температура — у 16 (34,0%), у 7 (14,9%) пациентов температура тела оставалась нормальной. У 17 (36,2%) детей первого года жизни диагностирован токсикоз с эксикозом I–II ст.; потеря массы тела достигала 6–8%.

Рвота была отмечена у 11 (23,4%) пациентов 1–3 раз в сут преимущественно у детей первого года жизни (таблица 2). У детей старше года отмечалась клиника энтероколита. Доминировало поражение толстого кишечника. Стул учащался до 6–8 раз в сут, имел энтероколитный характер (жидкий, с примесью слизи и прожилок крови).

При лабораторном обследовании пациентов с КИ изменения в периферической крови проявлялись снижением уровня гемоглобина в 65,7% случаев, умеренным лейкоцитозом с нейтрофилезом — в 88,6% случаев; у 11,4% пациентов формула крови и общее количество лейкоцитов периферической крови не менялись.

Таблица 2. — Общеклинические показатели у пациентов с КИ

Показатели	Абсолютное число, n = 47	%
Острое начало	42	89,4±4,7
t нормальная	7	14,9±5,4
t до 38°C	16	34,0±7,9
t выше 38°C	24	51,1±8,4
Рвота	11	23,4±7,1
Токсикоз с эксикозом	17	36,2±7,8

Таблица 3. — Лабораторные показатели у пациентов с КИ

Показатели	Абсолютное число, n = 47	%
Снижение гемоглобина	31	65,9±7,9
Лейкоцитоз	42	89,4±5,4
Нормоцитоз	5	10,6±5,4
Ускорение СОЭ	27	57,4±8,4
Изменения в копрограмме	36	76,6±7,3

Умеренное ускорение СОЭ отмечалось у 55,3% пациентов. У 29 пациентов (61,7%) отмечались изменения в анализе мочи: умеренная лейкоцитурия, альбуминурия. Повышение содержания мочевины более 5,6 ммоль/л выявлено у 13 пациентов (27,7%). Изменение в копрограмме определялось у 34 (72,3%) детей (наличие нейтрального жира, непереваренной клетчатки, зерен крахмала, слизи, лейкоцитов).

Оценка преморбидного фона показала, что среди госпитализированных детей с КИ только 19 (40,4%) детей относились к группе практически здоровых. У 28 детей (59,6%) отмечались фоновые заболевания: у 15 детей (31,9%) выявлена анемия, у 8 детей (17,0%) – экссудативно-катаральный диатез, у 3 пациентов (6,4%) – рахит, у 2 детей (4,3%) – гипотрофия. На искусственном вскармливании находились 35 детей (74,5%).

Таким образом, причиной роста удельного веса ОКИ, вызванных УПФ, может быть не только увеличение ежегодного числа заболевших этими инфекциями и реальный рост заболеваемости, но и расширение возможностей, и улучшение лабораторной диагностики, а также увеличение числа лабораторно обследованных лиц, главным образом детей в возрасте до 3 лет.

Заключение:

1. Заболеваемость КИ у детей за последние 5 лет имеет тенденцию к росту. Высокая заболеваемость КИ отмечается у детей первых трех лет жизни.

2. Клинические особенности КИ характеризуются острым началом, лихорадкой, диареей. Заболевание протекает в среднетяжелой форме. Отсутствует четко выраженная сезонность КИ.

3. Клебсиеллез чаще встречается у детей с неблагоприятным преморбидным фоном. Наиболее уязвимым контингентом являются дети первых лет жизни, находящиеся на искусственном вскармливании. Клиническое течение КИ зависит от предрасполагающих факторов: недоношенности, гипотрофии, рахита, анемии.

Литература

1. Острые кишечные инфекции у детей (диагностика, классификация, лечение): пособие для врачей / В.Ф. Учайкин [и др.]. — М., 2003. — 34 с.

2. Тимченко, В.Н. Диагностика, дифдиагностика и лечение детских инфекций / В.Н. Тимченко, В.В. Леванович, И.Б. Михайлов. — СПб.: ЭЛБИ, 2004. — 384 с.

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

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

5. Романцов, М.Г. Патогенетически обоснованная иммуностропная терапия кишечных инфекций у детей (клинический обзор) / М.Г. Романцов, О.В. Тихомирова // Фундаментальные исследования. — 2010. — № 3. — С. 122–137.

6. Pronko, N.V. Epidemiologic, etiologic and age aspects of the syndrome of diarrhea in children / N.V. Pronko // Proc. Interfaces and Controversies in Gastroenterology Falk Symp., Mainz, October 2012. — Published: Digest. Dis. — 2013. — Vol. 31, № 1. — P. 62.

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

CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF KLEBSIELLA INFECTIONS IN CHILDREN AT THE PRESENT STAGE

Pronko N.V., Fisherman T.G.

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Republic of Belarus

The analysis of the clinical and epidemiological features of current klebsiella intestinal infection in children has been done. It was found that for klebsiella infection is characterized by a tendency to infect children for the first years of their life. When outbreaks of acute intestinal infections occurring in children's groups, patients should be investigated for opportunistic intestinal group tin order to optimize not only the treatment methods, but also epidemic control measures.

Keywords: acute intestinal infections, klebsiella infection, children.

Поступила 15.07.2016

АНАЛИЗ ПОРАЖЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ КИШЕЧНЫХ ПРОТОЗОЙНЫХ ИНВАЗИЙ ПАЦИЕНТОВ, ОБСЛЕДОВАННЫХ В РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

Пугач В.В., Карамышева Ю.С., Якубович А.Е., Гудков В.Г.

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

Реферат. Представлены результаты анализа пораженности возбудителями кишечных протозоозов пациентов Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии за 2015–2016 гг. Определены показатель пораженности возбудителями кишечных протозоозов, этиологическая структура выявленной патологии. Проанализировано возрастное распределение инвазированных, исследована зависимость интенсивности инвазии от возраста пациентов.

Ключевые слова: патогенные простейшие, кишечные протозоозы, анализ.

Введение. Проблема паразитозов актуальна для всех стран мира независимо от уровня их экономического развития. Так, показатели пораженности одним из наиболее распространенных протозоозов — лямблиозом — в США составляли 6,4 на 100 тыс. населения в 2011 г. и 5,8 на 100 тыс. населения в 2012 г. [1].

Подавляющее большинство паразитозов не имеет характерной клинической картины, на основании которой можно было бы эффективно осуществлять дифференциальную диагностику с другими инфекционными и неинфекционными заболеваниями, следствием чего нередко являются диагностические ошибки, запоздалое и неадекватное для паразитарной инвазии лечение. Это, в свою очередь, обуславливает высокую вероятность развития тяжелых форм паразитарных инвазий и их осложнений, таких как индукция неопластических трансформаций в окружающих паразита тканях, сенсбилизация организма человека-хозяина продуктами обмена паразитов с последующей патологической перестройкой иммунной системы по аллергическому типу, тяжелые гнойно-септические осложнения и др.

Одной из наиболее актуальных групп паразитозов являются кишечные протозоозы. По оценочным данным ВОЗ, ежегодно в мире одним из наиболее распространенных протозоозов — лямблиозом — заражаются около 200 млн человек, при этом клинически выражено инвазия протекает лишь у 500 тыс. человек, вследствие чего истинная распространенность возбудителя лямблиоза в популяции человека неизвестна [2].

Основным механизмом заражения при этом паразитозе является фекально-оральный, наиболее часто реализующийся посредством водного, пищевого пути или прямого контакта с контаминированным материалом и/или инвазированным (носителем) [1, 2]. Вегетативные формы (трофозоиты) *Giardia lamblia* неустойчивы во внешней среде. По мере продвижения в дистальные отделы тонкой и проксимальные отделы толстой кишок, где условия для их существования неблагоприятны, тропозоиты формируют вокруг себя прочную защитную оболочку с образованием цист (стадии покоя), высокорезистентных к агрессивным факторам окружающей среды (в т. ч. дезинфицирующим агентам) [1, 2].

Клинические проявления лямблиоза весьма разнообразны, у многих инвазированных заболевание протекает в субклинических, стертых формах, что является предрасполагающим фактором для формирования хронических форм инвазии и паразитоносительства. При этом значительно повышается риск развития сопутствующих патологических состояний, обусловленных персистенцией паразитов в организме. Эпидемиологическое значение бессимптомных паразитоносителей существенно: они способны на протяжении длительного времени выделять инфекционный материал в окружающую среду, обуславливая ее широкую и массивную (до 2 млрд цист/сут) контаминацию.

В Республике Беларусь, согласно государственной статистической отчетности за 2014 г., показатель заболеваемости населения протозоозами по сравнению с предшествующим отчету 2013 г. вырос на 10,2% и составил 15,19 случая на 100 тыс. населения. При этом в структуре пяти зарегистрированных нозоформ (криптоспоридиоз, лейшманиоз, лямблиоз, малярия, токсоплазмоз) доминировал лямблиоз, на долю которого пришлось 98,3% от общего количества случаев инвазий патогенными простейшими, а показатель пораженности лямблиями среди обследованного населения составлял 0,19% [3, 4].

Другим распространенным протозоозом является бластоцистоз (возбудитель — *Blastocystis hominis*). По данным литературы, частота встречаемости бластоцистоза в виде клинически выраженных форм и(или) паразитоносительства варьирует от 20% в развитых странах (23% населения США в 2000 г.) до практически 100% в развивающихся странах и странах третьего мира [5]. Бластоцистоз, как и лямблиоз, имеет фекально-оральный механизм заражения и аналогичные пути инфицирования.

В клинической картине бластоцистоза доминируют такие симптомы, как боль в животе, запор или диарея, потеря массы тела, утомляемость. Среди прочих симптомов следует отметить головную боль, кожные высыпания, артритические симптомы и боли в суставах, а также воспалительные изменения кишечника. Тяжесть заболевания в значительной степени зависит от индивидуальных особенностей организма.

В настоящее время в мире проводятся исследования по изучению ассоциации *Blastocystis hominis* с такими патологическими состояниями, как синдром раздраженного кишечника и воспалительными заболеваниями кишечника (синдром Крона, язвенный колит) [6–8]. Так, исследование, проведенное в Европе *A. Giacometti et al.* (1999), установило статистически значимые различия в частоте инфицированности бластоцистами пациентов с синдромом раздраженного кишечника и в группе сравнения [6]. Аналогичные исследования, проведенные на Среднем Востоке *J. Yacoob et al.* (2004), также показали, что пораженность бластоцистозом пациентов с синдромом раздраженного кишечника составляла 46%, в то время как в группе сравнения она была около 7% [8].

Цель работы — анализ пораженности возбудителями кишечных протозойных инвазий пациентов, обследованных в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии по направлению лечебных учреждений или по собственной инициативе в 2015–2016 гг.

Материалы и методы. С мая 2015 г. по май 2016 г. в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии было исследовано 1819 проб фекалий на наличие цист патогенных кишечных простейших. Пробы отбирались и доставлялись в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии пациентами и исследовались в день их доставки методом формалин-эфирного осаждения [9]. Критерием определения пораженности служило обнаружение хотя бы одной цисты патогенных кишечных простейших любого вида в исследуемой пробе. Интенсивность цистовыделения на момент исследования оценивалась по среднему количеству цист патогенных кишечных простейших, обнаруженных при исследовании всего осадка, полученного в результате исследования одной пробы. Возраст пациентов варьировал в пределах от 2 мес. до 85 лет. Анализировалась этиологическая структура выявленных инвазий, уровни

пораженности патогенными кишечными простейшими, интенсивность цистовыделения на момент исследования как среди всех обследованных пациентов, так и в их повозрастной разбивке.

Результаты и их обсуждение. В результате исследования было установлено, что пораженность патогенными кишечными простейшими среди обследованных лиц составила $49,42 \pm 2,34\%$ ($p = 0,05$; $n = 899$). В этиологической структуре выявленных протозоозов представлены лямблиоз и бластоцистоз. Среди обследованных пациентов показатель пораженности *Giardia lamblia* составил $38,04 \pm 2,28\%$ ($p = 0,05$; $n = 692$), *Blastocystis spp.* — $14,35 \pm 1,64\%$ ($p = 0,05$; $n = 261$). Удельный вес лямблиоза среди пораженных простейшими составил $70,97 \pm 3,03\%$ ($p = 0,05$), а бластоцистоза — $23,03 \pm 2,81\%$ ($p = 0,05$), микст-инвазии — $6 \pm 1,58\%$ ($p = 0,05$; $n = 54$).

На рисунке 1 представлены данные об уровнях пораженности патогенными кишечными простейшими пациентов, обследованных в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии с 05.2015 г. по 05.2016 г. в помесечной разбивке.

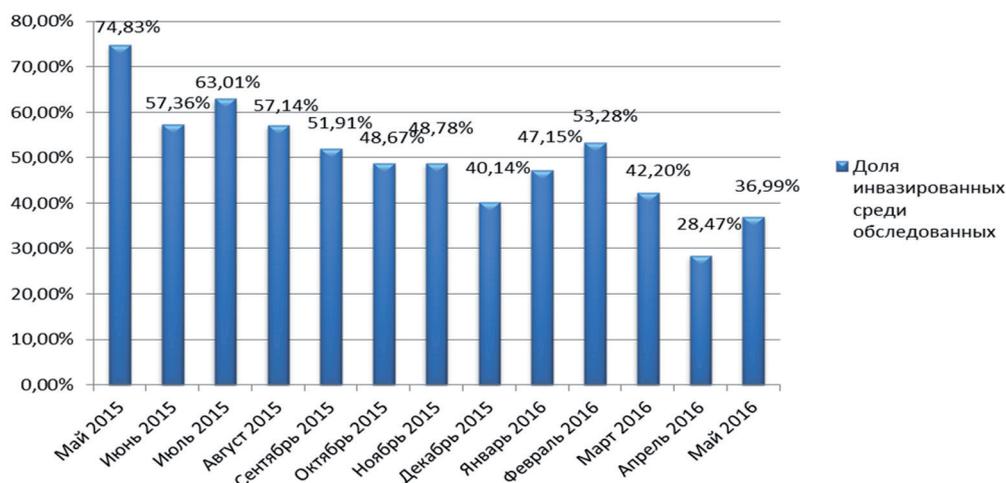


Рисунок 1. — Уровни пораженности патогенными простейшими населения г. Минска, обследованного в РНПЦЭиМ в 2015–2016 гг.

На протяжении исследуемого периода максимальная пораженность патогенными кишечными простейшими регистрировалась в мае 2015 г. ($74,83 \pm 3,58\%$, $p = 0,05$; $n = 110$), минимальная — в апреле 2016 г. ($28,47 \pm 3,86\%$, $p = 0,05$; $n = 39$).

Для анализа возрастного распределения пораженности возбудителями протозоозов все пациенты были разделены на пять групп: 0–1 год, 1–2 года, 3–6 лет, 7–17 лет и 18 лет и старше. На рисунках 2, 3 представлена информация о возрастной структуре пораженных и об уровнях пораженности пациентов отдельных возрастных групп.

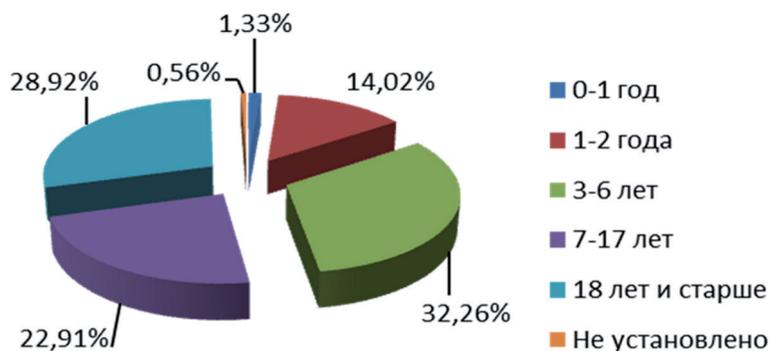


Рисунок 2. — Возрастная структура пораженных возбудителями кишечных протозоозов

Наибольший вклад в структуру пораженных пациентов внесла возрастная группа 3–6 лет. При этом наименьший удельный вес в структуре пораженных патогенными кишечными простейшими

имеет группа 0–1 год, что, вероятно, обусловлено тем, что эта группа является самой малочисленной среди обследованных.

В возрастной структуре инвазированных лямблиями доминировала группа 3–6 лет (34,54%±3,62, $p = 0,05$; $n = 239$), а среди инвазированных бластоцистами превалировало взрослое население (40,61±6,08%, $p = 0,05$; $n = 106$).

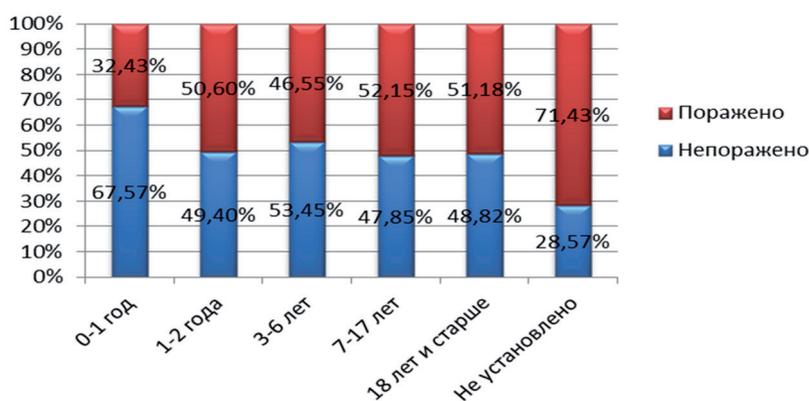


Рисунок 3. — Пораженность патогенными простейшими отдельных возрастных групп пациентов

Наиболее высокими показателями пораженности характеризовались возрастные группы 7–17 лет (52,15±5,03%, $p = 0,05$; $n = 206$), 18 лет и старше (51,18±4,44%, $p = 0,05$; $n = 260$) и 1–2 года (50,6±6,34%, $p = 0,05$; $n = 126$), в то время как группы 0–1 год и 3–6 лет характеризовались несколько более низкими показателями пораженности (32,43±15,39%, $p = 0,05$; $n = 12$ и 46,55±4%, $p = 0,05$; $n = 290$ соответственно).

Также был проведен внутригрупповой анализ интенсивности цистовыделения у пациентов при инвазиях лямблиями и бластоцистами на момент их обследования, результаты которого представлены на рисунках 4, 5.

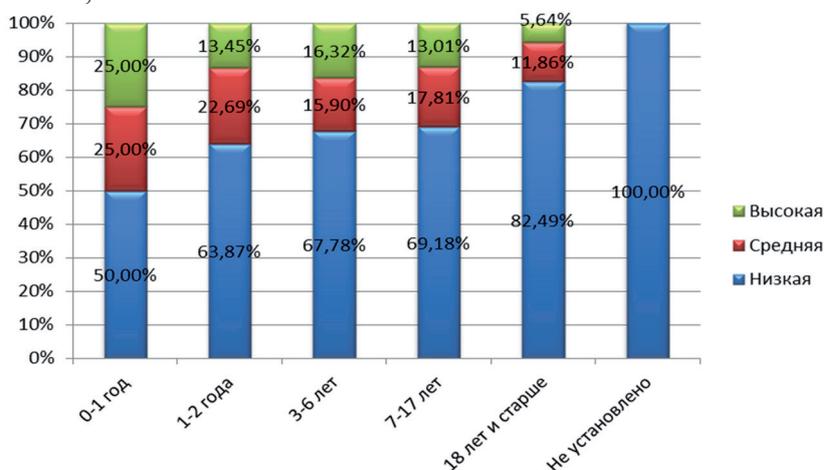


Рисунок 4. — Интенсивность цистовыделения в различных возрастных группах пациентов, инвазированных *Giardia lamblia*, на момент их обследования

Среди пораженных *Giardia lamblia* цистовыделение высокой интенсивности чаще всего наблюдалось у пациентов возрастной группы 0–1 год (25±15,31%, $p = 0,05$; $n = 2$), а цистовыделение низкой интенсивности — у пациентов возрастной группы 18 лет и старше (82,49±2,86%, $p = 0,05$; $n = 146$).

Среди пораженных *Blastocystis spp.* цистовыделение высокой интенсивности чаще всего наблюдалось у пациентов возрастной группы 18 лет и старше (8,49±2,71%, $p = 0,05$; $n = 9$), а цистовыделение низкой интенсивности — у пациентов возрастной группы 1–2 года (91,67±7,98%, $p = 0,05$; $n = 11$).

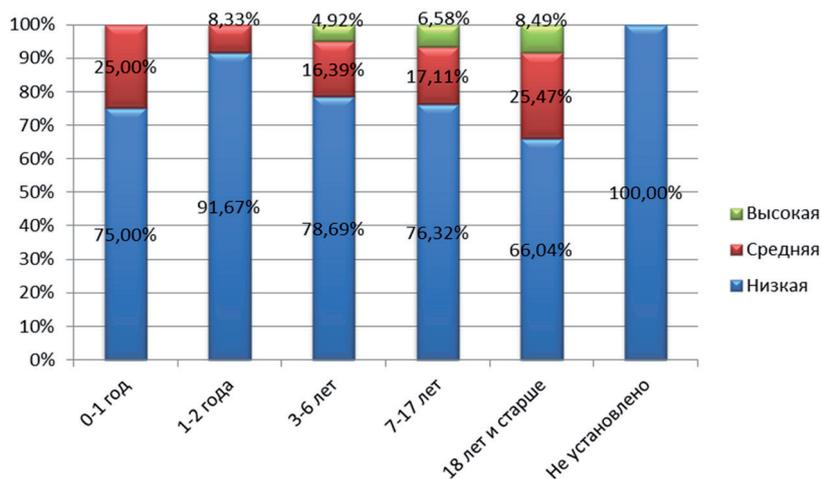


Рисунок 5. — Интенсивность цистовыделения в различных возрастных группах пациентов, инвазированных *Blastocystis spp.*, на момент их обследования

При анализе интенсивности цистовыделения на момент обследования было установлено, что цистовыделение малой интенсивности при инвазии кишечными лямблиями чаще всего наблюдалась в группе 3–6 лет ($32,93 \pm 4,24\%$, $p = 0,05$; $n = 162$), а бластоцистами — в группе 18 лет и старше ($36,46 \pm 6,95\%$, $p = 0,05$; $n = 70$). При этом массивное цистовыделение *G. lamblia* чаще всего наблюдалась в возрастной группе 3–6 лет ($45,35 \pm 10,74\%$, $p = 0,05$; $n = 39$), а *Blastocystis spp.* — в возрастной группе 18 лет и старше ($52,94 \pm 24,21\%$, $p = 0,05$; $n = 9$). Следует отметить, что $42,59 \pm 13,46\%$ ($p = 0,05$; $n = 23$) случаев микст-инвазий наблюдалось в возрастной группе 18 лет и старше.

При внутригрупповом анализе интенсивности цистовыделения при лямблиозе была выявлена тенденция к его уменьшению с увеличением возраста, в то время как при бластоцистной инвазии — напротив. Выявленные особенности возрастного распределения инвазированных патогенными кишечными простейшими, по-видимому, связаны с уровнем владения гигиеническими навыками и возрастными особенностями питания лиц разных возрастов. Поскольку основным механизмом заражения лямблиозом является фекально-оральный, реализующийся чаще всего через контаминированную цистами простейших воду, продукты питания, а также при тактильном контакте с контаминированными поверхностями и/или паразитоносителями, группой, в которой наиболее вероятно широкое распространение лямблиоза, является группа 3–6 лет, что обусловлено несформированностью гигиенических навыков и обилием тесных межличностных контактов. Немаловажную роль при этом играет низкая инфицирующая доза, составляющая при лямблиозе около 10 цист.

Характер выявленного возрастного распределения инвазированных бластоцистами, по-видимому, связан с тем, что дети в возрасте от 0 до 2 лет чаще всего находятся на грудном вскармливании и вместе с материнским молоком получают широкий спектр антимикробных гуморальных и клеточных факторов, обладающих протективным эффектом в отношении *Blastocystis spp.*, а также микроорганизмы, выступающие в роли антагонистов возбудителей бластоцистоза (бифидобактерии), и факторы, способствующие их приживанию и размножению в кишечнике ребенка (олигосахариды, бифидус-фактор) [10].

Заключение. Проанализирована пораженность возбудителями кишечных протозойных инвазий пациентов, обследованных в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии по направлению лечебных учреждений или по собственной инициативе в 2015–2016 гг. Уровень пораженности возбудителями кишечных протозоозов среди обследованных был высоким и составлял более 49%. Этиологическая структура выявленных протозоозов представлена *Giardia lamblia* и *Blastocystis spp.*, при этом доминирующим патогеном являются *Giardia lamblia*, которые были выявлены у 71% инвазированных. Уровни пораженности населения кишечными простейшими *Blastocystis spp.* и *Giardia lamblia* могут быть оценены как высокие (около 14 и 38% обследованных соответственно). Была выявлена тенденция к уменьшению интенсивности цистовыделения с увеличением возраста при лямблиозной инвазии, в то время как при бластоцистной инвазии аналогичная тенденция противоположна.

Выдвинуто предположение о возможном наличии протективного эффекта грудного молока в отношении *Blastocystis spp.*

Литература

1. Giardiasis Surveillance — United States, 2011–2012 Surveillance Summaries [Electronic resource] / E. Julia [et al.]. — 2015. — Mode of access: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss6403a2.htm>. — Date of access: 13.07.2016.
2. Giardiasis [Electronic resource]. — Mode of access: <http://www.who.int/ith/diseases/giardiasis/en/>. — Date of access: 13.07.2016.
3. Гельминтозы, протозоозы, трансмиссивные зоонозы и заразные кожные заболевания в Республике Беларусь: информ. бюл. за 2014 г. / Респ. центр гигиены, эпидемиологии и общ.о здоровья; под общ. ред. В.В. Гриня. — Минск, 2015. — 32 с.
4. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Беларусь в 2014 году» / М-во здравоохран. Респ. Беларусь; под ред. И.В. Гаевского. — Минск, 2015. — С. 35–36.
5. Amin, O.M. Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000 / O. M. Amin // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 2002. — Vol. 66, № 6. — P. 799–803.
6. Giacometti, A. Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection / A. Giacometti [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 1999. — Vol. 18, № 6. — P. 436–439.
7. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis spp.* / T. Roberts [et al.] // Gut Pathog. — 2014. — Vol. 6. — P. 17. — doi: 10.1186/1757-4749-6-17.
8. Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis* / J. Yakoob [et al.] // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 2004. — Vol. 70, № 4. — P. 383–385.
9. Инструкция 4.2.11-19-9-2004 «Паразитологические методы лабораторной диагностики гельминтозов и протозоозов»: утв. постановлением Первого зам. Гл. гос. сан. врача Респ. Беларусь 03.05.2004 № 49. — Минск, 2004.
10. Riordan, J. Breastfeeding and human lactation / J. Riordan, K. Wambach. — Burlington: Jones & Bartlett Publishers, 2004. — 936 pp.

ANALYSIS OF INTESTINAL PROTOZOAL INFECTIONS INCIDENCE AMONG PATIENTS, EXAMINED AT THE REPUBLICAN RESEARCH & PRACTICAL CENTRE FOR EPIDEMIOLOGY AND MICROBIOLOGY

Pugach V.V., Karamyshava Y.S., Yakubovich A.Y., Gudkov V.G.

*State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus*

In the article results of analysis of incidence of intestinal protozooses, revealed in patients at the Republican Research & Practical Centre for Epidemiology and Microbiology in 2015–2016, are presented. Index of affection with pathogenic intestinal Protozoa among examined patients, etiological structure of revealed pathology was determined. Analysis of age distribution of infected patients was carried out, dependence of infection intensiveness on patients age has been researched.

Keywords: pathogenic Protozoa, intestinal protozooses, analysis.

Поступила 16.09.2016

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗИСТЕНТНЫХ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Пугач В.В., Шишпоренок Ю.А., Ботян А.А., Горбунов В.А.

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

Реферат. В статье приведены результаты эпидемиологического анализа данных об антибиотикорезистентных штаммах *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в учреждениях здравоохранения Республики Беларусь в 2015–2016 гг. Проанализирована структура причин госпитализации пациентов, инфицированных антибиотикорезистентными *K. pneumoniae*, установлены отделения учрежде-

ний здравоохранения, в которых циркуляция антибиотикорезистентных клебсиелл наиболее активна, определены наиболее частые локусы выделения, частота возникновения и спектры резистентности *K. pneumoniae* к антимикробным химиопрепаратам.

Ключевые слова: антимикробные химиопрепараты, антибиотикорезистентность, *Klebsiella pneumoniae*, эпидемиологический анализ.

Введение. Изучение вопросов, связанных с устойчивостью возбудителей инфекционных заболеваний к антибактериальным препаратам, является одним из приоритетных направлений исследований в медицине. Согласно позиции специалистов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), Европейского центра по профилактике и контролю заболеваний (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC), проблема устойчивости к антимикробным препаратам, в т. ч. к антибиотикам, уже не является прогнозом на будущее и представляет собой серьезную опасность, поскольку антибиотикорезистентные штаммы бактерий все шире распространяются по всему миру независимо от региона или страны [1, 2]. Так, например, по данным проведенного в 2013 г. Sanchez et al. исследования, за 1998–2010 гг. в США был отмечен существенный рост резистентности бактерий вида *Klebsiella pneumoniae* ко всем классам антибактериальных препаратов. Исключение составил лишь тетрациклин, рост резистентности к которому был не так значителен [3].

Одной из наиболее актуальных проблем в этой области является изучение микробиологических, молекулярно-генетических и эпидемиологических свойств возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Согласно определению ВОЗ, ИСМП — это инфекции, развивающиеся у пациентов во время получения медицинской помощи в больнице или другом медицинском учреждении, которые отсутствовали и не находились на стадии инкубационного периода у пациентов на момент их госпитализации. Также в группу ИСМП включают и инфекционные заболевания медицинского персонала, возникновение и развитие которых связано с выполнением прямых служебных обязанностей. Одним из подходов к классификации ИСМП является их подразделение на группы в соответствии с природой этиологического фактора, а именно с условным выделением таких групп возбудителей инфекционных заболеваний, как «патогенные» и «условно-патогенные». Особого внимания заслуживают ИСМП, обусловленные условно-патогенными микроорганизмами (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* и т. д.) ввиду значительного эпидемического потенциала возбудителей, относящихся к данной группе (высокая устойчивость к агрессивным факторам окружающей среды, в т. ч. антимикробным средствам (АМС), способность к широкому распространению посредством многочисленных факторов и путей передач (вода, контаминированные поверхности, руки пациентов и медицинского персонала и т. д.) быстрому формированию резистентности к АМС (антибиотики, дезинфектанты, антисептики)).

По оценочным данным экспертов, в 2002 г. в США ИСМП регистрировались с частотой 4,5 случая на 100 пациентов (около 1,7 млн случаев по всей стране), при этом летально окончились 99 тыс. случаев. Схожие данные демонстрируют и европейские исследования [4]. В развивающихся странах регистрируемая частота возникновения ИСМП находится на еще более высоком уровне и составляет 15,5 случая на 100 пациентов [5]. Согласно исследователям из США, ежегодный экономический ущерб, наносимый ИСМП государству, может быть оценен суммой от 5 до 10 млрд долларов США [6]. При этом считается, что возникновение и развитие около трети всех случаев ИСМП возможно предотвратить [7].

Наиболее распространенными возбудителями ИСМП являются грамотрицательные бактерии, которые обуславливают около 30% всех случаев [4, 5]. При этом уровни резистентности грамотрицательных микроорганизмов к АМС, как правило, весьма высоки, что обусловлено многообразием механизмов нейтрализации АМС и их эффектов [4].

Согласно информации ВОЗ, одним из наиболее распространенных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (пневмонии, сепсис, инфекции новорожденных и пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ)), является *Klebsiella pneumoniae* [4]. При этом наблюдается возникновение и все более широкое распространение штаммов данного микроорганизма, резистентных к практически всем известным на сегодняшний день антибиотикам, в т. ч. к антибиотикам резерва (карбапенемы) [2]. Так, согласно исследованиям, опубликованным в 2009 г. в США, 27,1% штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из крови, были устойчивы к цефа-

лоспоринам третьего поколения, а 10,8% — к карбапенемам [8]. Помимо этого, в мире уровни устойчивости *Klebsiella pneumoniae* к АМС с каждым годом растут, все чаще регистрируются штаммы с устойчивостью ко всем известным классам антибиотиков, в т. ч. к полимиксидам [3]. Особо тревожащей является тенденция к распространению полирезистентных штаммов *K. pneumoniae*, обусловленная присутствием R-плазмиды рМЕТ1 и способностью к синтезу карбапенем-гидролизующих бета-лактамаз [9].

Наиболее часто штаммы микроорганизмов с приобретенной устойчивостью к антимикробным препаратам выявляются при микробиологическом мониторинге в организациях здравоохранения [10]. Следствием возникновения и распространения антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов является увеличение длительности пребывания пациентов в стационаре, стоимости лечения, рост количества случаев инфекций с тяжелым клиническим течением, инфекционных осложнений заболеваний неинфекционной природы, увеличение показателей смертности и летальности.

Следует отметить, что состояние макроорганизма, и в частности его иммунный статус, является одним из ведущих факторов, обуславливающих восприимчивость пациентов к антибиотикорезистентным возбудителям, а также существенно влияющих на вероятность возникновения и развития инфекций (инфекционных осложнений), обусловленных антибиотикорезистентными возбудителями. Примером особо уязвимых групп пациентов могут служить лица с тяжелыми хроническими заболеваниями (сахарный диабет), иммунокомпрометированные лица (ВИЧ-инфицированные), лица, длительно находящиеся на стационарном лечении, а также лица, получающие иммуносупрессивную терапию (пациенты с онкологической патологией, а также пациенты в пре- и посттрансплантационном периоде), а также дети и лица в возрасте старше 65 лет.

Цель работы — эпидемиологическая характеристика антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от пациентов учреждений здравоохранения Республики Беларусь за 2015–2016 гг.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись 122 клинических штамма бактерий вида *K. pneumoniae*. Культуры микроорганизмов были выделены из клинического материала пациентов учреждений здравоохранения Республики Беларусь (42 организации) в 2015–2016 гг. и доставлены в Референс-центр мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов (ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»). Видовая идентификация микроорганизмов проводилась стандартными методами (микробиологическое исследование, биохимические тесты). Чувствительность штаммов *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам определялась диско-диффузионным методом, методом серийных разведений, а также при помощи автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact. Штаммы, присланные из Гомельской области, не были включены в настоящее исследование ввиду неполноты сведений об их антибиотикорезистентности.

Результаты и их обсуждение. В результате эпидемиологического анализа полученных данных было установлено, что наибольшее количество антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae* было выявлено в Минской (38,5%) и Брестской областях (27%). Наиболее часто устойчивые к антибиотикам штаммы *K. pneumoniae* выделялись от пациентов отделений интенсивной терапии и реанимации (43,4%). При этом от пациентов отделений хирургического профиля антибиотикорезистентные *K. pneumoniae* выделялись в 9,8% случаев. Более 26% полученных штаммов были выделены в совокупности от пациентов отделений терапевтического профиля; 6,6% штаммов были выделены от амбулаторных пациентов (рисунок 1).

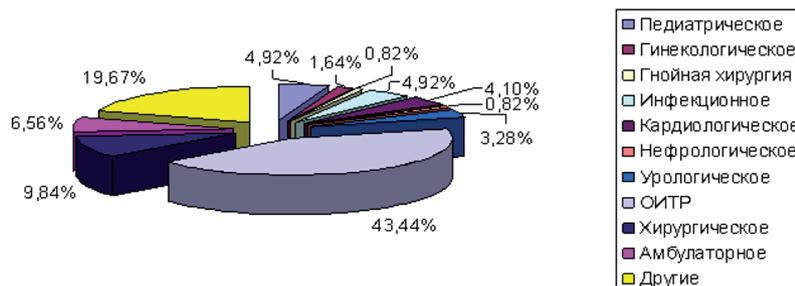


Рисунок 1. — Распределение антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae* в зависимости от профиля отделения

Доминирующими локусами выделения резистентных к антибактериальным препаратам *K. pneumoniae* являлись моча (27,9%), кровь (23,8%), мокрота (18%) и отделяемое ран (9%) (рисунок 2).

Более 31% пациентов, от которых были выделены резистентные *K. pneumoniae*, находились на стационарном лечении по поводу заболеваний терапевтического профиля, около 19% — с инфекционной патологией (рисунок 3).

Далее была проанализирована информация об антибиотикорезистентности выделенных штаммов. Чувствительность *K. pneumoniae* изучалась ко всем известным классам антибактериальных препаратов (аминогликозидам, фторхинолонам, цефалоспорином, пенициллинам (в т. ч. защищенным пенициллинам), карбапенемам, тетрациклином, нитрофуранам, сульфаниламидам и полимиксином). Было установлено, что из 122 исследованных штаммов около трети (29,5%) обладают лекарственной устойчивостью ко всем антибактериальным препаратам, за исключением колистина и тигециклина. При этом 41,7% из них (15 штаммов) панрезистентны (PDR-штаммы; характеризуются отсутствием чувствительности ко всем известным классам антибактериальных препаратов); 46,7% PDR-штаммов выделены от пациентов Брестской области (рисунок 4).

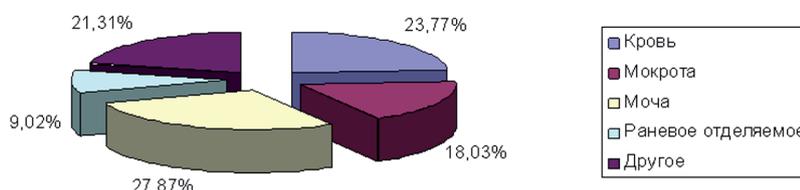


Рисунок 2. — Доминирующие локусы выделения антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae*

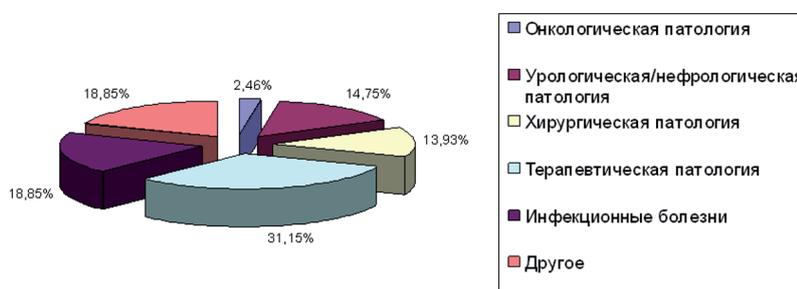


Рисунок 3. — Основные группы патологий, обусловивших необходимость госпитализации пациентов с антибиотикорезистентными *K. pneumoniae*

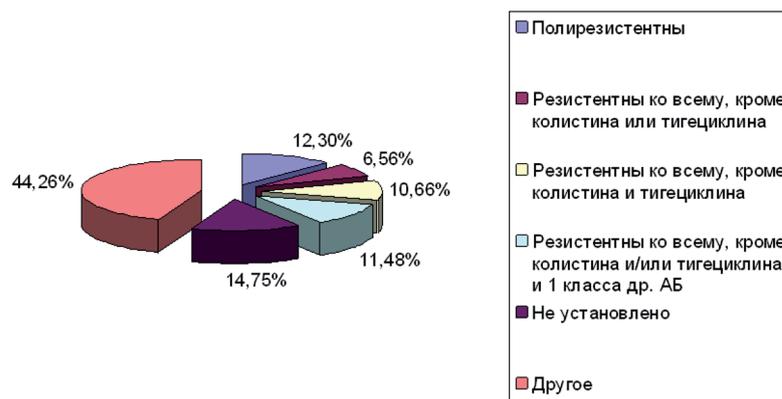


Рисунок 4. — Степень резистентности выделенных штаммов *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам

Заключение. Как следует из приведенных выше данных, более 43% всех антибиотикорезистентных штаммов было получено из ОИТР, что свидетельствует о необходимости микробиологического мониторинга в данных отделениях с обязательным определением профиля чувствительности к антибиотикам, дезинфектантам и антисептикам.

Чаще всего антибиотикорезистентные штаммы *K. pneumoniae* выделялись из мочи (29%), крови (24%) и мокроты (18%) госпитализированных пациентов, что, вероятно, связано с проникновением инфекционных агентов в организм человека во время инвазивных медицинских процедур (катетеризация мочевого пузыря, венепункции, интубация трахеи и пр. у пациентов ОРИТ) у пациентов с ослабленной иммунной системой и тяжелой сопутствующей патологией.

В качестве основного диагноза у 31% пациентов отмечена патология терапевтического профиля, в то время как патология хирургического профиля отмечена лишь у 14% пациентов. У 15 и 19% пациентов основной диагноз относится к группам урологической/нефрологической и инфекционной патологий соответственно. Такое распределение, возможно, объясняется тем, что в большинстве случаев при заболеваниях терапевтического профиля антибактериальные препараты назначаются эмпирически, а схемы антимикробной терапии нарушаются такими пациентами чаще, чем пациентами других профилей. Следует отметить, что в 2,5% случаев антибиотикорезистентные *K. pneumoniae* были выделены от пациентов с добро- и злокачественными неоплазиями. Несмотря на относительно небольшую долю пациентов с этой группой патологий в общей структуре, необходимо все же особое внимание уделять микробиологическому мониторингу микрофлоры онкологических отделений, поскольку у иммунокомпрометированных пациентов антибиотикорезистентные *K. pneumoniae* способны обуславливать возникновение и длительное персистирование патологических очагов инфекции, развитие тяжелых гнойно-септических осложнений. Тревожащей тенденцией является распространение антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae* среди пациентов, находящихся на амбулаторном лечении (более 6,5%), поскольку эти пациенты потенциально способны явиться источником инфекции для большого круга контактных лиц, тем самым способствуя широкому распространению устойчивых к антибактериальным препаратам штаммов *K. pneumoniae* среди населения Республики Беларусь.

Наличие резистентности к широкому спектру антибиотиков, за исключением колистина и/или тигециклина, у примерно 30% штаммов обуславливает более тяжелое, длительное течение заболевания, а также существенно увеличивает затраты на лечение пациентов. При этом более чем у 41% высокорезистентных штаммов *K. pneumoniae* наблюдается панрезистентность, что свидетельствует о потенциальной угрозе широкого распространения PDR-штаммов *K. pneumoniae* среди населения Республики Беларусь, в т. ч. посредством водного фактора.

Таким образом, результаты исследования подчеркивают актуальность изучения вопросов антибиотикорезистентности условно-патогенных микроорганизмов, обуславливают необходимость оптимизации отдельных мероприятий, входящих в профилактический и противоэпидемический по предотвращению распространения устойчивых к действию АМС штаммов микроорганизмов и разработки новых подходов к диагностике, лечению и профилактике ИСМП.

Коллектив авторов статьи выражает благодарность администрации и сотрудникам центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, предоставивших клинические штаммы микроорганизмов и информацию об их свойствах в ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии».

Литература

1. В Европе вдвое возросло число случаев устойчивости к карбапенемам [Электронный ресурс]. — Мед. вестн. — 2014. — Режим доступа: <http://medvestnik.by/ru/news/view/v-evrope-vdvoe-vozzroslo-chislo-sluchaev-ustojchivosti-k-karbarenemam-3462-2014/>. — Дата доступа: 05.04.2016.
2. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [Electronic resource] / World Health Organization. — 2014. — Mode of access: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1. — Date of access: 05.04.2016.
3. *Klebsiella pneumoniae* antimicrobial drug resistance, United States, 1998–2010 / G.V. Sanchez [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2013. — Vol. 19, № 1. — P. 133–136.
4. Peleg, A.Y. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria / A.Y. Peleg, D.C. Hooper // N. Engl. J. Med. — 2010. — Vol. 362, № 19. — P. 1804–1813.
5. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis / B. Allegranzi [et al.] // Lancet. — 2011. — Vol. 377, № 9761. — P. 228–241.
6. The economic impact of infection control: making the business case for increased infection control resources / P.W. Stone [et al.] // Am. J. Infect. Control. — 2005. — Vol. 33. — P. 542–547.
7. A compendium of strategies to prevent healthcare-associated infections in acute care hospitals / D.S. Yokoe [et al.] // Infect. Control Hosp. Epidemiol. — 2008. — Vol. 29, suppl. 1. — P. 12–21.
8. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007 / A.I. Hidron [et al.] // Infect. Control Hosp. Epidemiol. — 2008. — Vol. 29. — P. 996–1011.
9. *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pMET1: similarity with the *Yersinia pestis* plasmid pCRY and integrative conjugative elements / A.J. Soler Bistué [et al.] // PLoS One. — 2008. — Vol. 3, № 3. — e1800. doi: 10.1371/journal.pone.0001800.
10. 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. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2013. — Вып. 6. — С. 152–161.

CHARACTERISTICS OF RESISTANT TO ANTIMICROBIAL DRUGS *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS, ISOLATED IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Pugach V.V., Shishparonak Y.A., Batsian A.A., Gorbunov V.A.

State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus

In this article results of epidemiological analysis of data about resistant to antibiotics *Klebsiella pneumoniae* strains, isolated at medical care establishments of the Republic of Belarus in 2015–2016, are shown. Analysis of structure of reasons of hospitalization of patients, infected with resistant to antibiotics *K. pneumoniae*, is carried out, units of medical care establishments, where circulation of drug resistant *K. pneumoniae* is the most active, are indicated, the most frequent isolation locuses, frequency and spectra of resistance of *K. pneumoniae* to antimicrobial drugs are determined.

Keywords: antimicrobial drugs, antibiotic resistance, *Klebsiella pneumoniae*, epidemiological analysis.

Поступила 22.08.2016

**ПРОФИЛЬ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ
У ШТАММОВ *UREAPLASMA UREALYTICUM/PARVUM* И *MYCOPLASMA HOMINIS*,
ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА**

Рубаник Л.В., Якшевич А.И., Полещук Н.Н.

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

Реферат. При обследовании 180 пациентов г. Минска с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта в соскобном материале *Ureaplasma urealyticum/parvum* и *Mycoplasma hominis* выявлена в 19,4 и 3,9% случаев соответственно. При этом *Ureaplasma spp.* в виде монокультуры встречалась у 80,0% пациентов, а в ассоциации с *M. hominis* — в 20,0%. Отмечена высокая (94,3%) сопоставимость результатов культурального и ПЦР-исследования. Изучение *in vitro* профиля резистентности к антибиотикам различных штаммов микроорганизмов показало чувствительность к доксициклину в 100% случаев, джозамицину, тетрациклину и прistinамицину — по 97,1%. Установлена достаточно высокая резистентность (34,3%) выделенных возбудителей (преимущественно *Ureaplasma spp.*) к ципрофлоксацину. Учитывая, что 51,4% протестированных штаммов были моно- или полирезистентными к антибиотикам разных фармакологических групп, рекомендуется предварительно определять профиль антибиотикочувствительности *Ureaplasma urealyticum/parvum* и *M. hominis* до назначения лечения.

Ключевые слова: микоплазма, уреоплазма, резистентность к антибиотикам.

Введение. Вопрос о роли *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum/parvum* в этиологии и патогенезе заболеваний урогенитального тракта до сих пор не решен. Данные микроорганизмы достаточно широко распространены и часто выявляются у лиц, не имеющих клинической симптоматики. Одни авторы, относящие уреоплазмы к облигатным патогенам, считают, что они вызывают уретриты, цервициты, простатиты, послеродовые эндометриты, пиелонефриты, бесплодие, различную патологию беременности (хориоамниониты) и плода (легочную патологию). Другие исследователи полагают, что мико- и уреоплазмы являются частью условно-патогенной микрофлоры урогенитального тракта и способны вызывать инфекционно-воспалительные заболевания мочеполовых органов только при определенных условиях (в частности, при недостаточности иммунитета) или при микробных ассоциациях с *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, вирусами семейства *Herpesviridae* и другими облигатными патогенами [1–7].

Микоплазмы и уреоплазмы имеют существенные биологические отличия от «типичных» бактериальных возбудителей. Одно из них — это отсутствие клеточной стенки, что обеспечивает им природную устойчивость ко всем бета-лактамам и гликопептидным антибиотикам. Кроме того, микоплазмы устойчивы к полимиксину, рифампицину, сульфаниламидам, триметоприму и налидиксовой кислоте. Наиболее эффективными антибиотиками, подавляющими рост микоплазм, являются макролиды, тетрациклины и фторхинолоны. Несмотря на данный спектр лекарственных средств терапия урогенитальных инфекций, обусловленных этими патогенами, представляется довольно сложной и неоднозначной задачей. В последнее время описаны случаи клинической и микробиологической неэффективности терапии инфекций, обусловленных *M. hominis* и *U. urealyticum/parvum*, что в некоторых случаях приводит к хроническому или рецидивирующему течению урогенитальной патологии [1, 3, 7].

Профили резистентности мико- и уреоплазм к антибиотикам могут существенно различаться на разных территориях, изменяться с течением времени и зависеть от предпочтения в назначении врачами тех или иных препаратов. Тем не менее до сих пор не налажено широкое применение методов, направленных на изучение *in vitro* резистентности к антибиотикам штаммов *M. hominis* и *U. urealyticum/parvum*, циркулирующих в различных регионах нашей страны.

Цель работы — определение частоты выявления и профиля резистентности к антибиотикам штаммов *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum/parvum*, выделенных от пациентов с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта.

Материалы и методы. С сентября 2015 г. по июль 2016 г. проведено исследование мазков-соскобов из урогенитального тракта 180 человек, проходивших в РНПЦ эпидемиологии и микро-

биологии обследование в связи с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта (уретрит, цервицит, цистит, сальпингит, простатит и др.). Среди них 63 мужчины и 117 женщин в возрасте от 21 до 52 лет. Мазок-соскоб из уретры и цервикального канала забирался параллельно в две специальные транспортные среды: одна — для проведения ПЦР, другая — для культивирования микоплазм в жидкой питательной среде.

Выделение ДНК проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ) согласно инструкции производителя. Возбудители детектировали с помощью тест-системы «АмплиСенс *Chlamydia trachomatis/ Mycoplasma hominis/ Ureaplasma urealyticum/ Ureaplasma parvum-FL*» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ).

Параллельно микроорганизмы выявляли с помощью тест-системы *Mycoplasma-IST-2* (Bio-Merieux, Франция). Эта тест-система позволяет установить титр возбудителя в исследуемой пробе и определить чувствительность к 9 антибиотикам.

Интерпретация полученных результатов проводилась путем описательной статистики.

Результаты и их обсуждение. По результатам культивирования *Ureaplasma urealyticum/parvum* выявлена у 19,4%, а *M. hominis* — у 3,9% обследованных. Согласно данным ПЦР, *Ureaplasma spp.* обнаружена у 17,8%, *M. hominis* — у 2,8% пациентов. Следует отметить, что при разночтениях результатов двух вышеуказанных методов доминировали случаи, когда рост уреаплазм и/или микоплазм был зарегистрирован при культивировании в жидкой питательной среде, а данные по обнаружению специфического фрагмента ДНК были отрицательными. Это, вероятно, связано с аналитической чувствительностью используемого ПЦР-набора, заложенной в нем генетической мишенью, возможным ингибированием реакции компонентами исследуемого биологического образца и др. При этом в случае культивирования можно отметить рост патогенов при низких его количествах в исходной пробе (менее 10^4 КОЕ/мл). Кроме того, жидкая питательная среда обеспечивает возможность оптимального размножения возбудителя в течение 24–48 ч до окончательного учета результатов теста. В целом же в ходе исследований отмечена высокая сопоставимость результатов культурального исследования и ПЦР, которая составила в отношении обоих возбудителей 94,3%.

Примечательно, что *Ureaplasma spp.* обнаружена в виде моноинфекции в 80,0% случаев, а в остальных случаях (20,0%) — в сочетании с *M. hominis*. Микоплазмы в виде монокультуры обнаружены не были. В подавляющем большинстве случаев (88,6%) выявлена значимая концентрация *Ureaplasma urealyticum/parvum* — $\geq 10^4$ КОЕ/мл, а у 11,4% количество возбудителя было менее 10^4 КОЕ/мл. При этом в отношении *M. hominis* наблюдалась несколько иная ситуация: у 57,1% отмечалась концентрация $< 10^4$ КОЕ/мл и у 42,9% регистрировалось значимое количество *M. hominis* $\geq 10^4$ КОЕ/мл, т. е. полученные данные свидетельствуют, что наряду с более высокой распространенностью *Ureaplasma spp.* обладает и большим патогенетическим потенциалом, чем *M. hominis*.

Параллельно с выделением штаммов *Ureaplasma urealyticum/parvum* и *M. hominis* определяли их чувствительность к антибиотикам, содержащихся как в минимальной, так и максимальной концентрациях. Ниже приведены результаты определения *in vitro* лекарственной устойчивости выделенных штаммов *Ureaplasma urealyticum/parvum* и *M. hominis*.

Таблица — Чувствительность/резистентность выделенных штаммов *Ureaplasma urealyticum/parvum* и *M. hominis* к антибиотикам

Наименование антибиотика	% штаммов		
	резистентных	умеренно резистентных	чувствительных
Доксициклин	0	0	100
Джозамицин	2,9	0	97,1
Офлоксацин	2,9	2,9	94,2
Эритромицин	14,3	2,9	82,8
Тетрациклин	0	2,9	97,1
Ципрофлоксацин	34,3	8,6	57,1
Азитромицин	8,6	2,9	88,5
Кларитромицин	8,6	2,9	88,5
Пристинамицин	0	2,9	97,1

По результатам исследований 48,6% штаммов уреа- и микоплазм проявляли чувствительность ко всем 9 тестируемым антибиотикам, остальные штаммы в 34,3% случаев обладали резистентностью к одному антибиотику и 17,1% были полирезистентны. Среди наиболее часто назначаемых врачами антибиотиков отмечена высокая чувствительность патогенов к доксициклину (100%). Тетрациклин, прistinамицин и джозамицин не так широко применяются в практике, что, вероятно, обуславливает большое число (97,1%) чувствительных к ним штаммов возбудителей.

Остальные тестируемые антибиотики (эритромицин, азитромицин, кларитромицин) показали хоть и меньшую, но достаточно высокую эффективность (не менее 82,8–88,5%) в отношении выделенных мико- и уреоплазм. Это можно объяснить тем, что в последние годы для терапии урогенитальных инфекций значительно увеличился объем применения антибиотиков макролидного ряда (чаще назначаются азитромицин, кларитромицин и др.), и это, несомненно, оказало влияние на биологические свойства штаммов *Ureaplasma urealyticum/parvum* и *M. hominis*.

Выявлено, что наиболее высокий процент резистентных (34,3%) и умеренно-резистентных (8,6%) штаммов *Ureaplasma urealyticum/parvum* и *M. hominis* отмечен в отношении ципрофлоксацина. При этом перекрестная резистентность к ципрофлоксацину и офлоксацину отмечена в 13,3% случаях. На наш взгляд, полученные данные свидетельствуют о формировании и достаточно широкой распространенности у данных микроорганизмов (преимущественно *Ureaplasma spp.*) лекарственной резистентности к фторхинолонам, что требует не только внимания и учета со стороны врачей, но и дальнейшего мониторинга данного вопроса микробиологами и эпидемиологами.

К сожалению, использованная тест-система не охватила весь перечень применяемых в практике антибиотиков. Однако полученные данные о чувствительности/резистентности циркулирующих штаммов к протестированным лекарственным препаратам важны для оптимального его выбора и обеспечения эффективного лечения.

Следует отметить, что в целом споры по поводу патогенетической роли *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum/parvum* при урогенитальных инфекциях у человека не прекращаются до сих пор. В МКБ-10, международно признанном списке болезней, такого заболевания, как уреоплазмоз или уреоплазменная инфекция, не приведено. Так, известно, что *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* может обнаруживаться у 20–75% здоровых людей обоего пола. В некоторых исследованиях была показана связь между обнаружением *Ureaplasma urealyticum* и острым негенококковым уретритом в 5–10% случаев данного заболевания [1, 2, 7]. Как и для большинства представителей условно-патогенной микрофлоры, для уреоплазм выделяют ряд факторов, способствующих развитию инфекционно-воспалительных процессов. Наиболее важными из них являются иммунные нарушения, изменения гормонального статуса, массивность колонизации, ассоциации с другими возбудителями. По мнению ряда авторов, мико- и уреоплазма часто играют второстепенные роли в качестве причин сальпингита, уретрита, септического артрита и т. д., которые могут быть вызваны другими облигатными микроорганизмами [2]. Показанием к лечению является наличие клинико-лабораторных признаков инфекционно-воспалительного процесса, при котором не выявлены другие патогены, такие как *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*. В то же время во многих исследованиях сообщалось о высокой распространенности резистентности штаммов *U. urealyticum* и *M. hominis* к таким антибиотикам, как ципрофлоксацин, офлоксацин, эритромицин и тетрациклин. Исследования последних лет, проведенные в Иране, Германии, Мексике, Сербии, Греции, Турции, Кубе, Южной Африке показали, что по крайней мере половина штаммов *U. urealyticum* и *M. hominis* устойчивы к антибиотикам [4–7]. Различия в регистрируемом проценте устойчивости к тому или иному антибиотику связаны с предпочтениями врачей, бактерицидным действием антибиотиков, выбором метода определения чувствительности/резистентности возбудителя, а также отличиями в механизмах развития устойчивости против различных антибиотиков. Полагают, что чрезмерное и безрецептурное применение ципрофлоксацина, офлоксацина, кларитромицина, эритромицина и тетрациклина могло обусловить отмечаемый высокий уровень резистентности штаммов *U. urealyticum* и *M. hominis* в ряде стран [4–6].

Проведенные Хилькевичем Н.Д. и соавт. исследования показали, что чувствительность генитальных мико- и уреоплазм к этиотропным препаратам в период 2010–2015 гг. не претерпела существенных изменений [3]. Наиболее высокий процент резистентных штаммов *U. Urealyticum* был отмечен в отношении фторхинолонов: ципрофлоксацина — 90,3%, офлоксацина — 66,5%.

Нами получены сходные результаты в отношении доминирования резистентности штаммов *Ureaplasma urealyticum/parvum* к ципрофлоксацину по сравнению с другими проанализированными антибиотиками. Более низкий процент резистентных штаммов может быть обусловлен различиями в объеме и выборке обследованных пациентов. При этом полученные данные свидетельствуют о том, что эмпирическое лечение без выделения и идентификации особенностей конкретного штамма *Ureaplasma urealyticum/parvum* и *M. hominis* во многих случаях может быть малоэффективным. Учитывая изменение с течением времени чувствительности и резистентности штаммов возбудителей и появление новых, разрешенных к применению лекарственных средств, целесообразно проводить периодические мониторинговые исследования. На наш взгляд, необходима также разработка единого стандартизованного и общепринятого подхода определения чувствительности данных микроорганизмов к антибиотикам, чтобы провести дальнейшие широкомасштабные исследования и в целом оценить чувствительность и резистентность циркулирующих мико- и уреоплазм к применяемым в стране антибиотикам. Эти данные важны для клинической практики и обеспечения успешного лечения. Перспективным также является разработка отечественной импортозамещающей тест-системы, позволяющей проводить аналогичные исследования.

Заключение:

1. Частота встречаемости *Ureaplasma urealyticum/parvum* и *M. hominis* у обследуемого контингента составила 19,4 и 3,9% соответственно. При этом *Ureaplasma spp.* в виде монокультуры встречалась чаще (80,0%), чем в ассоциации с *M. hominis* (20,0%).
2. Отмечена высокая сопоставимость результатов культурального и ПЦР-исследования скобного материала, которая составила 94,3%.
3. В подавляющем большинстве случаев (88,6%) была выявлена значимая концентрация *Ureaplasma urealyticum/parvum* $\geq 10^4$ КОЕ/мл, в 11,4% — менее 10^4 КОЕ/мл. При этом в отношении *M. hominis* наблюдалась иная ситуация: у 57,1% отмечалась концентрация $< 10^4$ КОЕ/мл и у 42,9% регистрировалось значимое количество *M. hominis* — $\geq 10^4$ КОЕ/мл.
4. Наибольшую чувствительность в отношении *Ureaplasma urealyticum/parvum* и *M. hominis* показал *in vitro* доксициклин (100%), джозамицин, тетрациклин и прistinамицин (по 97,1%).
5. Наиболее высокая резистентность (34,3%) выделенных штаммов (преимущественно *Ureaplasma spp.*) установлена к ципрофлоксацину, что следует учитывать при назначении терапии.
6. Учитывая, что 51,4% протестированных штаммов моно- или полирезистентны к антибиотикам разных фармакологических групп, необходимо определять профиль антибиотикочувствительности *Ureaplasma urealyticum/parvum* и *M. hominis* до назначения этиотропной терапии.

Литература

1. Рахматулина, М.Р. Урогенитальные заболевания, вызванные генитальными микоплазмами (*Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis*) / М.Р. Рахматулина // Consilium Medicum. — 2012. — № 2. — С. 22–25.
2. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных урогенитальными заболеваниями, вызванными *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis*. — М., 2013. — 13 с.
3. Хилькевич, Н.Д. Чувствительность к антибиотикам генитальных микоплазм *U. urealyticum* и *M. hominis*, выделяемых в этиологически значимом количестве у амбулаторного контингента пациентов / Н.Д. Хилькевич // 90 лет в авангарде микробиологической науки Беларуси: сб. науч. тр. Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 125-летию со дня рождения Б.Я. Эльберта / Под ред. Л.П. Титова. — Минск: БГМУ, 2015. — С. 172–175.
4. Skiljevic, D. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in genital samples collected over 6 years at a Serbian university hospital / D. Skiljevic, D. Mirkov, J. Vukicevic // Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol. — 2016. — Vol. 82, № 1. — P. 37–41.
5. Frequency and antibiotic resistance of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in genital samples of sexually active individuals / B. Farkas [et al.] // Orv. Hetil. — 2011. — Vol. 152, № 42. — P. 1698–1702.
6. Azizmohammadi, S. Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* isolated from pregnant women / S. Azizmohammadi, S. Azizmohammadi // Iran. Red Crescent Med. J. — 2015. — Vol. 17, № 12. — P. 17211–1716.
7. 2015 UK National Guideline on the management of non-gonococcal urethritis / P. Horner [et al.] // Int. J. STD AIDS. — 2016. — Vol. 27, № 2. — P. 85–96.

ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE IN *UREAPLASMA UREALYTICUM* / *PARVUM* AND *MYCOPLASMA HOMINIS* STRAINS, ISOLATED FROM PATIENTS WITH INFLAMMATORY DISEASES OF THE UROGENITAL TRACT

Rubanik L.V., Yakshevich A.I., Poleshchuk N.N.

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

In patients with inflammatory diseases of the urogenital tract incidence of *Ureaplasma urealyticum/parvum* and *Mycoplasma hominis* was 19.4 and 3.9% respectively. Monoculture *Ureaplasma spp.* were identified more frequently (80.0%) than in association with *M. hominis* (20.0%). Demonstrated a high comparability of the results culture and PCR research (94.3%). Studying in vitro profile of resistance to antibiotics of isolated microorganisms showed the highest efficiency of doxycycline (100%), josamycin, tetracycline and pristinamycin (97.1%). Detected the high resistance (34.3%) of isolated strains (predominantly *Ureaplasma spp.*) to ciprofloxacin. Recommended defining the profile resistance *Ureaplasma urealyticum/parvum* and *M. hominis* strains to antibiotics before starting treatment because among the tested strains 51.4% were mono- or multiresistant to different antibiotics.

Keywords: Mycoplasma, Ureaplasma, antibiotic resistance.

Поступила 15.09.2016

ХАРАКТЕРИСТИКА МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНОСТИ ИЗОЛЯТОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ В ОРГАНИЗАЦИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ г. МИНСКА

Тонко О.В.¹, Коломиец Н.Д.¹, Ханенко О.Н.¹, Кицаева О.Ф.¹, Левшина Н.Н.², Гойлова А.В.³, Илькевич Н.Г.⁴

¹Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь;

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

³Государственное учреждение «Центр гигиены и эпидемиологии Фрунзенского района г. Минска»,
Минск, Республика Беларусь;

⁴Государственное учреждение «Городской клинический родильный дом № 2», Минск, Республика Беларусь

Реферат. *Staphylococcus aureus*, включая MRSA, является одной из наиболее частых причин инфекционных осложнений и заболеваний. Штаммы MRSA устойчивы не только к метициллину, но и ко многим другим бета-лактамам, включая цефалоспорины. Установлено высокое распространение MRSA в стационарах г. Минска в 2015 г. При оценке устойчивости *S. aureus* в отношении гликопептидов установлено, что все штаммы были чувствительны к ванкомицину.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, MRSA, гликопептиды, механизмы резистентности.

Введение. Стафилококки вызывают широкий спектр заболеваний — от инфекций кожи и мягких тканей до пневмонии и сепсиса, нередко приводящих к летальному исходу. *Staphylococcus aureus* — наиболее часто встречающийся резистентный возбудитель внутрибольничных инфекций в Европе. Первые упоминания о метициллин-резистентном стафилококке (MRSA) относятся к 1961 г., во время которого проводились клинические испытания метициллина в Англии. С того времени аббревиатура MRSA-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* стала наиболее встречаемой в научной литературе, посвященной антибиотикам. Устойчивость к метициллину (оксациллину), сопряженная с устойчивостью к другим β-лактамным антибиотикам, и дала название мультирезистентным стафилококкам. В настоящее время MRSA продолжает возглавлять список проблемных микроорганизмов. Смертность от MRSA-инфекций кровотока из-за задержки адекватного и отсутствия альтернативных схем лечения вдвое выше, чем от подобных инфекций, вызванных метициллин чувствительными штаммами. MRSA-инфекции эндемичны для всех лечебных учреждений мирового сообщества. В США MRSA в 2009–2010 гг. обусловлено 8,5% ВБИ [1]. В ЕС ежегодно возникает 170 тыс. MRSA-инфекций, из которых около 5 тыс. заканчиваются летально. MRSA обуславливают более 1 млн дополнительных койко-дней и обходятся европейской системе здравоохранения в сумму около 380 млн евро. По данным ECDC несмотря на то, что с 2010 по 2013 гг. в ЕС продолжилась тенден-

ция к снижению процентной доли MRSA как возбудителя ВБИ, она снижается менее выраженными темпами по сравнению с предыдущим четырехлетним периодом. В 2013 г. среди изолятов, выделенных от населения стран ЕС, средний процент MRSA оставался высоким — 18,3%, а в семи из 30 стран, представивших отчетность, циркуляция MRSA была выше 25% [2, 3]. Частота распространения MRSA в некоторых отделениях реанимации, онкологии и гематологии в России превышает 50–60%, что создает крайне серьезные проблемы для терапии [4].

S. aureus (GISA, hGISA), устойчивые к гликопептидам. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) *S. aureus*, устойчивых к ванкомицину, — >2 мг/л. Различают группы ванкомицинрезистентных штаммов стафилококков по степени устойчивости:

1. Штаммы с высокой устойчивостью к ванкомицину *S. aureus* (GRSA), детерминированной VanA геном (МИК >8 мг/л).

2. Умеренно-устойчивые штаммы с неизвестными механизмами устойчивости:

- гликопептид промежуточные *S. aureus* (GISA, МИК 4–8 мг/л);

- гетерорезистентные гликопептид промежуточные *S. aureus* (hGISA, большинство микробных клеток чувствительны к ванкомицину (МИК ≤2 мг/л), но 1 из 10⁶ клеток таких штаммов стафилококков устойчива к ванкомицину (МИК >2 мг/л).

У пациентов с тяжелыми стафилококковыми инфекциями проводится определение МИК ванкомицина в отношении *S. aureus*. Это необходимо для коррекции назначаемых препаратов. Из-за сложности обнаружения и подтверждения hGISA мониторинг резистентности направлен прежде всего на выявление GRSA и GISA. При неэффективности лечения ванкомицином необходимо обязательное исследование hGISA.

Факторами риска VRSA инфекции являются: присутствие в анамнезе инфекций либо колонизации MRSA или энтерококками; наличие сахарного диабета, хронических язв кожи; применение ванкомицина в анамнезе.

CDC в 2012 г. подтвердил 13 случаев выявления *S. aureus* GRSA у пациента с хроническим остеомиелитом. Мониторинг GRSA ведется CDC с 2002 г. [5]. Фенотип GISA *S. aureus* был выявлен в Японии в 1997 г. Первый изолят GRSA, зарегистрированный в Европе, относят к июню 2013 г. [6]. Распространенность в Европе hGISA составляет ≤2% от всех MRSA, GISA — менее 0,1%. Локальная распространенность hGISA, связанная с распространением специфических клонов, возможно, гораздо выше. Почти все изоляты GISA и hGISA являются MRSA.

Поскольку референс-исследований не проводилось, затруднительно оценить клиническое значение изолятов hGISA. Несмотря на это, обнаружение фенотипа *S. aureus* hGISA связывают с плохим прогнозом. Зачастую наблюдается тяжелое протекание инфекции. Также публикуются данные о повышении смертности при инфекциях кровотока, к которым приводят изоляты с МИК >1 мг/л. Противоречивы сведения о связи терапевтических неудач с устойчивыми субпопуляциями или повышением МИК отдельных клеток. Это приводит к необходимости исследований по выявлению hGISA при всех стафилококковых инфекциях, не поддающихся лечению ванкомицином.

Стандартные методы определения МИК неэффективны при выявлении hGISA. В настоящее время методология выявления hGISA сложна, требует специального оборудования для популяционного анализа и высокой профессиональной подготовки. В целях мониторинга, как правило, выявляют GISA и GRSA, которые вместе определяется как изоляты с МИК >2 мг/л.

Цель работы — оценка мультирезистентности изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных в 2015 г., и их распространенности в стационарах г. Минска.

Материалы и методы. Объектом исследования являлась информационная база WHONET за 2015 г., содержащая сведения о выявлении и резистентности *Staphylococcus aureus* микробиологической лаборатории ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии», а также анализ литературных данных по механизмам устойчивости наиболее проблемных изолятов.

Результаты и их обсуждение. Пенициллин и другие β-лактамы действуют на пенициллинсвязывающие белки (ПСБ). ПСБ — транспептидазы, ферменты, катализирующие последние стадии образования пептидогликана клеточной стенки бактерий. Бета-лактамы антибиотики являются субстратными аналогами и ковалентны серин-активному центру ПСБ. После модификации часть ПСБ снижает свое сродство к β-лактамам, что приводит к повышению МИК этих препаратов и заметно снижает клинический эффект [4].

У MRSA основной механизм связан с производством ПСБ типа PBP2a (кодируемым геном *mecA*), который обладает почти в тысячу раз меньшим аффинитетом к β -лактамам и поэтому способен противостоять антибиотикам. Недавно обнаружен альтернативный PBP2, кодируемый геном *mecC* (ранее известным как *mecALGA251*), который делает изоляты устойчивыми ко всем новым цефалоспорином. Ген *mecC* отсутствует у метициллин чувствительных *S. aureus*. Для штаммов с выраженной гетерогенной экспрессией генов- *mecA* и *mecC* характерны низкие значения МИК, что затрудняет определение чувствительности. Кроме того, некоторые из штаммов *S. aureus* с умеренной устойчивостью к оксациллину не производят ПСБ, у них отсутствуют гены *mecA* и *mecC*. Такие штаммы с пограничной чувствительностью (*borderline susceptible*) получили название BORSA. Эти штаммы встречаются относительно редко, механизм их резистентности слабо изучен, но может включать в себя гиперпродукцию β -лактамаз или изменение характеристик уже существующих ПСБ.

Возможность противостоять ванкомицину *S. aureus* GRSA приобрели экзогенно от энтерококков VRE. Устойчивость детерминирована геном *VanA*. Генетические детерминанты устойчивости фенотипа *VanA* локализуются на плазидах.

Устойчивость *S. aureus* GISA и hGISA имеет эндогенное происхождение. Она связана со сложными хромосомными мутациями, ведущими к гиперпродукции гликопептидов, утолщению клеточной стенки и, как следствие, изменению ее проницаемости. В связи с этим нарушается диффузия ванкомицина в бактериальную клетку. Поддержание фенотипа hGISA *in vitro* довольно трудоемко, так как он неустойчив в лабораторных условиях, но в естественной среде данный штамм чаще всего переходит в GISA.

Всего в г. Минске в 2015 г. выделено 6242 изолята *Staphylococcus aureus* от 5556 пациентов. Абсолютное большинство изолятов устойчиво к пенициллину — 91%. К оксациллину определена устойчивость в 46,7%, что говорит о высоком распространении MRSA в г. Минске (таблица 1). Для улучшения диагностики можно рекомендовать включить в перечень исследуемых антибактериальных препаратов цефокситин, т. к. данный препарат является более специфическим маркером детерминант устойчивости.

Таблица 1. — Определение устойчивости *Staphylococcus aureus* в отношении антибактериальных препаратов

Наименование антибиотика	Количество исследованных изолятов, абс.	Доля резистентных изолятов, %
Пенициллин	5990	91
Оксациллин	5945	46,7
Цефазолин	5528	46,1
Гентамицин	5153	10,4
Клиндамицин	3937	16,8
Эритромицин	3075	28,3

К цефалоспорином (цефазолин) отмечается высокий уровень резистентности — 46,1%. В отношении цефалоспоринов 3-го поколения протестировано незначительное количество штаммов, что связано с их невысоким применением в клинической практике при лечении стафилококковых инфекций.

К аминогликозидам (гентамицин) обнаружено 10,4% устойчивых изолятов.

В группу линкозамидов входит клиндамицин, который обладает узким спектром антимикробной активности. Используются при инфекциях, вызванных грамположительными кокками (преимущественно в качестве препаратов второго ряда) и неспорообразующей анаэробной флорой. У микрофлоры, особенно стафилококков, довольно быстро развивается резистентность к линкозамидам. В настоящее время к клиндамицину выявлено 16,8% устойчивых штаммов. Возможна перекрестная резистентность с макролидами. По отношению к эритромицину устойчиво 28,3% изолятов.

При анализе устойчивости *Staphylococcus aureus* в отношении гликопептидов были получены сведения о 54 (0,4%) изолятах, имеющих фенотип резистентности к тейкопланину. К ванкомицину

все штаммы проявили чувствительность (таблица 2). Это свидетельствует о необходимости дальнейшего исследования штаммов для выяснения особенностей их механизмов устойчивости.

Тетрациклины обладают бактериостатическим эффектом, который связан с нарушением синтеза белка в микробной клетке. Тетрациклины считаются АМП с широким спектром антимикробной активности, однако в процессе их многолетнего использования многие бактерии приобрели к ним резистентность. В связи с этим тестирование в отношении этой группы проводят в случаях невозможности назначения других препаратов. Из протестированных изолятов к тигециклину не обнаружено устойчивости, в отношении миноциклина выявлена 17,1% устойчивость, к доксициклину — 7,2% (таблица 3).

Таблица 2. — Выявление устойчивых изолятов *Staphylococcus aureus* в отношении гликопептидов

Наименование антибиотика	Количество исследованных изолятов, абс.	Доля резистентных изолятов, %
Ванкомицин	3755	0
Тейкопланин	1296	52 (0,4)

Таблица 3. — Выявление устойчивых изолятов *Staphylococcus aureus* в отношении тетрациклинов

Наименование антибиотика	Количество исследованных изолятов, абс.	Доля резистентных изолятов, %
Тигециклин	555	0
Миноциклин	123	17,1
Доксициклин	208	7,2

В результате исследования изолятов *Staphylococcus aureus* получены данные о 2779 штаммах с устойчивостью к оксациллину, изолированных от 2310 пациентов. Доля изолятов с устойчивостью среди всех выделенных в стационарах колебалась в пределах от 20,1 до 66,6%. Данные о распространенности в организациях здравоохранения г. Минска представлены в таблице 4.

Таблица 4. — Распределение оксациллин-устойчивых изолятов *Staphylococcus aureus* в стационарах

Организации здравоохранения, № п/п	Количество выделенных штаммов, абс.	Количество устойчивых штаммов, абс.	Доля устойчивых штаммов, %
1	330	204	61,8
2	432	264	61,1
3	547	320	58,5
4	393	79	20,1
5	632	313	49,5
6	1054	360	34,2
7	727	282	38,8
8	414	147	35,5
9	569	379	66,6
10	290	91	31,4
11	200	130	65,0
Суммарно другие	654	210	31,2

При оценке распределения мультирезистентных штаммов в различных отделениях здравоохранения в 2015 г. обнаружено, что MRSA наиболее распространен в отделениях акушерско-гинекологического профиля (25,3%). Довольно часто данные изоляты обнаруживаются и в хирургических отделениях — 20,8%, а также в отделениях гнойной хирургии, на долю которых приходится 14,5% (таблица 5).

Таблица 5. — Распределение оксациллин-устойчивых изолятов *Staphylococcus aureus* по отделениям организаций здравоохранения

Отделения стационаров	Число оксациллин-устойчивых штаммов	
	абс.	%
Акушерско-гинекологические отделения	702	25,3
Хирургические отделения	577	20,8
Гнойные отделения	404	14,5
Отделения реанимации и интенсивной терапии	303	10,9
Остеологические отделения	169	6,1
Другие отделения	624	22,5

Заключение. Всего в г. Минске в 2015 г. выделено 6242 изолята *Staphylococcus aureus*. К оксациллину установлена устойчивость в 46,7% случаев, что говорит о высоком распространении MRSA. По результатам изучения распространения оксациллин-устойчивых изолятов *Staphylococcus aureus* в различных стационарах установлено, что встречались они с частотой от 20,1 до 66,6%; наибольшее их количество выделено от пациентов отделений акушерско-гинекологического профиля — 25,3%.

При анализе устойчивости *Staphylococcus aureus* в отношении гликопептидов были получены сведения о 54 (0,4%) изолятах, имеющих фенотипы резистентности к тейкопланину.

Литература

1. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010 / D.M. Sievert [et al.] // *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* — 2013. — Vol. 34, № 1. — P. 1–14.
2. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) [Electronic resource] / European Centre for Disease Prevention and Control. — Stockholm: ECDC, 2012. — Mode of access: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2011.pdf>. — Date of access: 01.08.2016.
3. ECDC Antimicrobial Resistance and Healthcare-Associated Infections Programme. Antimicrobial resistance 2010: global attention on carbapenemase-producing bacteria [Electronic resource] // *Euro Surveill.* — 2010. — Vol. 15, № 46. — Mode of access: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19719>. — Date of access: 01.08.2016.
4. Механизмы резистентности микроорганизмов [Электронный ресурс] / С.В. Сидоренко // Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. — 2002. — Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/ab/001-07.shtml>. — Дата доступа: 01.08.2016.
5. CDC reminds clinical laboratories and healthcare infection preventionists of their role in the search and containment of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VISA) [Electronic resource]. — 2014. — Mode of access: http://www.cdc.gov/HAI/settings/lab/vrsa_lab_search_containment.html. — Date of access: 01.08.2016.
6. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe [Electronic resource] / J. Melo-Cristino [et al.] // *Lancet.* — 2013. — Vol. 382, № 9888. — P. 205. — Mode of access: <http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736%2813%2961219-2/fulltext>. — Date of access: 01.08.2016.

CHARACTERISTIC MULTIRESTANT ISOLATES *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ISOLATED IN HEALTH ORGANIZATION MINSK

*Tonko O.V.*¹, *Kolomiets N.D.*¹, *Hanenko O.N.*¹, *Kitsaeva O.F.*¹, *Levshina N.N.*²,
*Goylova A.V.*³, *Ilkevich N.G.*⁴

¹State Educational Institution “Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education”, Minsk, Republic of Belarus;

²State Institution “Minsk City Center of Hygiene & Epidemiology”, Minsk, Republic of Belarus;

³State Institution “Center of Hygiene & Epidemiology of the Frunze District of Minsk”, Minsk, Republic of Belarus;

⁴State Institution “Municipal Minsk Clinical Maternity Hospital № 2”, Minsk, Republic of Belarus

Staphylococcus aureus, including MRSA, is one of the most common causes of infection and disease. Strains of MRSA are resistant not only to methicillin but also to many other beta-lactams, including

cephalosporins. It was found high prevalence of MRSA in hospitals in Minsk in 2015. In assessing the sustainability of *S. aureus* in relation to glycopeptides it was found that all strains were susceptible to vancomycin.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, glycopeptides, resistance mechanisms.

Поступила 01.08.2016

ОСТРЫЕ РЕСПИРАТОРНЫЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ *MICOPLASMA PNEUMONIAE* И *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE*: ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Шмелева Н.П., Грибкова Н.В., Сивец Н.В.

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

Реферат. Представлен обзор современных подходов к диагностике острых респираторных заболеваний, обусловленных *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydomphila pneumoniae*. Дан анализ наиболее распространенных ошибок в интерпретации результатов диагностики.

Ключевые слова: микоплазменная и хламидийная инфекция, внебольничная пневмония, ПЦР- и ИФА-диагностика.

Введение. Заболевания респираторного тракта во всем мире являются наиболее частой причиной обращения за медицинской помощью. Около трети всех патологий дыхательной системы обусловлены инфекционными заболеваниями нижних дыхательных путей, частота которых составляет 44–50 случаев на 1 тыс. населения. В развитых странах внебольничная пневмония (ВП) по-прежнему занимает ведущее место в структуре заболеваемости и смертности от инфекционных болезней. По данным Европейского респираторного общества (ERS), смертность при пневмонии в среднем составляет 10%, тогда как у лиц старше 60 лет может достигать 20% [1]. В Республике Беларусь ежегодно регистрируется 100–150 тыс. случаев заболеваний ВП, из которых от 20 до 50% нуждается в длительном стационарном лечении.

В последние годы все чаще в качестве распространенных причин острого бронхита и внебольничной пневмонии рассматриваются «атипичные» патогены, прежде всего *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) и *Chlamydomphila pneumoniae* (*C. pneumoniae*). Несмотря на то, что эти микроорганизмы значительно отличаются по структуре, они имеют сходные эпидемиологические характеристики и клинические проявления. Пневмонии, обусловленные данными патогенами, обычно развиваются после инфекции верхних дыхательных путей, но могут возникать и первично.

Особенности репродукции *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* в организме человека (главным образом внутриклеточный цикл развития) объясняют неэффективность широко используемых в клинической практике антимикробных лекарственных средств пенициллинового и цефалоспоринового ряда, действующих преимущественно на внеклеточную форму возбудителей. В этой ситуации создаются условия для персистенции возбудителя, диссеминации его в организме, хронизации процесса, формирования осложнений. В этой связи для лечения респираторных заболеваний микоплазменной и хламидийной этиологии необходимо применение антимикробных лекарственных средств, способных проникать и накапливаться в пораженных клетках. Своевременная и адекватная диагностика способствует применению более эффективных методов лечения и повышению качества терапии.

Цель работы — анализ и обобщение данных о современных подходах к лабораторной диагностике острых респираторных заболеваний, обусловленных *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydomphila pneumoniae*.

Согласно данным зарубежных исследователей, доля микоплазменной инфекции среди заболеваний респираторного тракта варьирует в пределах от 4,9 до 67% [2–4]. Клинические проявления микоплазменной инфекции чрезвычайно разнообразны. *M. pneumoniae* была выявлена у пациентов с острыми респираторными заболеваниями (34%), бронхитом (4,4%), пневмонией (15–27%), бронхиальной астмой (7–23%) [2–6]. Заболевания микоплазменной этиологии встречаются во всех возрастных группах, однако наиболее часто возбудитель выявляется у детей старше 5 лет и лиц молодого возраста до 30 лет [4, 6, 7]. Заболеваемость, ассоциированная с *M. pneumoniae*, носит

эпидемический характер. Эпидемические подъемы заболеваемости наблюдаются каждые 4–5 лет в осеннее-зимний период. При пневмонии, вызванной *M. pneumoniae*, другие бактериальные или вирусные возбудители, как правило, не обнаруживаются. Однако в редких случаях возможна ассоциация с *S. pneumoniae*, *H. Influenza* и др [2, 7, 8]. Во время эпидемических подъемов заболеваемости частота микоплазменных пневмоний возрастает и может достигать 20% от общего числа ВП. Как правило, ВП микоплазменной этиологии отличается легким течением и не требует госпитализации. Однако у детей до 5 лет пневмония может протекать значительно тяжелее, с выраженной дыхательной недостаточностью и интоксикацией [7, 8].

Помимо *M. pneumoniae* важное место в этиологической структуре респираторной патологии занимает *C. pneumoniae*, вызывающая пневмонии различной степени тяжести, длительно протекающие бронхиты, фарингиты, синуситы [9, 10]. Инфекция, обусловленная *C. pneumoniae*, также может приобретать эпидемический характер. Описаны эпидемические вспышки в изолированных коллективах и внутрисемейные кластеры. Согласно данным литературы, от 5 до 15% внебольничных пневмоний ассоциированы *C. pneumoniae*, а в период эпидемического подъема заболеваемости эти показатели могут достигать 25% [10, 11]. В отличие от *M. pneumoniae* *C. pneumoniae* встречается чаще среди взрослых и особенно у лиц среднего и пожилого возраста [11]. Вместе с тем сезонной закономерности распространения *C. pneumoniae* не установлено. Для инфекции, обусловленной *C. pneumoniae*, характерна генерализация процесса, в ходе которого возбудитель может инфицировать эндотелиальные клетки сосудов, синовиальные клетки, гепатоциты и ткани нервной системы [11]. В случае присоединения вирусных или бактериальных возбудителей течение заболевания может осложниться, увеличивается риск летального исхода. Особенно тяжело микст-инфекции протекают у пожилых лиц при сочетании *C. pneumoniae* с пневмококком или при наличии других сопутствующих заболеваний [10, 11].

M. pneumoniae и *C. pneumoniae* являются внутриклеточными возбудителями и могут длительно персистировать в клетках эпителия, лимфоузлов, способствовать возникновению аллергии, обуславливать более тяжелое течение неспецифических заболеваний легких и являться причиной обострения хронической бронхолегочной патологии у взрослых [1, 4, 12,]. У переболевших часто отмечаются повторные инфекции дыхательных путей, протекающие с обструкцией, тенденцией к затяжному течению и рецидивированию [12, 13]. Это связано со снижением резистентности организма вследствие угнетения иммунитета. *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* на разных стадиях развития располагаются как внутриклеточно, так и внеклеточно, что требует для их элиминации участия гуморальных и клеточных механизмов иммунитета [2, 6]. Кроме того, применение антимикробных средств без иммунокорректирующей терапии часто приводит к временному подавлению возбудителей. На фоне такого лечения происходит сохранение иммунологических нарушений, что повышает риск рецидива заболеваний. Все это требует комплексного подхода к лечению пневмоний микоплазменной и хламидийной этиологии, включающей помимо антимикробных средств препараты, направленные на коррекцию иммунного ответа. Успех лечения определяется своевременным установлением этиологического фактора заболевания.

Можно выделить три основные группы лабораторных методов исследований, используемых для диагностики инфекций микоплазменной и хламидийной этиологии:

- микробиологический (культуральный);
- иммунологические методы (выявление антигенов возбудителя и специфических антител);
- методы амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР).

Самым специфичным и чувствительным методом лабораторной диагностики микоплазменной и хламидийной инфекции является микробиологическое исследование («золотой стандарт»). Однако *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* относятся к трудно культивируемым микроорганизмам: они растут медленно и требуют специальных питательных сред и клеточных культур [9, 14]. Ввиду этого весь процесс культивирования является длительным и трудоемким и занимает 3–5 недель [4, 10, 14]. Вследствие этого культуральный метод не может быть рекомендован для использования в рутинной практике и доступен только специализированным лабораториям. Данный метод может быть использован для выявления возбудителя при длительном или рецидивирующем течении заболевания, требующем количественного определения возбудителя и его чувствительности к антимикробным препаратам.

Среди иммунобиологических методов для выявления антигенов возбудителя в клиническом материале может быть использована реакция иммунофлуоресценции (РИФ) с помощью тест-систем на основе моноклональных антител. Однако РИФ также имеет свои существенные ограничения и недостатки. Прежде всего, возможно возникновение перекрестных реакций с другими видами микоплазм и хламидофил [4, 9]. Во-вторых, на результативность исследования влияет время забора образца, которое оптимально проводить в первые 7–10 дней от начала заболевания. Забор материала в более поздние сроки снижает вероятность выявления возбудителя, поскольку он может находиться в составе циркулирующих иммунных комплексов [4, 9].

Для выявления специфических антител к *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* могут быть использованы такие иммунологические методы, как реакция связывания комплемента, реакция непрямой иммунофлуоресценции, радиоиммунный анализ, иммуноферментный анализ (ИФА) и др. В настоящее время для серологической диагностики «атипичных» инфекций наиболее широко используется в повседневной практике метод ИФА. Серологические методы основаны на выявлении специфических антител, которые образуются в результате иммунного ответа организма на внедрение возбудителя инфекционного заболевания. Антитела относятся к трем классам иммуноглобулинов: М, G и А. Накопление антител каждого класса происходит через равные промежутки времени от начала инфекционного процесса и зависит от характера инфицирования. При первичном инфицировании вначале появляются антитела класса IgM, которые можно обнаружить, начиная с 7–10-го дня от начала появления симптомов заболевания [2, 9]. Затем со 2-й недели появляются IgG, в последнюю очередь — IgA. Поскольку после перенесенной инфекции не формируется стойкий иммунитет, возможно реинфицирование. В этом случае наблюдается быстрое нарастание титров антител классов IgG и IgA при отсутствии IgM [2, 9]. Таким образом, серодиагностика в первые дни от начала заболевания при первичном инфицировании может дать ложноотрицательный результат. Обнаружение антител только класса IgG, в свою очередь, также не может служить подтверждением наличия острого заболевания, т. к. это могут быть анамнестические антитела, свидетельствующее о перенесенном ранее заболевании. Сероконверсия, или четырехкратное и более нарастание титров антител при исследовании парных сывороток (первая из которых берется в наиболее ранние сроки от начала заболевания, а вторая — через 2–3 недели), подтверждает этиологическую природу заболевания, но уже носит ретроспективный характер [2, 9].

Наибольшее значение для лабораторной диагностики атипичных пневмоний в настоящее время приобретает полимеразная цепная реакция (ПЦР), а именно ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Принципиальным преимуществом данного метода является получение результатов в достаточно короткие сроки, упрощение анализа, а также снижение количества манипуляций с исследуемым образцом и, следовательно, снижение вероятности ошибок. ПЦР-РВ позволяет обнаружить ДНК *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* в течение первых 3-х недель от начала заболевания и даже после начала антибактериальной терапии [14–18]. Важным аспектом получения корректного результата является правильный забор материала для исследования методом ПЦР. Так, в случае патологии верхних дыхательных путей в качестве материала для исследования следует использовать носоглоточный мазок, в то время как при поражении нижних дыхательных путей предпочтительным является исследование мокроты или аспириатов из трахеи [15, 16, 19]. Использование ПЦР позволяет осуществить быструю диагностику, что является полезным в плане выбора соответствующей антимикробной химиотерапии.

Таким образом, основными методами выявления «атипичных» патогенов в настоящее время являются ПЦР-РВ и ИФА. В этой связи представляет определенный интерес сравнительное изучение результатов выявления данных возбудителей с помощью этих двух методов. Как свидетельствуют данные литературы, зачастую отсутствуют совпадения результатов серологической и молекулярно-генетической диагностики [16, 20]. В ряде случаев наблюдается наличие антител к обоим возбудителям, в то время как одновременное выявление ДНК *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* встречается крайне редко [3, 15, 20]. Данный феномен может быть результатом поликлональной стимуляции гуморального иммунитета, когда в ответ на внедрение одного возбудителя наблюдается нарастание антител к антигенам других патогенов [3]. Корреляции результатов ПЦР-РВ и ИФА может отсутствовать в случае диагностики в начале заболевания, когда антитела еще не обнаруживаются, в то время как ДНК возбудителя уже может быть выявлена. Сочетание положительного результата ПЦР с отри-

цательным серологическим также может наблюдаться при бессимптомной персистенции возбудителя в клетках эпителия верхних дыхательных путей. Подобные противоречия могут быть разрешены при исследовании парных сывороток. Сероконверсия в таких случаях подтвердит этиологию заболевания, а ее отсутствие будет свидетельствовать о бессимптомной персистенции микроорганизма.

Заключение. Таким образом, выбор метода диагностики патологий, ассоциированных с *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae*, прежде всего, обусловлен продолжительностью заболевания на момент обращения пациента за медицинской помощью и целью исследования. С первых дней от начала заболевания следует проводить ПЦР-диагностику, начиная с 7-го дня возможно проведение серодиагностики. Для повышения ее достоверности рекомендовано исследовать парные сыворотки.

При ВП для быстрой и достоверной диагностики можно рекомендовать одновременное проведение ПЦР-диагностики и определение антител класса IgM. Комплексный подход позволит более точно определить ведущий этиологический агент в случае одновременного выявления антител к *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae*.

Что касается микробиологического метода исследования, то он может быть использован для выявления возбудителя при длительном или рецидивирующем течении заболевания, требующем количественного определения возбудителя и его чувствительности к антимикробным препаратам.

Адекватная диагностика респираторных заболеваний микоплазменной и хламидийной этиологии направлена на решение насущной проблемы — профилактики антимикробной резистентности, поскольку своевременная расшифровка этиологии заболевания позволяет избежать необоснованного назначения ряда антимикробных препаратов и своевременно провести коррекцию антимикробной терапии.

Литература

1. Парсонз, П.Э. Секреты пульмонологии / П.Э. Парсонз, Д.Э. Хеффнер; пер. с англ. А.И. Синопальников и др.; под общ. ред. О.Ф. Колодкиной. — М., 2004. — 648 с.
2. Синопальников, А.И. Атипичная пневмония / А.И. Синопальников // Рус. мед. журн. — 2002. — Т. 10, № 23. — С. 1080–1085.
3. Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in children with community-acquired lower respiratory tract infections / N. Principi [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 32, № 9. — P. 1281–1295.
4. Waites, K.B. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen / K.B. Waites, D.H.F. Talkington // Clin. Microbiol. Rev. — 2004. — Vol. 17, № 4. — P. 697–728.
5. Waites, K.B. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens / K.B. Waites, B. Katz, R.L. Shelonka // Clin. Microbiol. Rev. — 2005. — Vol. 18, № 4. — P. 757–789.
6. Blasi, F. Atypical pathogens and respiratory tract infections / F. Blasi // Eur. Respir. J. — 2004. — Vol. 24, № 1. — P. 171–181.
7. Особенности внебольничной пневмонии, вызванной *Mycoplasma pneumoniae*: обзор литературы и результаты собственных исследований / С.А. Рачина [и др.] // Клинич. микробиология и антимикроб. химиотерапия. — 2013. — Т. 15, № 1. — С. 4–13.
8. Youn, Y.-S. *Mycoplasma pneumoniae* in children / Y.-S. Youn, K.-Y. Lee // Korean J. Pediatr. — 2012. — Vol. 55, № 2. — P. 42–47.
9. Kumar, S. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods / S. Kumar, M.R. Hammerschlag // Clin. Infect. Dis. — 2007. — Vol. 44, № 4. — P. 568–576.
10. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) / C. Kuo [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. — 1995. — Vol. 8, № 4. — P. 451–461.
11. Hahn, D.L. *Chlamydia pneumoniae* as a respiratory pathogen / D.L. Hahn [et al.] // Front. Biosci. — 2002. — Vol. 7. — P. 66–76.
12. Severe asthma exacerbation: role of acute *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infection / R. Cosentini [et al.] // Respir. Res. — 2008. — Vol. 9. — doi: 10.1186/1465-9921-9-48.
13. *Mycoplasma pneumoniae* infection and asthma: A clinical study / S. Gao [et al.] // Pak. J. Med. Sci. — 2015. — Vol. 31, № 3. — P. 548–551.
14. Бочкарев, Е.Г. Лабораторная диагностика хламидийной инфекции / Е.Г. Бочкарев // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. — 2000. — № 4. — С. 65–72.
15. Molecular methods for the detection of mycoplasma and ureaplasma infections in humans / K.B. Waites [et al.] // J. Mol. Diagn. — 2012. — Vol. 14, № 5. — P. 437–450.
16. *Mycoplasma pneumoniae* infection in primary care investigated by real-time PCR in England and Wales / V.J. Chalker [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 30, № 7. — P. 915–921.

17. Development and evolution of real-time PCR-based fluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* / M.L. Tondella [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol. 40, № 2. — P. 575–583.

18. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumoniae* in community-acquired pneumonia / N. Miyashita [et al.] // Respir. Med. — 2004. — Vol. 98, № 6. — P. 542–550.

19. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada) / S.F. Dowwel [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 33, № 4. — P. 492–503.

20. Микоплазменная инфекция: клинические формы, особенности течения и ошибки диагностики / М.С. Савенкова [и др.] // Вопр. современной педиатрии. — 2013. — № 12. — С. 108–114.

ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS DUE TO *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* AND *CHLAMYDIA PNEUMONIAE*: REVIEW OF OPPORTUNITIES OF MODERN LABORATORY DIAGNOSTIC

Shmialiova N.P., Gribkova N.V., Sivets N.V.

*State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus*

It is review of current opportunities of diagnosis of acute respiratory diseases, caused by *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*. The most common mistakes in the interpretation of diagnostic results have been analyzed.

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, PCR, immunoassay, community-acquired pneumonia.

Поступила 05.09.2016

АССОЦИАЦИЯ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ *HELICOBACTER PYLORI* С АКТИВНОСТЬЮ ВОСПАЛЕНИЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА

Янович О.О.¹, Титов Л.П.¹, Дорошко М.В.², Гузов С.А.²

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

²Медицинский центр «Нордин», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Изучено влияние генотипов *Helicobacter pylori* на морфологические изменения слизистой оболочки желудка у пациентов с хеликобактериозом. Полученные данные указывают на наличие связи генотипов *H. pylori* с морфологическими изменениями в слизистой оболочке желудка. Выявлено влияние аллеля *s1a vacA* и гена *cagT* на выраженность и активность воспалительного процесса.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, морфологические изменения слизистой оболочки желудка.

Введение. *Helicobacter pylori* является одной из наиболее широко распространенных на земном шаре хронических инфекций человека. Согласно некоторым оценкам, до 50% населения во всем мире инфицированы этим микроорганизмом. У большинства инфицированных хеликобактером лиц заболевание протекает в легкой форме, бессимптомно. Хронический хеликобактериоз развивается у чувствительных к инфекции индивидуумов и клинически проявляется разными формами — от поверхностного гастрита до злокачественных новообразований желудка [1].

Слизистая оболочка желудка является основным биотопом обитания хеликобактер. Благодаря своему строению и продукции специфичных ферментов и токсинов, *H. pylori* способна преодолевать защитные барьеры желудка, прикрепляться к клеткам желудочного эпителия, колонизировать его слизистую оболочку, повреждать ее и вызывать развитие хронического воспалительного процесса. В настоящее время выявлено несколько факторов патогенности *H. pylori*. Наиболее важными являются остров патогенности *cag-PAI* и вакуолизирующий ген (*vacA*). *Cag-PAI* — это геномный регион *H. pylori* примерно 40 т.п.о., содержащий 31 ген, ген *vacA* кодирует белок-предшественник, созревающий в токсин, вакуолизирующий клетки желудка [2].

Колонизация *H. pylori* практически всегда приводит к массивной инфильтрации слизистой оболочки желудка полиморфноядерными и мононуклеарными клетками [3]. Для оценки изменений проводится морфологическое исследование биоптатов, полученных при гастродуоденоскопии, что во многих случаях имеет решающее значение в окончательной верификации диагноза.

Выраженность воспаления гистологически оценивают по количеству «воспалительных» клеток (мононуклеаров), инфильтрирующих слизистую оболочку желудка (лимфоцитов, плазматических клеток, эозинофилов и др.). Активность воспаления слизистой оболочки желудка определяется по степени нейтрофильной инфильтрации собственной пластинки и межэпителиальных пространств слизистой [4].

Цель работы — изучение влияния генотипов *HP* на морфологические изменения слизистой оболочки желудка у пациентов с хеликобактериозом.

Материалы и методы. Были обследованы 138 пациентов, обратившихся в диагностический центр «Нордин» г. Минска с целью эндоскопического исследования желудочно-кишечного тракта и не проходивших ранее лечения. Средний возраст составил $40,7 \pm 0,7$ года; 84 женщины и 54 мужчины. Материалом для исследования служили биоптаты из антрального отдела желудка, полученные при ФЭГДС.

Для идентификации *H. pylori* применяли гистологическое исследование и постановку ПЦР в режиме реального времени в биоптате. Для гистологического исследования брали биоптат из антрального отдела желудка, фиксировали в 10% растворе формалина. Выявление *HP* проводили окрашиванием препаратов по Гимзе.

Экстракцию ДНК *HP* из биопсийного материала проводили с использованием набора «ДНК-сорбС» (Амплиценс, РФ) в соответствии с инструкцией производителя. Выявление *HP* (мишень ген 23S рРНК) осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени на приборе Rotor Gene 3000.

Для определения генов острова патогенности *cag*-РАI и аллельных форм гена *vacA* использовали метод ПЦР.

Статистический анализ данных был выполнен с использованием программы Statistica 8.0. Для установления статистической достоверности различий между группами использовали таблицы сопряженности с использованием критерия Хи-квадрат. Критерием достоверности считалось достижение уровня значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Были исследованы две аллельные формы сигнальной последовательности гена *vacA* *H. pylori* (s1a и s2b) и трех генов острова патогенности *cag*-РАI. На рисунке 1 представлена частота выявления указанных генов факторов патогенности *HP* в биопсийном материале у пациентов с хеликобактериозом.

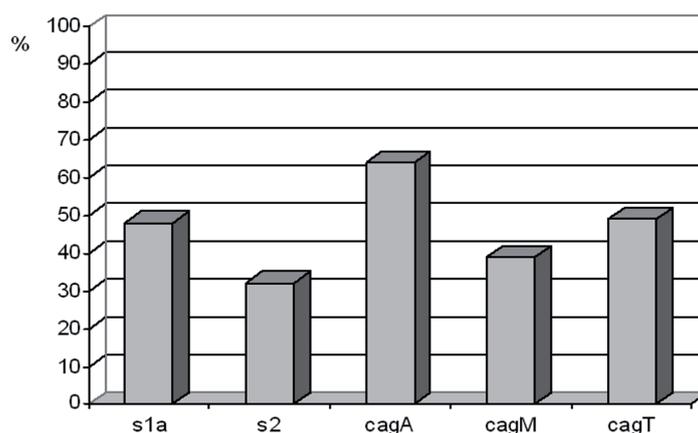


Рисунок 1. — Частота встречаемости генов факторов патогенности *HP* у пациентов с хеликобактериозом

В изученной группе аллель s1a выявлялась чаще, чем аллель s2 (48,7 и 32% соответственно). Среди генов острова патогенности наибольшая частота отмечена для гена *cagA* — 64,4%.

Из обследованных 137 пациентов у 104 человек был поставлен диагноз «поверхностный гастрит» (ПГ), у 12 — «атрофический гастрит» (АГ), у 11 — «эрозивный гастрит» (ЭГ), у 10 — «язва двенадцатиперстной кишки» (ЯДПК). На рисунке 2 представлена частота встречаемости аллеля *s1a* и генов *cag*-PAI в зависимости от диагноза.

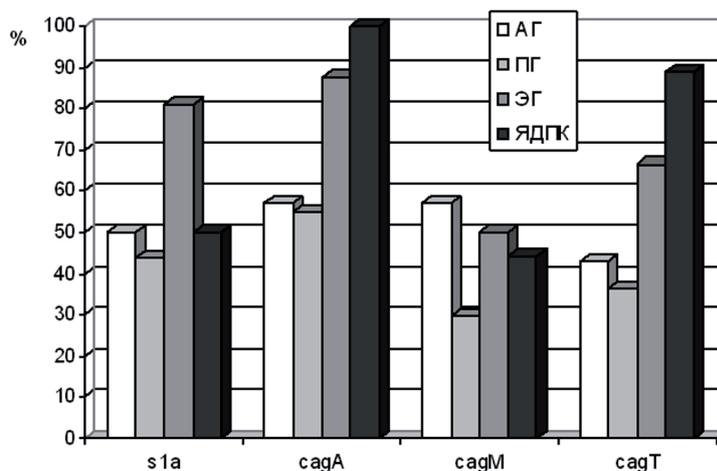


Рисунок 2. — Ассоциация генов патогенности *HP* с формой патологических изменений в слизистой оболочке желудка

Наибольшая частота аллели *s1a* наблюдалась у пациентов с эрозивным гастритом по сравнению с другими группами (81,8%).

В нашем исследовании ген *cagA* встречался с высокой частотой у пациентов с ЭГ (87,5%) и с ЯДПК (100 %) ($p < 0,05$). При этом наблюдалась достоверное увеличение частоты встречаемости гена *cagT* у пациентов с ЯДПК по сравнению с ПГ (88,9 против 36,2%, $p < 0,05$).

В зависимости от степени распространенности измененных клеток поверхностного эпителия, а также от глубины проникновения воспалительной инфильтрации в толщину слизистой оболочки были выделены следующие группы пациентов: без патологии (0), слабо выраженные процессы — 1, умеренно — 2, сильно выраженные и активные процессы — 3. Для выявления связи генотипов *HP* с морфологическими изменениями в слизистой оболочке желудка все пациенты дополнительно были разделены на две группы: 1-я включала пациентов со слабо выраженным и слабо активным воспалительным процессом в слизистой оболочке желудка (0–1), 2-я — со значительными изменениями в слизистой оболочке желудка — умеренно выраженный, сильно выраженный, умеренно активный и сильно активный процессы (2–3).

Таблица — Частота встречаемости генов *HP* в зависимости от морфологических изменений в слизистой оболочке желудка

Факторы патогенности	Степень выраженности воспалительного процесса		Степень активности воспалительного процесса	
	0–1 (%)	2–3 (%)	0–1 (%)	2–3 (%)
<i>s1a</i> +	22,2	54,5*	32,8	64,2*
<i>cagM</i> +	14	40	25	48,7
<i>cagA</i> +	50	65,6	57,1	70,3
<i>cagT</i> +	26,7	50	35,6	57,9*

Примечание — * — достоверно при сравнении с группой 0–1, $p < 0,05$.

Выявлено, что наличие аллеля *s1a* гена *vacA* связано с увеличением числа пациентов с высокой выраженностью воспалительного процесса в желудке ($p < 0,05$, ОШ = 4,2). Отмечено, что наличие аллеля *s1a* гена *vacA* также повышает риск усиления активности воспалительного процесса в желудке — отношение шансов равно 2,5 ($p < 0,05$).

Выявление гена *cagT* в образцах биопсийного материала у пациентов с хеликобактериозом ассоциировано с достоверным усилением активности воспалительного процесса ($p < 0,05$, ОШ = 3).

Инфекция *H. pylori* имеет глобальное значение и широко распространена, в т. ч. и в нашей стране. У большинства инфицированных *HP* вызывает воспалительные изменения в слизистой оболочке желудка.

Одним из наиболее важных факторов вирулентности *HP* является ген *cagA*, который присутствует в 60–70% европейских штаммах и более чем в 90% штаммах из Азии [5, 6].

CagA-белок в эпителиальных клетках связывается с Src-гомологичным доменом, содержащим тирозин фосфатазу (SHP-2), с формированием сигнального комплекса, вызывающего перестройку кортикального актина и компонентов мембраны, что стимулирует деление и пролиферацию эпителиальных клеток желудка [7]. Часть тирозин-фосфорилированной-*cagA* связывается с карбоксилированной Src-киназой (Csk). Образовавшийся комплекс *cagA*-Csk инактивирует Src-киназу, вызывая снижение *cagA*-тирозинфосфорилирования и формирование *cagA*-SHP2 [8].

Показано, что действие *cagA* приводит к нарушению катенин-бета активации, что вызывает увеличение подвижности клеток и онкогенную трансформацию [9, 10]. Также в некоторых работах отмечено, что *cagA* вовлечен в индукцию желудочного цитокина ИЛ-8, являющегося сильным активатором нейтрофилов [11].

Большинство исследователей считают, что *cagA*-ген связан с возникновением язвы ДПК [12, 13] и рака желудка [14]. В нашем исследовании частота встречаемости *cagA* была высокой у пациентов с эрозивным гастритом и язвой ДПК (87,5 и 100%).

В патогенезе заболеваний, вызванных *HP*, важное значение имеют другие гены острова патогенности. *CagT* принимает участие в активации NF- κ B и продукции ИЛ-8 [15], играя важную роль в течении воспалительного процесса. Он также взаимодействует с *cagA* и облегчает его перенос в клетки хозяина, действуя как шаперон-подобный белок, расположенный на внутренней мембране [16].

По данным литературы, штаммы с отсутствием *cagT* выявлялись чаще у пациентов с хроническим гастритом, чем с язвой желудка или раком [17]. Исследования показали, что наличие гена *cagT* связано с развитием язвы ДПК, подтверждая высокую вирулентность гена [18, 19]. В нашем исследовании ген *cagT* также связан с развитием язвы двенадцатиперстной кишки.

Вакуолизирующий цитотоксинассоциированный ген (*vacA*) присутствует в геноме всех штаммов *H. pylori*. Наиболее известный эффект *VacA* на клетки млекопитающих — это их вакуолизация [20]. *VacA* образует поры в эпителиальных клеточных мембранах, вызывая выход мочевины и анионов из клеток хозяина, что увеличивает межклеточную проницаемость и приводит к выделению питательных веществ и катионов. *VacA* может проходить в цитозоль, накапливаться во внутренней мембране митохондрий, активировать митохондриальные каналы, вызывая апоптоз [21].

Несмотря на то, что все штаммы имеют *vacA* ген, они сильно различаются по степени активности вакуолизации. Это происходит из-за гетерогенности гена *vacA* в сигнальной (s) и срединной (m) областях. На основании полученных данных предполагается, что клиническое развитие инфекции, вызванное *HP*, зависит от *vacA* генотипа. По литературным данным, субтип s1 ассоциирован с интенсивностью инфильтрации слизистой оболочки желудка нейтрофилами и лимфоцитами по сравнению с s2, что связывают с высокой продукцией цитотоксина [22, 23].

Настоящее исследование показало, что все пациенты с хеликобактериозом имеют лимфоцитарный и нейтрофильный инфильтрат в антральном отделе желудка. При этом незначительный воспалительный процесс отмечался у 19,5% обследованных, умеренно и сильно выраженный воспалительный процесс выявлен у 80,5% пациентов.

Установлено, что наличие аллеля s1a *vacA* не только связано с наличием, но и со степенью повреждений слизистой оболочки желудка (увеличение выраженности и активности воспалительного процесса). Это указывает, что данная аллель играет важную роль в развитии поражений, и такое повреждение может быть причиной первичного эффекта цитотоксина.

В отношении генов острова патогенности *cag* необходимо отметить достоверную связь гена *cagT* с активностью воспалительного процесса, что может быть связано с влиянием данного гена на продукцию ИЛ-8.

Полученные нами данные показывают наличие связи генотипа *HP* с морфологическими изменениями в слизистой оболочке желудка. Однако необходимо учитывать, что в данном исследова-

нии использованы только несколько генов факторов патогенности. В дальнейшем мы предполагаем включение в исследование других генов, что возможно даст новые данные о взаимосвязи генотипов *HP* и морфологических изменений в слизистой оболочке желудка с клиническими проявлениями инфекции.

Литература

1. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications / K.L. Goh [et al.] // *Helicobacter*. — 2011. — Vol. 16, suppl. 1. — P. 1–9.
2. Kusters, J.G. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection / J.G. Kusters, A.H. van Vliet, E.J. Kuipers // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2006. — Vol. 19, № 3. — P. 449–490.
3. Конорев, М.Р. Современные представления о *Helicobacter pylori* / М.Р. Конорев, А.М. Литвяков, Л.П. Титов // *Мед. новости*. — 1998. — № 7. — С. 15–20.
4. Гастроэнтерология. Национальное руководство / Под ред. В.Т. Ивашкина, Т.Л. Лапиной. — М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2008. — 700 с.
5. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients / C. Chomvarin [et al.] // *Int. J. Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 12, № 1. — P. 30–36.
6. A novel method for genotyping the *Helicobacter pylori vacA* intermediate region directly in gastric biopsy specimens / R.M. Ferreira [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2012. — Vol. 50, № 12. — P. 3983–3989.
7. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori CagA* protein in vitro and in vivo / M. Selbach [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277, № 9. — P. 6775–6778.
8. Attenuation of *Helicobacter pylori cagA* x SHP-2 signaling by interaction between *cagA* and C-terminal Src kinase / R. Tsutsumi [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278, № 6. — P. 3664–3670.
9. *Helicobacter pylori CagA* interacts with E-cadherin and deregulates the b-catenin signal that promotes intestinal trans differentiation in gastric epithelial cells / N. Murata-Kamiya [et al.] // *Oncogene*. — 2007. — Vol. 26, № 32. — P. 4617–4626.
10. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors / A.T. Franco [et al.] // *Cancer Res.* — 2008. — Vol. 68, № 2. — P. 379–387.
11. *Helicobacter pylori cagA* promoter region sequences influence *CagA* expression and interleukin 8 secretion / R.M. Ferreira [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2016. — Vol. 213, № 4. — P. 669–673.
12. Clinical relevance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* gene polymorphisms / D. Basso [et al.] // *Gastroenterology*. — 2008. — Vol. 135, № 1. — P. 91–99.
13. Genotyping *CagA*, *VacA* subtype, *IceA1*, and *BabA* of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases / S.Y. Kim [et al.] // *J. Korean. Med. Sci.* — 2001. — Vol. 16, № 5. — P. 579–584.
14. Association of *Helicobacter pylori cagA* gene with gastric cancer and peptic ulcer in Saudi patients / T. Saber [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* — 2015. — Vol. 25, № 7. — P. 1146–1153.
15. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island: essential genes for *cagA* translocation in host cells and induction of interleukin-8 / W. Fischer [et al.] // *Mol. Microbiol.* — 2001. — Vol. 42, № 5. — P. 1337–1348.
16. *Helicobacter pylori* chaperone-like protein CagT plays an essential role in the translocation of *CagA* into host cells / H. Ding [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* — 2012. — Vol. 22, № 10. — P. 1343–1349.
17. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England / F. Kauser [et al.] // *BMC Microbiol.* — 2005. — Vol. 5. — P. 32.
18. *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil / R. Mattar [et al.] // *J. Med. Microbiol.* — 2007. — Vol. 56, pt. 1. — P. 9–14.
19. Involvement of the *Helicobacter pylori* plasticity region and *cag* pathogenicity island genes in the development of gastroduodenal diseases / A.R. Pacheco [et al.] // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 27, № 11. — P. 1053–1059.
20. Roesler, B.M. Virulence factors of *Helicobacter pylori*: A review / B.M. Roesler, E.M. Rabelo-Gonçalves, J.M. Zeitune // *Clin. Med. Insights. Gastroenterol.* — 2014. — Vol. 27, № 7. — P. 9–17.
21. Amieva, M.R. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection / M.R. Amieva, E.M. El-Omar // *Gastroenterology*. — 2008. — Vol. 134, № 1. — P. 306–323.
22. Vacuolating cytotoxin genotypes are strong markers of gastric cancer and duodenal ulcer-associated *Helicobacter pylori* strains: a matched case-control study / A.A. Memon [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2014. — Vol. 52, № 8. — P. 2984–2989.
23. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration / J.C. Atherton [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 1995. — Vol. 270, № 30. — P. 17771–17777.

**ASSOCIATION OF *HELICOBACTER PYLORI* PATHOGENICITY FACTORS
WITH ACTIVE INFLAMMATION AND MORPHOLOGICAL CHANGES
OF GASTRIC MUCOSA**

Yanovich O.O.¹, Titov L.P.¹, Doroshko M.V.², Guzov S.A.²

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

²Medical Center "Nordin", Minsk, Republic of Belarus

The aim of the work was to study the effect of *Helicobacter pylori* genotypes on the morphological changes of gastric mucosa in patients with *Helicobacter pylori* infection. The findings indicate the presence of *H. pylori* genotypes due to morphological changes in the gastric mucosa. It has been revealed the effect of the s1a vacA allele and cagT gene on the expression and activity of the inflammatory process.

Keywords: *Helicobacter pylori*, morphological changes of the gastric mucosa.

Поступила 15.09.2016

МЕТОДЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА РИСКА ИХ ВИРУСНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Амвросьева Т.В., Казинец О.Н., Поклонская Н.В., Лозюк С.К.

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

Реферат. В статье описаны методы пробоподготовки различных групп пищевых продуктов (ПП), основанные на использовании эффективных технологий сорбции вирусов-контаминантов с помощью отечественного волокнистого материала марки Фибан с последующим их концентрированием и индикацией с помощью ПЦР. Создана и использована экспериментальная модель вирусной контаминации ПП на основе применения псевдовиральных частиц, сконструированных с помощью технологии армированных нуклеиновых кислот, содержащих фрагмент энтеро- и норовирусов.

Ключевые слова: контаминация вирусами пищевых продуктов, кишечный вирус, концентрирование, санитарно-вирусологический контроль.

Введение. Контаминация пищевых продуктов патогенными для человека вирусными агентами продолжает оставаться одной из самых актуальных проблем здравоохранения и профилактической медицины практически всех стран мира. Она приобретает сегодня все большую значимость вследствие усиливающихся торговых и культурных связей между государствами и континентами, а также глобализации и интернационализации производственных процессов.

Попадая в организм человека алиментарным путем, болезнетворные вирусные патогены могут вызывать развитие широкого спектра инфекционных заболеваний. Общеизвестно, что возникновение и распространение таких социально-значимых заболеваний, как вирусные гепатиты А и Е, норо-, рота-, адено-, энтеровирусные инфекции могут быть связаны с пищевым фактором [1–3]. На практике пищевые вирусные инфекции чаще регистрируются как гастроэнтериты или острые кишечные инфекции неустановленной этиологии. Особую обеспокоенность вызывает ассоциируемая с пищевыми факторами вспышечная заболеваемость, которая, по данным ВОЗ, в течение последних 10 лет сохраняет устойчивую тенденцию к росту [4, 5]. В этих условиях санитарно-вирусологический контроль ПП является обязательной составляющей государственного санитарного надзора за предприятиями пищевой промышленности, торговыми объектами общественного питания, объектами по реализации продовольственного сырья и пищевых продуктов в целях оценки риска и профилактики пищевых вирусных инфекций.

Следует отметить, что сегодня проблема контроля безопасности в отношении вирусных патогенов является мало изученной и слабо разработанной, в т. ч. методологически. Имеющиеся в мировой литературе на эту тему данные ограничены и разрознены [5–7]. В нашей стране, несмотря на определенные достижения в области пищевой вирусологии, адекватный метод определения вирусологической безопасности ПП для здоровья потребителей отсутствует, что остается актуальной проблемой при осуществлении эпиднадзора за инфекциями пищевого происхождения.

Цель работы — оптимизация и экспериментальные испытания методов пробоподготовки для различных групп ПП на основе использования высокоэффективных технологий и средств сорбции-элюции-концентрирования с последующей индикацией вирусного материала методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Материалы и методы. При создании экспериментальной модели вирусной контаминации ПП использовали овощи (помидоры, огурцы, капусту белокачанную), замороженные ягоды (бруснику), зелень (салат листовой, зеленый лук), молочные продукты (молоко, творог), рыбу, мясо. В качестве контаминирующего материала применяли псевдовиральные частицы (ПВЧ), созданные на основе армированных нуклеиновых кислот, содержащих фрагмент энтеровирусов (ЭВ) и норовирусов (НВ) (производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Титр ПВЧ составлял 10^5 геномных эквивалентов на 1 мл (ГЭ/мл). Пробоподготовку ПП осуществляли с использованием методов экстракции и концентрирования ПВЧ. Экстракцию проводили 0,01 н глициновым буферным раствором (ГБ) или фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ). Для концентрирования ПВЧ в полученных

экстрактах применяли метод сорбции-элюции в малом объеме. В качестве сорбирующего материала использовали волокнистый материал марки ФИБАН А6 (производства ИФОХ НАН Беларуси). Концентрирование адсорбированных ПВЧ проводили с использованием элюирующего буферного раствора на основе 3% бифэкстракта. Выделение РНК ПВЧ из проб проводили с помощью набора «Рибопреп» производства «Амплисенс» (РФ). Индикацию РНК ПВЧ проводили методом ОТ-ПЦР. Постановку реакции обратной транскрипции осуществляли с использованием набора «РЕВЕРТА», производства «Амплисенс» (РФ). Амплификацию полученной в реакции обратной транскрипции кДНК проводили с использованием тест-системы для выявления норовирусов II генотипа методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции «НоВ II-ПЦР» и для выявления энтеровирусов методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции «ЭВ-ПЦР» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (РБ).

Результаты и их обсуждение. К кишечным вирусам (КВ), наиболее часто контаминирующим ПП, относятся рота-, норо-, адено-, энтеровирусы, вирусы гепатита А и Е [5]. Эти вирусные патогены очень устойчивы и хорошо выживают в окружающей среде — от нескольких недель до нескольких месяцев. Они относятся к различным семействам, но обладают рядом общих свойств: устойчивы к дезинфицирующим средствам, ультрафиолетовому облучению, антибиотикам, химиопрепаратам, хорошо переносят низкую температуру, замораживание [4, 5]. Большинство вирусов высоко контагиозны, имеют низкую инфицирующую дозу от 10 до 100 инфекционных частиц, а иногда бывает достаточно и одной вирусной частицы для возникновения заболеваемости. Учитывая вышесказанное, разработка чувствительных и специфичных методов детекции КВ является одной из главных составляющих при создании методов управления рисками здоровью, связанными с вирусной контаминацией ПП.

Как известно, наиболее трудно решаемыми в области пищевой вирусологии являются вопросы, связанные с экстракцией и концентрированием вирусных агентов из разных видов ПП, имеющих различное качество и консистенцию. Одним из перспективных направлений в их решении является разработка соответствующих технологий, позволяющих получить эффективно экстрагированные из пищи вирусы-контаминанты в сконцентрированном виде [6, 7].

При отработке методов пробоподготовки ПП с целью последующего выявления в них вирусной контаминации методом ПЦР нами были оптимизированы и применены современные способы экстракции и концентрирования вирусов.

Общая схема исследования ПП представлена на рисунке.



Рисунок — Общая схема исследования ПП для санитарно-вирусологического контроля

Для оценки предлагаемых методов экстракции и концентрирования вирусов из ПП была разработана экспериментальная модель контаминации ПП на основе использования ПВЧ, созданных на основе технологии армированных нуклеиновых кислот, содержащих фрагмент энтеро- и норовирусов. Для моделирования вирусной контаминации использовали ПП, которые наиболее часто подвергаются вирусной контаминации. Они включали овощи, зелень, молочные продукты, рыбу, мясо.

Первоначально исследуемый продукт в количестве 25 г помещали во флакон объемом 50 мл и контаминировали его раствором ПВЧ. Затем проводили стадию экстракции с использованием 0,01 н ГБ или 0,01н ФСБ. Эффективность экстракции оценивали по выявлению ПВЧ в полученных экстрактах методом ПЦР.

Последующее концентрирование ПВЧ проводили с использованием метода сорбции/элюции. Для этого экстракт пропускали через колонку объемом 20 мл, в которую помещали сорбирующий материал [8]. После предполагаемой сорбции ПВЧ проводили их элюцию в течение 30 мин. Затем элюат исследовали на наличие ПВЧ методом ПЦР. Экстракты ПП, полученные с использованием ГБ, подвергали концентрированию двумя способами. Первый способ включал стадию подкисления экстракта до pH = 7,0 перед проведением сорбции/элюции, второй способ исключал стадию подкисления пробы. Полученные результаты показали, что без стадии подкисления экстракта элюция сорбируемых ПВЧ практически не осуществлялась. В то же время применение первого способа концентрирования вирусного материала показало значительную эффективность (таблица).

Таблица — Результаты экстракции и концентрирования при экспериментальной контаминации пищевых продуктов ПВЧ в дозе 10^5 ГЭ/мл

Наименование продукта	Экстракция, %		Элюция, %
	ГБ раствор	ФСБ раствор	
Брусника замороженная	100	100	100
Капуста белокачанная	100	100	100
Помидоры	85	90	100
Огурцы	100	100	100
Лук зеленый	60	50	100
Салат листовой	50	60	100
Рыба	100	100	100
Мясо	100	100	100
Творог	65	70	100
Молоко	70	70	100

Показано, что экстракция была эффективной в отношении всех групп ПП при использовании в качестве экстрагирующих буферных растворов как ФСБ, так и ГБ. Последующая элюция ПВЧ с сорбирующего материала с учетом вышеуказанных условий составляла 100%.

Заключение. Создана экспериментальная модель вирусной контаминации ПП с использованием ПВЧ, сконструированных на основе армированных нуклеиновых кислот, содержащих фрагмент энтеро- и норовирусов, которая была применена для апробации технологии пробоподготовки в лабораторных условиях.

В процессе выполненных экспериментов подобраны необходимые растворы и материалы, отработаны оптимальные параметры и условия, позволяющие сконцентрировать ПВЧ из экстрактов контаминированных ПП со 100 % эффективностью.

Литература

1. Koopmans, M. Foodborne viruses: an emerging problem / M. Koopmans, E. Duizer // *Int. J. Food Microbiol.* — 2004. — Vol. 90, № 1. — P. 23–41.
2. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom / M. Formiga-Cruz [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2002. — Vol. 68, № 12. — P. 5990–5998.
3. Bidawid, S. Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries / S. Bidawid, J.M. Farber, S.A. Sattar // *J. Virol. Meth.* — 2000. — Vol. 88, № 2. — P. 175–185.
4. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000 / B.A. Lopman [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* — 2003. — Vol. 9, № 1. — P. 1995–2000.
5. Appleton, H. Control of food-borne viruses / H. Appleton // *Br. Med. Bull.* — 2000. — Vol. 56, № 1. — P. 172–183.

6. Development of methods to detect “Norwalk –Like Viruses” (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: application to food-borne NLV outbreak / K.D. Schwab [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2000. — Vol. 66, № 1. — P. 213–218.

7. Butot, T.P. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables / T.P. Butot, G. Sánchez // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2007. — Vol. 73, № 1. — P. 186–192.

8. Амвросьева, Т.В. Новые методические решения выявления вирусной контаминации объектов среды обитания человека / Т.В. Амвросьева, О.Н. Казинец // *Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. / Респ. науч.-практ. центр гигиены; гл. ред. Г.Е. Косяченко.* — Минск, 2013. — Вып. 22. — С. 3–6.

METHODS FOR SAMPLING OF FOOD FOR THE RISK ANALYSIS OF VIRAL CONTAMINATION

Amvrosieva T.V., Kazinetz O.N., Poklonskaya N.V., Lozuk S.K.

*State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus*

The study presents the results of the food sampling methods development for the analysis of viral contamination. The developed methodology involves the using of sorption-elution concentration method for viral agents in selected samples with high-performance fibrous material “Fiban” and detection by PCR. Developed sampling methods have been tested in experimental conditions with using of pseudoviral particles, which containing a fragment of enteroviruses and noroviruses.

Keywords: viral contamination of food, intestinal virus, concentration, sanitary-virological control.

Поступила 16.06.2016

ОТ РИБАВИРИНА К АЦИКЛИЧЕСКИМ НУКЛЕОЗИДАМ И ФАВИПИРАВИРУ ШИРОКОГО СПЕКТРА ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ

Бореко Е.И.

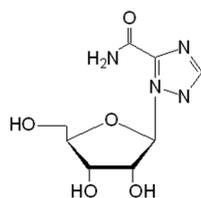
*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии
и микробиологии», Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Краткий исторический экскурс веществ с широким спектром прямого противовирусного действия, начиная с рибавирина, ациклических нуклеозидов, а также более поздних разработок с использованием структурных особенностей рибавирина. Рибавирин ингибирует репродукцию оболочечных ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Лекарственное средство на основе данного соединения разрабатывался, прежде всего, как противогриппозное. Препятствием к клиническому применению рибавирина при гриппозной инфекции является наличие серьезных побочных эффектов, в частности тератогенного действия. В связи с этим область применения средства в настоящее время является лечение пациентов с вирусным гепатитом С в комбинации с интерфероном, геморрагическими лихорадками и респираторно-синцитиальной инфекцией (в аэрозольной форме). На протяжении многих лет считалось, что рибавирин неэффективен при филовиральной инфекции. Данные последних лет свидетельствуют об увеличении выживаемости (до 75%) и продолжительности жизни мышей и обезьян, инфицированных вирусом Эбола, и потенциальной возможности использования рибавирина при инфекции человека. Противовирусные свойства адефовира направлены на ретро-, гепаднавирусы и вирусы герпеса, цидофовира — на вирусы с двуспиральной ДНК (папова-, адено-, иридо-, покс- и герпесвирусы). Бринцидофовир (липидный конъюгат цидофовира) более эффективен и менее токсичен, находится в стадии разработки. Важная особенность рибавирина — широкий спектр противовирусного действия — продолжает привлекать внимание, и в последние годы синтезирована линейка его аналогов. Наиболее продвигаемым из них является фавипиравир (6-фтор-3-гидрокси-2-пиазин-карбоксамид, Т-705). Фавипиравир активен в отношении широкого спектра вирусов гриппа и многих других РНК-вирусов. Однако его противовирусное действие в отношении негриппозных РНК-вирусов менее выражено, в отношении ДНК-вирусов он неактивен.

Ключевые слова: противовирусные свойства, адефовир, цидофовир, тенофовир, бринцидофовир, рибавирин, фавипиравир.

Вирусные инфекции, представляющие основные эпидемические угрозы на сегодняшний день, обусловлены кроме вируса гриппа А (H1N1), вызвавшего пандемию в 2009 г. и продолжающего циркулировать в качестве сезонного вируса, вирусов гриппа А (H5N1) и А (H7N9) как причины постоянных случаев заболеваний среди лиц, контактировавших с домашней птицей, наиболее часто упоминаемыми коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома, возбудителями лихорадок Эбола, Ласса, Зика. Широко распространены герпесвирусные инфекции, особое место в инфекционной патологии занимает ВИЧ-инфекция. Возбудители вирусных инфекций относятся к разным таксономическим группам в классификации вирусов, эффективное ингибирование их репродукции требует индивидуализации подходов и выбора медикаментозных противовирусных средств. За исключением препаратов интерферона и иммуномодуляторов, синтетические препараты, непосредственно воздействующие на различных стадиях взаимодействия вируса и клетки, достаточно специфичны и узконаправленны (ингибиторы М2 белка и нейраминидазы вирусов гриппа, обратной транскриптазы, протеазы, интегразы ВИЧ, ингибиторы репликации ДНК герпесвирусов и др.). В связи с этим поиск путей расширения спектра противовирусного действия синтетических противовирусных средств прямого действия всегда был актуален. Наиболее эффективные и практически применимые решения реализованы в основном на основе аномальных нуклеозидов.

Путем полной замены азотистого основания нуклеозида триазолом создано первое синтетическое соединение с широким спектром противовирусного действия (рибавирин, вирозол). Рибавирин



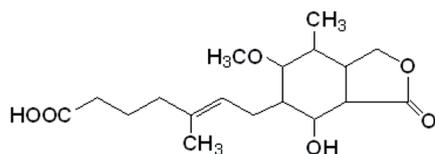
1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (рибавирин, вирозол)

ингибирует репродукцию оболочечных ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Лекарственное средство на основе данного соединения разрабатывался, прежде всего, как противогриппозное. В испытаниях на добровольцах установлена недостаточная эффективность рибавирина при гриппе. Как показано при экспериментальной гриппозной инфекции лабораторных животных, существенно более высока эффективность рибавирина при аэрозольном применении [1], а также при сочетанном применении с ингибиторами М2 белка вируса гриппа А, чем обеспечивается синергидный противовирусный эффект [2]. Препятствием к клиническому применению рибавирина при гриппозной инфекции является наличие серьезных побочных эффектов, в частности тератогенного действия [3]. В связи с этим область применения в настоящее время является лечение пациентов с вирусным гепатитом С в комбинации с интерфероном [4–

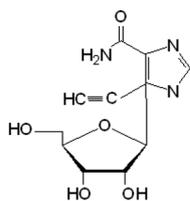
8], геморрагическими лихорадками [9, 10] и респираторно-синцитиальной инфекцией (в аэрозольной форме) [11, 12]. Однако его эффективность в последнем случае оспаривается [13].

Эффективность рибавирина при геморрагических лихорадках показана в экспериментах на приматах (аренавирусных Ласса и боливийской; буньявирусных долины Рифт и Крым-Конго; хантавирусных с почечным и пульмональным синдромами). Различные штаммы высокопатогенных возбудителей от диких грызунов и заболевших людей в различных географических зонах высоко чувствительны к рибавирину. Рибавирин при лечении геморрагической лихорадки с почечным синдромом существенно снижает тяжесть течения болезни: уменьшается продолжительность таких симптомов, как лихорадка, олигурия, боль в пояснице, животе и головных болей. Выраженное снижение пиковых показателей мочевины и креатинина свидетельствует об уменьшении степени повреждения почек. Кроме того, риск развития геморрагий у лиц, принимавших рибавирин, значительно сокращается. Результатом ослабления тяжести клинического течения болезни является значительное (примерно в 7 раз) сокращение случаев смертельных исходов.

Рибавирин проникает в инфицированные клетки, где под влиянием аденозинкиназы фосфорилируется в моно-, ди- и трифосфатные метаболиты. Противовирусное действие рибавирина обусловлено тремя различными механизмами: 1) путем ингибирования инозин монофосфат дегидрогеназы (IMPDH) препарат снижает внутриклеточный пул гуанозинтрифосфата и тем самым опосредованно подавляет синтез нуклеиновых кислот вирусов. Доказано, что этот механизм не является преобладающим. В сравнительном исследовании изучали анти-аренавирусный эффект рибавирина и других ингибиторов IMPDH, микофеноловой кислоты (МРА) и 5-этинил-1-β-D-рибофуранозил имидазол-4-



карбоксамид (EICAR). Все три соединения были способны подавлять репликацию вируса Ласса на ≥ 2 lg в культуре клеток. Ингибирующее действие МРА и EICAR было обратимо при восстановлении внутриклеточного пула GTP экзогенным добавлением гуанозина, в то время как рибавирин оставался полностью активным. Аналогичные эксперименты, проведенные с вирусом Эбола, показали, что

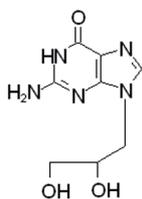


5-Этинил-1-β-D-рибофуранозил имидазол-4-карбоксамид (EICAR)

ингибиторы IMPDH также активны против этого вируса, хотя и в меньшей степени, чем в отношении вируса Ласса. Таким образом, эксперименты с МРА и EICAR показывают, что репликация вируса Ласса и Эбола чувствительна к истощению пула ГТФ, опосредованного через ингибирование IMPDH. Тем не менее это не является основным механизмом, посредством которого рибавирин оказывает свое противовирусное действие на вирус Ласса. [14]; 2) рибавирин может изменять синтез РНК с последующим нарушением транскрипции вируса; 3) показано прямое угнетающее влияние рибавирина на активность полимеразы вирусов.

На протяжении многих лет считалось, что рибавирин неэффективен при filo-вирусной инфекции, вероятно, в связи с публикацией J.W. Huggins [10]. Данные последних лет свидетельствуют об увеличении выживаемости (до 75%) и продолжительности жизни мышей и обезьян, инфицированных вирусом Эбола, и потенциальной возможности использования рибавирина при инфекции человека [15].

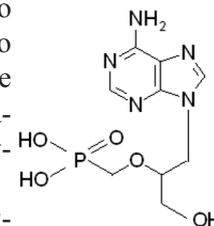
Среди ациклических нуклеозидов (S)-9-(2,3-дигидроксипропил)аденин (ДНРА) стал первым



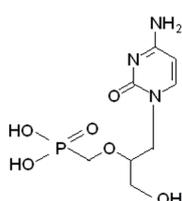
(S)-9-(2,3-дигидроксипропил) аденин (ДНРА)

соединением с широким спектром противовирусного действия. Было показано, что ДНРА является ингибитором S-аденозилгомоцистеин (SAH) гидролазы. SAH-гидролаза ответственна за гидролиз гомоцистеина и аденозина и является ингибитором S-аденозилметионинзависимой трансферазной реакции. Последняя необходима для созревания вирусной мРНК, образования 5'-кэпа, что существенно для синтеза потомства. SAH-гидролаза может приводить к накоплению SAH, блокированию метилтрансферазной реакции и подавлению вирусного репликативного цикла [16]. ДНРА влияет на размножение РНК-вирусов с негативным геномом (рабдо-, арена- и парамиксовирусы), двуцепочечных РНК-вирусов (реовирусы), некоторых ДНК-вирусов (вирус оспенной вакцины и цитомегаловирус).

(S)-9-(3-гидрокси-2-фосфонилметоксипропил)аденин (НРМРА) пред-



ставляет собой гибридную молекулу, содержащую ациклический нуклеозид, подобный ДНРА, и фосфонат, подобный фосфонмуравьиной кислоте (фоскарнету). Фоскарнет в настоящее время используется в лечении цитомегаловирусной инфекции. аденин (НРМРА) НРМРА активен в отношении многих ДНК-содержащих вирусов, включая папова-, адено-, герпес-, иридо-, покс-, гепаднавирусы [17].



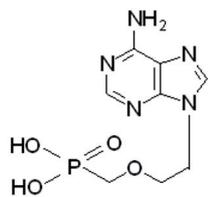
(S)-1-(3-гидрокси-2-фосфонил-метоксипропил)имидазол (НРМРС, шилофовир)

Создан ряд производных ациклических нуклеозидов, к которым присоединена фосфонатная группа, подобных НРМРА. В связи с этим они обходят первую стадию фосфорилирования во внутриклеточном метаболизме до трифосфатов. Спектр противовирусного действия одного из них — НРМРС (цидофовир) — распространяется на папова-, адено-, иридо-, покс- и герпесвирусы, в т. ч. тимидинкиназодефицитные штаммы вируса герпеса простого и опоясывающего лишая и протеинкиназодефицитные штаммы цитомегаловируса, которые устойчи-

вы к действию ацикловира и ганцикловира. НРМРС при экспериментальной герпетической и цитомегаловирусной инфекциях лабораторных животных более эффективен, чем ацикловир и ганцикловир соответственно. НРМРС разрешен к системному применению для лечения цитомегаловирусных ретинитов у пациентов с ВИЧ-инфекцией. Он может также применяться для местного лечения герпетических поражений с развившейся лекарственной устойчивостью возбудителя к другим препаратам [17].

РМЕА (адефовир) может быть представлен как усеченная форма НРМРА, в которой удалена 3-гидроксиметильная группа. В то время как НРМРА, благодаря присутствию гидроксильной груп-

пы, может быть включен в цепь ДНК посредством межнуклеотидной связи, РМЕА должен действовать как обязательный терминатор цепи [17]. Противовирусные свойства РМЕА направлены на ретро-, гепаднавирусы и вирусы герпеса.



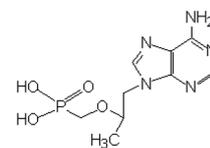
О[9-(2-фосфонилметоксиэтил)
аденин] (РМЕА,
адефовир)

Еще один представитель группы фосфонатов ациклических нуклеозидов — тенофовир — является ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ. В лекарственной форме субстанция представлена провеществом, тенофовира дизопрроксил фумаратом, *in vivo* он превращается в тенофовир и затем в активный метаболит — тенофовира дифосфат, который ингибирует активность обратной транскриптазы ВИЧ-1, встраиваясь в молекулу вирусной ДНК и нарушая синтез цепочки ДНК.

Три перечисленных препарата из группы фосфонатов ациклических нуклеозидов нашли применение в медицинской практике для лечения различных ДНК вирусных инфекций (цидофовир), гепатита В (адефовир) и ВИЧ-

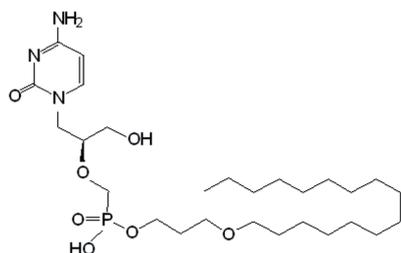
инфекции (тенофовир). Это, а также фамилия одного из авторов синтеза веществ, послужили поводом к игре слов в названии и содержании известной публикации (The Holy Trinity: the acyclic nucleoside phosphonates [18]).

Цидофовир используется в виде пролекарства — бринцидофовира (3-гексадецилокси-1-пропанол липидный конъюгат цидофовира), который внутри клетки трансформируется в противовирусное соединение, дифосфат цидофовира. Проявляет ингибирующую активность в отношении dsDNA вирусов (ВК-



{{[(2R)-1-(6-амино-9Н-пурин-9-ил)пропан-2-ил]окси}метил} фосфоновая кислота (тенофовир)

вирус, JC-вирус, адено-, цитомегаловирус, возбудитель контагиозного моллюска, вирусы осповакцины и ортопоксвирусы). Препарат находится в стадии разработки в соответствии с «the Animal Rule», принятых FDA в 2002 г., EC_{50} в отношении различных штаммов вируса натуральной оспы 0,11 мкМ, примерно в 100 раз эффективнее цидофовира [19].



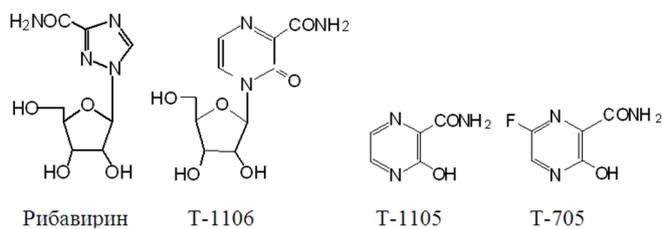
3-гексадецил-окси-1-пропанол
липидный конъюгат цидофовира
(бринцидофовир)

Примечательно, что сообщения в литературе об эффективности рибавирина в отношении возбудителя лихорадки Эбола многие годы отсутствовали, в то же время бринцидофовир, в спектр противовирусной активности которого РНК-содержащие

вирусы не входят, обсуждался как возможное средство лечения этой инфекции. Оказалось, что для проявления противовирусной активности в отношении вируса Эбола необходима только липидная часть бринцидофовира. В отличие от механизма действия бринцидофовира в отношении цитомегаловируса и других ДНК-вирусов дальнейшее фосфорилирование цидофовира в данном случае не требуется, активность достигается с 3-гексадецилокси-1-пропанол липидными конъюгатами и другими нуклеотидами [20].

Возвращаясь к рибавирину, следует отметить, что его важная особенность — широкий спектр

противовирусного действия — продолжает привлекать внимание, и в последние годы синтезирована линейка его аналогов, в которых 1,2,4-триазол-3-карбоксамид замещен 3-гидрокси-2-пиазинкарбоксамидом. Наиболее продвигаемым из них является фавипиравир (6-фтор-3-гидрокси-2-пиазинкарбоксамид, T-705). Соединение является ингибитором РНК-зависимой РНК-



полимеразы вируса гриппа, фосфорилируется энзимами клетки в активную форму — фавипиравир-рибофуранозил-5'-трифосфат. Противовирусное действие обусловлено тем, что вирусная РНК-полимераза ошибочно распознает фавипиравир трифосфат как пуриновый нуклеотид. Фавипиравир активен в отношении широкого спектра вирусов гриппа (EC_{50} = 0,013–0,48 мкг/мл, CC_{50} >2000 мкг/мл), включая вирусы гриппа А(H1N1)pdm09, А(H5N1) и А(H7N9), штаммы вируса, устойчивые к дей-

ствию применяющихся противовирусных средств, проявляет синергический эффект в сочетании с оселтамивиром. При экспериментальной гриппозной инфекции мышей, вызванной различными штаммами вируса, включая А (H5N1), фавипиравир обеспечивает значительную эффективность в дозе 33 мг/кг/сут или более. При 4-кратном введении в день и продолжительности лечения 5 дней выживают все животные. В то же время оселтамивир недостаточно эффективен в дозе 20 мг/кг дважды в день в течение 5 дней [21].

Фавипиравир кроме вирусов гриппа блокирует репродукцию многих других РНК-вирусов, включая аренавирусы Хунин, Мачупо, Пичинде; флебовирусов (лихорадки долины Рифт, москитных лихорадок и Пунта Торо); хантивирусов (Мапорал, Добрава, Проспект Хилл); флавивирусов (желтой лихорадки и Западного Нила); энтеровирусов (полио- и риновирусов); альфавирусов, вируса ВЭЛ; парамиксовирусов, РС-вируса; норовирусов [22]. Рибавирин в низких дозах синергически потенцирует эффективность фавипирава при экспериментальных геморрагических лихорадках мелких лабораторных животных, включая лихорадку Эбола [23]. Однако противовирусное действие фавипирава в отношении негриппозных РНК-вирусов менее выражено, в отношении ДНК-вирусов он неактивен [24]. Клинические испытания фавипирава в Японии находятся в фазе III, в США — в фазе II. Разработчики: Toyama Chemical Co., Department of Virology, Toyama University, Institute for Antiviral Research and Department of Animal, Dairy, and Veterinary Sciences, Utah State University [22].

Как и в случае рибавирина, разрабатывавшегося первоначально как противогриппозное средство, фавипиравир, проявляющий наиболее высокую ингибирующую активность в отношении репродукции вирусов гриппа, вызывает интерес и также активно изучается в связи с его противовирусными свойствами в отношении флави-, бунья-, арена-, филовирусов, входит в список потенциальных средств при лихорадке Эбола. Сравнение степени выраженности противовирусного действия фавипирава и рибавирина в отношении вирусов гриппа свидетельствует о несколько более высокой активности рибавирина [25], однако особенность строения молекулы фавипирава позволяет предполагать отсутствие серьезных побочных эффектов, ограничивающих применение в качестве нового средства лечения и профилактики распространенных вирусных инфекций.

Литература

1. Arensman, J.B. Effects of small-particle aerosols of rimantadine and ribavirin on arterial blood pH and gas tensions and lung water content of A2 influenza-infected mice / J.B. Arensman, J.W. Dominik, D.E. Hilmas // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 1977. — Vol. 12, № 1. — P. 40–46.
2. Combined action of ribovirin and rimantadine in experimental myxovirus infection / G.A. Galegov [et al.] // *Experientia.* — 1977. — Vol. 33, № 7. — P. 905–906.
3. Oxford, J.S. Specific inhibitors of influenza virus replication as potential chemoprophylactic agents / J.S. Oxford // *J. Antimicrob. Chemother.* — 1975. — Vol. 1, № 1. — P. 7–23.
4. Collier, J. Combination therapy with interferon-alpha and ribavirin for hepatitis C: practical treatment issues / J. Collier, R. Chapman // *BioDrugs.* — 2001. — Vol. 15, № 4. — P. 225–238.
5. Gervais, A. Tolerability of treatments for viral hepatitis / A. Gervais, N. Boyer, P. Marcellin // *Drug Saf.* — 2001. — Vol. 24, № 5. — P. 375–384.
6. Ribavirin treatment in dialysis patients with chronic hepatitis C virus infection — a pilot study / A. Bruchfeld [et al.] // *J. Viral. Hepat.* — 2001. — Vol. 8, № 4. — P. 287–292.
7. Tossing, G. Therapy of chronic hepatitis B and C and treatment options in HCV-HIV co-infection / G. Tossing // *European conference on infectious diseases and tropical medicine, Leipzig, 3–6 May 2001.* — Published in: *Eur. J. Med. Res.* — 2001. — Vol. 6, № 6. — P. 272–274.
8. Zeuzem, S. What is (cost) effective in patients with chronic hepatitis C virus infection? / S. Zeuzem // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* — 2001. — Vol. 13, № 5. — P. 473–476.
9. Эффект рибавирина (виразола) на размножение аренавируса в культурах клеток / А.С. Петкевич [и др.] // *Вопр. вирусологии.* — 1981. — № 2. — С. 244–245.
10. Huggins, J.W. Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug / J.W. Huggins // *Rev. Infect. Dis.* — 1989. — Vol. 11, suppl. 4. — P. 750–761.
11. Greenough, A. Recent advances in the management and prophylaxis of respiratory syncytial virus infection / A. Greenough // *Acta Paediatr. Suppl.* — 2001. — Vol. 90, № 436. — P. 11–14.
12. Respiratory syncytial virus infection in the late bone marrow transplant period: report of three cases and review / N.I. Khushalani [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* — 2001. — Vol. 27, № 10. — P. 1071–1073.
13. Van Woensel, J.B. Respiratory tract infections caused by respiratory syncytial virus in children. Diagnosis and treatment / J.B. Van Woensel, J.L. Kimpen, P.L. Brand // *Minerva Pediatr.* — 2001. — Vol. 53, № 2. — P. 99–106.

14. Ölschläger, S. Depletion of GTP pool is not the predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral effect on Lassa virus / S. Ölschläger, J. Neyts, S. Günther // *Antiviral Res.* — 2011. — Vol. 91, № 2. — P. 89–93.
15. Determination and Therapeutic Exploitation of Ebola Virus Spontaneous Mutation Frequency / K.J. Alfson [et al.] // *J. Virol.* — 2015. — Vol. 90, № 5. — P. 2345–2355.
16. De Clercq, E. Strategies in the design of antiviral drugs / E. De Clercq // *Nat. Rev. Drug Discovery.* — 2002. — Vol. 1, № 1. — P. 13–25.
17. De Clercq, E. In search of a selective antiviral chemotherapy / E. De Clercq // *Clin. Microbiol. Rev.* — 1997. — Vol. 10, № 4. — P. 674–693.
18. De Clercq, E. The Holy Trinity: the acyclic nucleoside phosphonates / E. De Clercq // *Adv. Pharmacol.* — 2013. — Vol. 67. — P. 293–316.
19. *In vitro* efficacy of brincidofovir against variola virus / V.A. Olson [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2014. — Vol. 58, № 9. — P. 5570–5571.
20. The lipid moiety of brincidofovir is required for *in vitro* antiviral activity against Ebola virus / L.K. McMullan [et al.] // *Antiviral Res.* — 2016. — Vol. 125. — P. 71–78.
21. Efficacy of orally administered T-705 on lethal avian influenza A (H5N1) virus infections in mice / R.W. Sidwell [et al.] // *Antimicrob. Ag. Chemother.* — 2007. — Vol. 51, № 3. — P. 845–851.
22. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor / Y. Furuta [et al.] // *Antiviral Res.* — 2013. — Vol. 100, № 2. — P. 446–454.
23. Low-dose ribavirin potentiates the antiviral activity of favipiravir against hemorrhagic fever viruses / J.B. Westover [et al.] // *Antiviral Res.* — 2016. — Vol. 126. — P. 62–68.
24. *In vitro* and *in vivo* Activities of Anti-Influenza Virus Compound T-705 / Y. Furuta [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2002. — Vol. 46, № 4. — P. 977–981.
25. Antiviral susceptibility of variant influenza A(H3N2)v viruses isolated in the United States from 2011 to 2013 / K. Sleeman [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2014. — Vol. 58, № 4. — P. 2045–2051.

FROM RIBAVIRIN TO ACYCLIC NUCLEOSIDES AND FAVIPIRAVIR WITH WIDE SPECTRUM OF ANTIVIRAL ACTION

Boreko E.I.

*State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus*

A brief historical review of substances with a wide range of direct antiviral action, starting with ribavirin, acyclic nucleosides, as well as more recent developments with the use of the structural features of ribavirin. Ribavirin inhibits of the enveloped DNA and RNA viruses reproduction. A drug based on the compound was developed primarily as an anti-influenza medicine. An obstacle to the clinical use of ribavirin with influenza infection is the presence of serious side effects, such as teratogenicity. Therefore application area of ribavirin is the treatment of viral hepatitis C in combination with interferon, hemorrhagic fevers, and respiratory syncytial virus infection (in aerosol form). For many years it was thought that ribavirin is not effective in filovirus infection. Recent data show an increase in survival (up to 75%) and lifetime of mice and monkeys infected with the Ebola virus and the potential use of ribavirin in human infection. Antiviral properties of adefovir focused on retro, hepadna- viruses and herpes viruses, cidofovir inhibits the reproduction of viruses with dsDNA (papova-, adeno-, irido-, pox-, herpesviruses). Brincidofovir (lipid conjugate of cidofovir) is more effective and less toxic, is currently under development. An important feature of ribavirin, a broad spectrum of antiviral action, continues to attract attention and its analogs have been synthesized in recent years. Most promoted of them is favipiravir (6-fluoro-3-hydroxy-pyrazine-2-carboxamide, T-705). Favipiravir is active against a broad spectrum of influenza viruses and many other RNA viruses. However, its antiviral effect against non-influenza virus RNA less pronounced, against DNA viruses it is inactive.

Keywords: antiviral properties, adefovir, cidofovir, tenofovir, brincidofovir, ribavirin, favipiravir.

Поступила 29.07.2016

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА

Еремин В.Ф., Гасич Е.Л., Сосинович С.В.

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

Реферат. В статье представлены данные по типированию вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска, выявляемого у женщин репродуктивного возраста. Проведенное секвенирование более 100 образцов и последующий филогенетический анализ по участкам генов L1, E6/E7 ВПЧ-16, 18, 45 позволили установить, что на территории Республики Беларусь циркулируют в основном варианты ВПЧ-16, 18, 45, занесенные из стран юго-восточной Азии. Вместе с тем нами было показано, что на территории страны циркулируют «старые» местные варианты ВПЧ высокого онкогенного риска, а также вирусы с Африканского континента, и это необходимо учитывать при выборе вакцин и оценке эффективности посвакцинального иммунитета. Впервые описан новый вариант ВПЧ-16 типа.

Ключевые слова: секвенирование, филогенетический анализ, варианты ВПЧ высокого онкогенного риска.

Введение. Степень родства между типами ВПЧ основана на сравнении нуклеотидных последовательностей и филогенетическом анализе фрагментов ДНК (L1 ORF). Для получения высокоинформативного филогенетического анализа достаточно фрагмента ДНК гена L1 размером 291 п.н. [1]. Секвенирование и последующий филогенетический анализ полученных последовательностей вирусов папилломы (ВП) используются для определения типов, подтипов и вариантов [2, 3]. Филогенетический анализ L1 ORF позволил разделить типы ВП на «роды» и «виды». Критериями для такого деления являются:

- 1) «род» — различия менее 60% по нуклеотидным последовательностям в гене L1 ORF или более 23% при сравнении полного генома;
- 2) «вид» — 60–70% идентичности нуклеотидных последовательностей генома вирусов;
- 3) типы ВП внутри «вида» 71–89% идентичности в пределах полного участка L1 ORF.

Таким образом, термин «род» объединяет филогенетически близкие папилломавирусы, имеющие отличия по биологическим свойствам. Например, род α папилломавирусов объединяет вирусы с высоким и низким уровнем онкогенного риска. Вид определяет вирусы, близкие филогенетически, биологически и патологически. Так, папилломавирусы, вызывающие кожные бородавки (ВПЧ 27 и ВПЧ 57), относятся к одному виду с ВПЧ 2, а все ВПЧ высокого онкогенного риска образуют вид № 9 вместе с ВПЧ 16 или вид № 7 с ВПЧ 18. Термин «субтип» для типов ВП определяется, если имеется 2–10% разница в нуклеотидных последовательностях в гене L1. Все генитальные серотипы ВПЧ отнесены к роду α , который, согласно филогенетической классификации, подразделен на основе различий последовательностей генов E6, E7, L1 на 7 филогенетических групп генитальных ВПЧ: $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 11$ (45 серотипов). По степени канцерогенного потенциала выделяют генотипы ВПЧ низкого (6, 11, 40, 42, 43, 44, 61), среднего (30, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58) и высокого (16, 18, 31, 36, 45) онкологического риска. По данным Европейского отделения Международного общества по изучению инфекции в акушерстве и гинекологии I-IDSOG-EUROPE [4], а также других исследователей [3, 5], ВПЧ подразделяются на генотипы высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66) и генотипы низкого риска (6, 11, 42, 43, 44). К вирусам невыясненного канцерогенного риска относят: 34, 53, 54, 55, 57, 62, 64, 67, 69, 70, 73, 80, 82 [6, 7].

Изоляты ВП, которые отличаются в пределах одного типа на 2–10%, обозначаются как подтипы, а вирусы, имеющие различия в последовательностях 0–2%, обозначаются как варианты. ВПЧ 16, 31, 33 относятся к 9 виду, а ВПЧ 18 и 45 — к 7 виду [8].

Типирование ВПЧ высокого онкогенного риска имеет большое прикладное значение. Например, для молекулярно-эпидемиологического мониторинга циркуляции вируса, определения направления его заноса на территорию, для выбора вакцины, которую лучше использовать для прививки на данной территории.

Использование методов молекулярной эпидемиологии позволяет решать не только чисто эпидемиологические вопросы: определять типы ВПЧ, их степень родства, направления заноса вируса,

Электрофорез фрагментов гена L1 и E6/E7 ВПЧ-16, 18 и 45 после секвенирующей ПЦР проводили на генетическом анализаторе ABI Prism 3100 Avant (Applied Biosystems, США).

Для анализа последовательностей фрагмента гена L1 и E6/E7 ВПЧ-16, 18, 45 использовали программы Sequencing Analysis v.5.1.1, BioEdit, SeqScape.

Анализ результатов секвенирования проводили с помощью программ Clustal W (1.8) и BioEdit. Для филогенетического анализа полученных результатов использовали программу MEGA 6 по методу присоединения соседей (Neighbour-Joining), нуклеотидные дистанции рассчитывали по методу Kimura.

Результаты и их обсуждение. Для секвенирующей ПЦР нами были разработаны и синтезированы пары праймеров (прямой и обратный), позволяющие генотипировать участок гена L1 ВПЧ 16, 18, 45 типов ВПЧ, а также пары праймеров к E6/E7 участку ВПЧ-16, 18 и 45.

Температура отжига для каждого праймера была рассчитана с использованием имеющихся в свободном доступе в интернете компьютерных программ.

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе «Corbet Research» (Австралия) в объеме 50 мкл по следующей прописи: $MgCl_2$ — 2,5 mM, смесь трифосфатов — 0,25 mM, праймеры по 5 pmol, 1x ПЦР-буфер, Taq-полимераза — 0,025 U/ul.

ПЦР проводили при следующем режиме (объем реакционной смеси 50 мкл): 95°C — 5 мин, [95°C — 30 с, 54°C — 45 с, 72°C — 60 с] — 30 циклов, 72°C — 7 мин, 4°C — хранение.

Результаты электрофоретической детекции продукта ПЦР представлены на рисунках 1–3.

ПЦР для участков гена L1 ВПЧ-18 и L1/LCR участка ВПЧ-45 проводили на амплификаторе «Corbet Research» (Австралия) в объеме 50 мкл по следующей прописи: $MgCl_2$ — 2,5 mM, смесь трифосфатов — 0,5 mM, праймеры по 15 pmol, 1x ПЦР-буфер, Taq-полимераза — 0,05 U/ul.

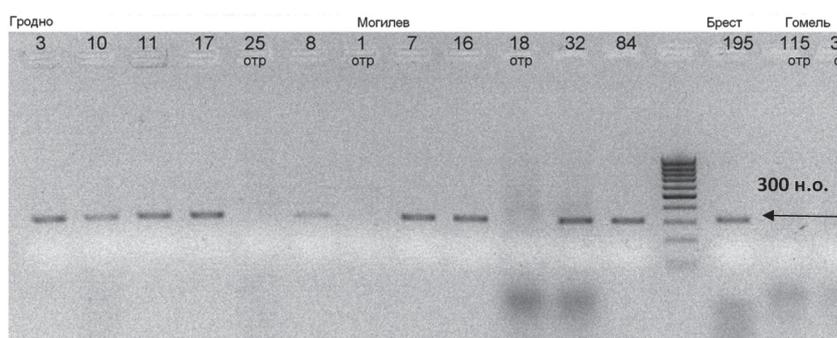


Рисунок 1. — Электрофорез фрагментов ДНК ВПЧ-16 типа по участку гена L1 из разных регионов республики

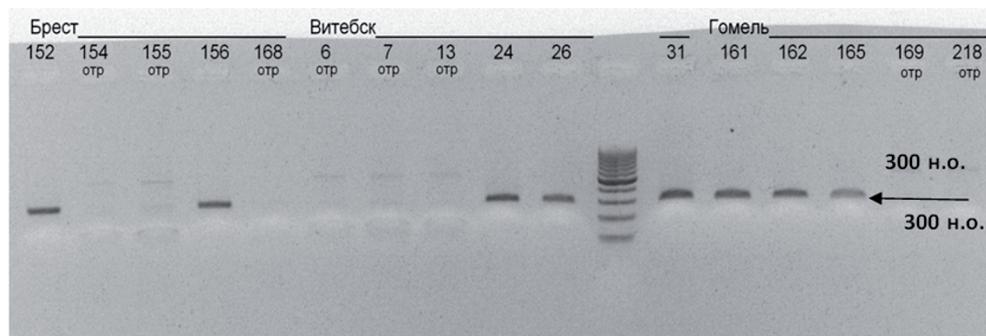


Рисунок 2. — Электрофорез фрагментов ДНК ВПЧ-16 типа по участку гена L1 из разных регионов республики

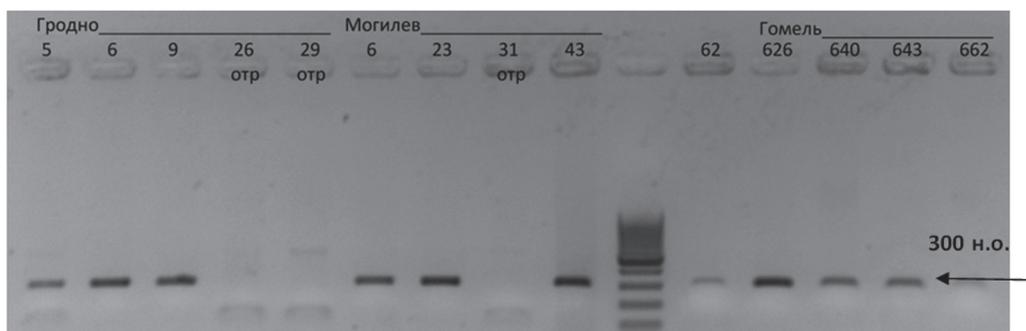


Рисунок 3. — Электрофорез фрагментов ДНК ВПЧ-16 типа по участку гена L1 из разных регионов республики

ПЦР для участка гена L1/LCR ВПЧ-18 выполняли в следующем режиме (объем реакционной смеси 50 мкл): 95°C — 5 мин, [95°C — 50 с, 61°C — 60 с, 72°C — 2 мин] — 35 циклов, 72°C — 7 мин, 4°C — хранение.

ПЦР для участка гена L1 ВПЧ-45 осуществляли по следующей прописи (объем реакционной смеси 50 мкл): 95°C — 5 мин, [95°C — 50 с, 61°C (63°C — 2-й раунд) — 60 с, 72°C — 2 мин] — 35 циклов, 72°C — 7 мин, 4°C — хранение. Результаты исследований представлены на рисунке 4 (А и Б).

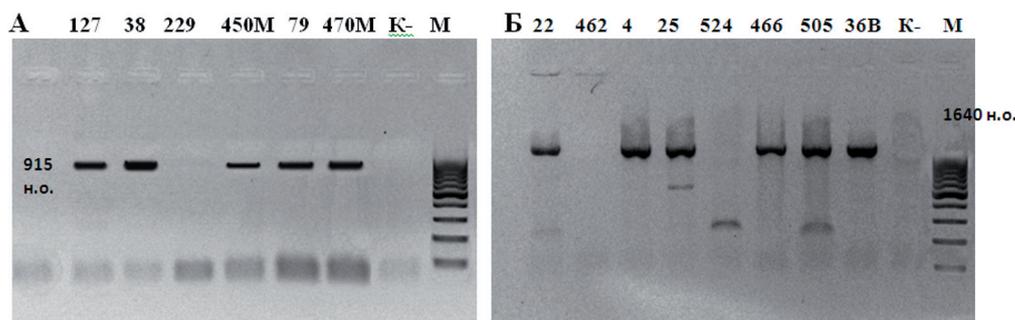


Рисунок 4. — Электрофорез фрагментов ДНК ВПЧ-18(А) и ВПЧ-45 (Б) по участку гена L1 и L1/LCR из разных регионов республики и г. Минска

Полученные фрагменты ДНК ВПЧ-16 мы использовали в дальнейшем для секвенирующей ПЦР. Для дизайна пар праймеров к E6/E7 участкам генома ВПЧ были использованы референсные нуклеотидные последовательности ВПЧ, полученные из базы данных GenBank. С помощью программы FAST PCR подобраны варианты пар праймеров.

После анализа процентного соотношения G+C, комплементарности праймеров, оптимальной температуры связывания праймеров и позиций их расположения на диагностируемых участках ВПЧ, что позволит в дальнейшем провести генотипирование этих участков, были определены следующие пары:

- для участка E6 генома ВПЧ 16 типа (поз. 134–337):

E6F: TTGCTTTTCGGGATTTATGC

E6 R: CAGGACACAGTGGCTTTTGA;

- для участка E7 генома ВПЧ 16 типа (поз.480–985):

E7F: АТААТАААГГГГТСГГТГГ

E7R: САТТТТСГТТСТСГТСАТСТГ.

Анализ расположения праймеров к E6 и E7 участкам генома ВПЧ проводили с помощью программы NCBI Blast (рисунок 5).

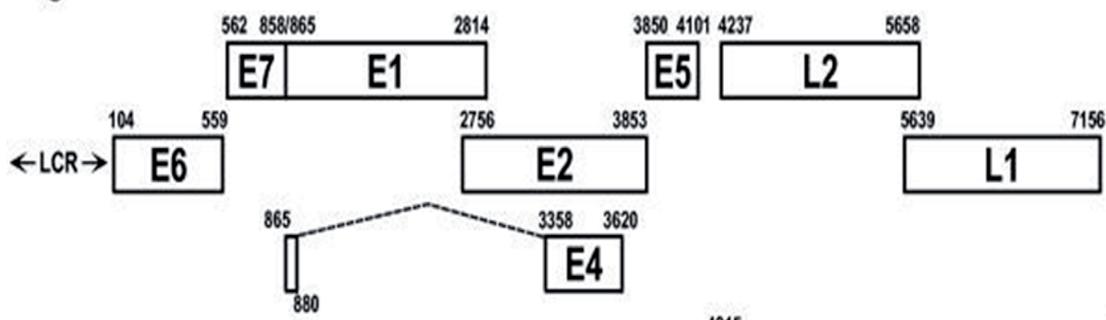


Рисунок 5. — Схема строения генома ВПЧ

С полученными парами праймеров для диагностики участка E6 ВПЧ была выполнена амплификация в следующем режиме: 94°C — 5 мин; 94°C — 15 с, 55°C — 20 с, 72°C — 60 с (25 циклов); 72°C — 3 мин. ПЦР-смесь состояла из следующих компонентов: 1x ПЦР-буфер, 2,0 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTPs, праймеры 0,2 mM каждый, 1U Tag полимеразы (рисунок 6). Как видно из рисунка, размер полученного фрагмента по участку гена E6 ВПЧ составил 202 н.п. Из 7 исследованных образцов ДНК ВПЧ положительными по данному участку генома было 5 проб (№№ 2–6).

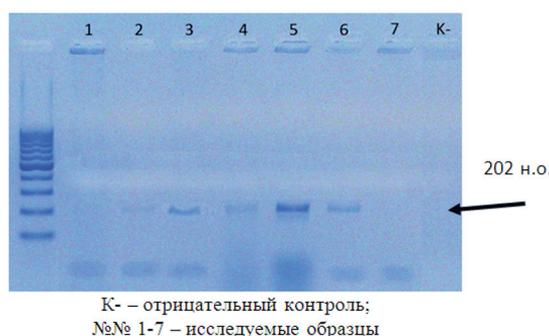


Рисунок 6. — Электрофоретическая детекция E6 фрагмента ДНК ВПЧ 16 типа

Амплификация E7 участка ВПЧ 16 типа была проведена в следующих условиях: 95°C — 5 мин; 95°C — 25 с, 58°C — 30 с, 72°C — 60 с (30 циклов); 72°C — 5 мин. ПЦР выполнена в объеме 50 мкл, состоящем из 1x ПЦР-буфер, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTPs праймеры 1,0 mM каждый, 1U Tag полимеразы (рисунок 7). Как видно из рисунка, размер полученного фрагмента по участку гена E6 ВПЧ составил 535 н.п. Из 7 исследованных образцов ДНК ВПЧ положительными по данному участку генома было 5 (№№ 1, 2, 4–6).

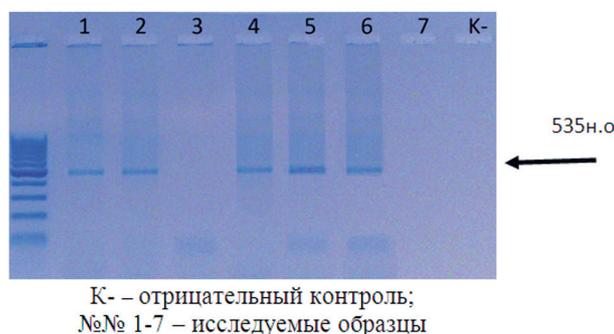


Рисунок 7. — Электрофоретическая детекция E7 фрагмента ДНК ВПЧ 16 типа

Для проведения ПЦР по к E6 и E7 участкам генома ВПЧ 18 был создан дизайн праймеров, которые проанализированы с помощью программы NCBI Blast.

Для участка E6: генома ВПЧ 18 типа (поз.7459–162):

Fp1: ⁷⁴⁵⁹CCGATTTCCGGTTGCC⁷⁴⁷³

RP2: ¹⁶²CCGTGCACAGATCAG¹⁴⁸.

Размер амплифицированного продукта — 340 п.н.

Для подбора оптимальных условий амплификации участка E6 генома ВПЧ 18 генотипа готовили 2 ПЦР-смеси с различными концентрациями компонентов. Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе «GeneAmp® PCR System 2700» (Applied Biosystems, США) в объеме 25 мкл по следующей прописи.

Смесь № 1: MgCl₂ — 2 mM, смесь трифосфатов — 0,2 mM, праймеры по 8,7 pM, 10x ПЦР-буфер — 2,5 мкл, Taq-полимераза — 1 U, кДНК — 3 мкл. Режим амплификации: 95°C — 3 мин; 95°C — 20 с, 61°C — 20 с, 72°C — 1 мин (35 повторов); 72°C — 3 мин.

Смесь № 2: MgCl₂ — 1,5 mM, смесь трифосфатов — 0,2 mM, праймеры по 6 pM, 10x ПЦР-буфер — 2,5 мкл, Taq-полимераза — 1 U, кДНК — 3 мкл. Режим амплификации: 95°C — 3 мин; 95°C — 20 с, 61°C — 20 с, 72°C — 30 с (35 повторов); 72°C — 3 мин.

Результаты электрофоретической детекции продукта ПЦР по фрагменту E6 генома ВПЧ 18 генотипа представлены на рисунке 8.

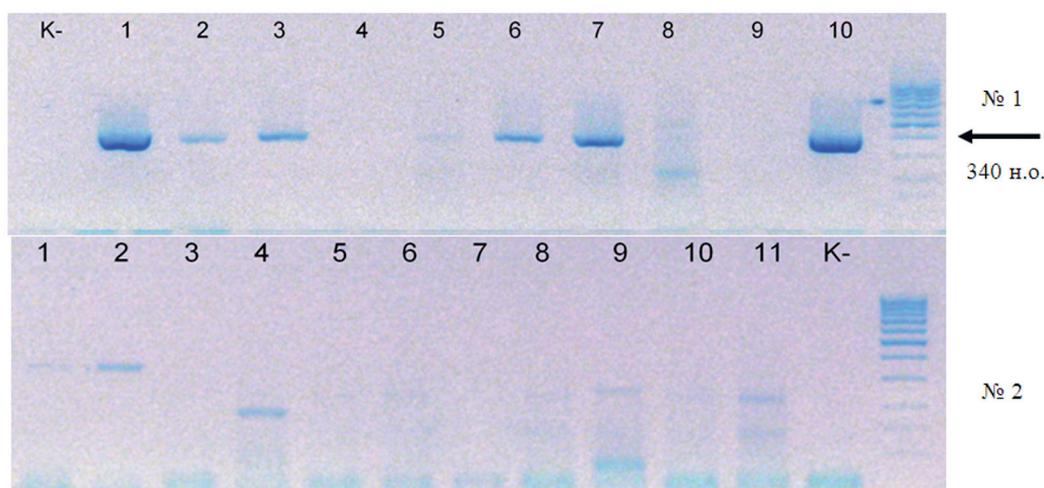


Рисунок 8. — Результаты электрофоретической детекции участка E6 генома ВПЧ 18 генотипа при использовании ПЦР-смеси №№ 1 и 2

Для выявления фрагмента E7 генома ВПЧ 18 генотипа методом ПЦР были использованы пары праймеров, подобранные ранее:

F18E7: 5'-TCACGAGCAATTAAGCGACT-3'

R18E7: 5'-CTGAGCTTTCTACTACTAGC-3'.

Размер амплифицированного продукта — 138 п.н. Результаты анализа расположения праймеров к E7 участку генома ВПЧ 18 типа были получены с помощью программы NCBI Blast.

Для подбора оптимальных условий амплификации участка E7 генома ВПЧ 18 генотипа готовили 2 ПЦР-смеси с различными концентрациями компонентов. Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе «GeneAmp® PCR System 2700» (Applied Biosystems, США) в объеме 25 мкл по следующей прописи.

Смесь № 1: MgCl₂ — 1,5 mM, смесь трифосфатов — 0,2 mM, праймеры по 8 pM, 10x ПЦР-буфер — 2,5 мкл, Taq-полимераза — 1 U, кДНК — 3 мкл. Режим амплификации: 95°C — 3 мин; 95°C — 30 с, 56°C — 30 с, 72°C — 1 мин (35 повторов); 72°C — 3 мин.

Смесь № 2: MgCl₂ — 3 mM, смесь трифосфатов — 0,2 mM, праймеры по 10 pM, 10x ПЦР-буфер — 2,5 мкл, Taq-полимераза — 1 U, кДНК — 3 мкл. Режим амплификации: 95°C — 3 мин; 95°C — 20 с, 61°C — 20 с, 72°C — 30 с (35 повторов); 72°C — 3 мин.

Результаты электрофоретической детекции продукта ПЦР по фрагменту E7 генома ВПЧ 18 генотипа представлены на рисунке 9 (1 и 2).

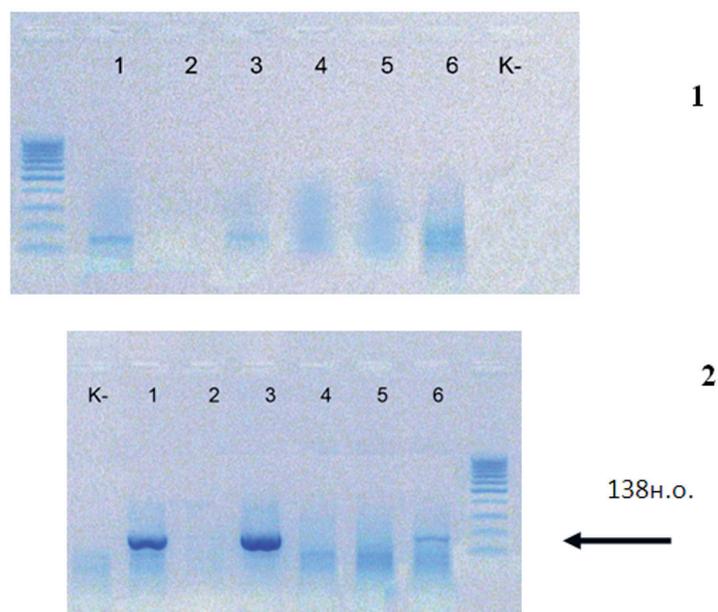


Рисунок 9. — Результаты электрофоретической детекции участка E7 генома ВПЧ 18 генотипа при использовании ПЦР — смеси №№ 1 и 2

Для выявления E6/E7 участка генома ВПЧ 45 типа методом ПЦР были использованы пары праймеров, анализ расположения которых выполнили с помощью программы NCBI Blast.

FE6: CGCAACGACCCTACAAGCTA (124-143)

RE6: GTGTTTCCCTACGTCTGCGA (570-551).

Размер фрагмента — 447 п.н.

Для подбора оптимальных условий амплификации участка E6/E7 ВПЧ 45 генотипа готовили 3 ПЦР-смеси с различными концентрациями компонентов. Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе «GeneAmp® PCR System 2700» (Applied Biosystems, США) в объеме 25 мкл по следующей прописи.

Смесь № 1: MgCl₂ — 2,5mM, смесь трифосфатов — 0,2 mM, праймеры по 8 pM, 10x ПЦР-буфер — 2,5 мкл, Taq-полимераза — 1 U, кДНК — 3 мкл. Режим амплификации: 95°C — 5 мин; 95°C — 30 с, 56°C — 30 с, 72°C — 2 мин (35 повторов); 72°C — 3 мин.

Смесь № 2: MgCl₂ — 3 mM, смесь трифосфатов — 0,2 mM, праймеры по 10 pM, 10x ПЦР-буфер — 2,5 мкл, Taq-полимераза — 1 U, кДНК — 3 мкл. Режим амплификации: 95°C — 5 мин; 95°C — 30 с, 56°C — 30 с, 72°C — 1,5 мин (35 повторов); 72°C — 3 мин.

Смесь № 3: MgCl₂ — 2,0 mM, смесь трифосфатов — 0,2 mM, праймеры по 7 pM, 10x ПЦР-буфер — 2,5 мкл, Taq-полимераза — 1 U, кДНК — 3 мкл. Режим амплификации: 95°C — 5 мин; 95°C — 30 с, 59°C — 30 с, 72°C — 1 мин (35 повторов); 72°C — 3 мин.

Результаты электрофоретической детекции продукта ПЦР по фрагменту E6/E7 генома ВПЧ 45 генотипа представлены на рисунке 10.

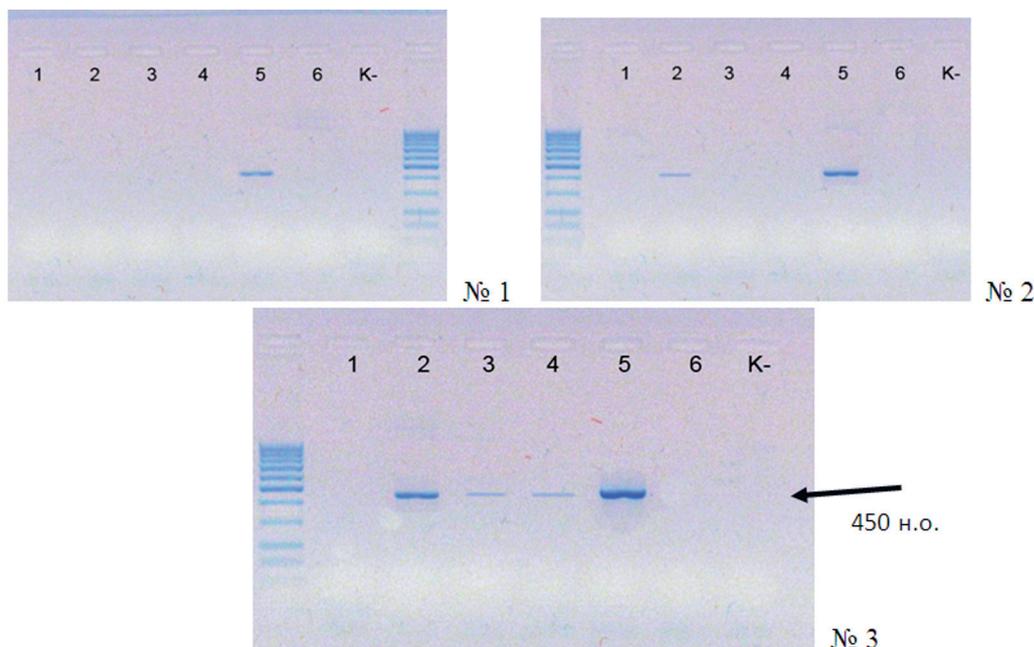


Рисунок 10. — Результаты электрофоретической детекции участка E6/E7 генома ВПЧ 45 типа при использовании ПЦР-смеси №№ 1–3

С помощью разработанных пар праймеров для детекции E6/E7 участков вируса папилломы человека 16, 18 и 45 типов была проведена ПЦР с образцами ДНК, выделенной из цервикальных проб и соскобов с гортани. Получено 22 положительных пробы по E6 и E7 фрагментам ВПЧ 16 типа, 9 — по E6 и E7 фрагментам ВПЧ 18 типа и 4 — по E6 и E7 фрагментам ВПЧ 45 типа. ДНК очищена и в дальнейшем будет использована для секвенирования и филогенетического анализа.

Очистку фрагментов ДНК после ПЦР осуществляли с использованием колонок SigmaSpin™ Post-Reaction Clean-up Columns (SIGMA-ALDRICH, США).

Очистка специфических продуктов после секвенирующей ПЦР была выполнена методом спирт/ацетатной преципитации.

После очистки продуктов секвенирующей ПЦР нами был проведен электрофорез полученных фрагментов ДНК. Всего было проанализировано 58 проб по гену L1 и 62 по участку E6/E7. Результаты секвенирования и филогенетического анализа ВПЧ-16 по участкам генов L1 и E6/E7 представлены на рисунках 11–13.

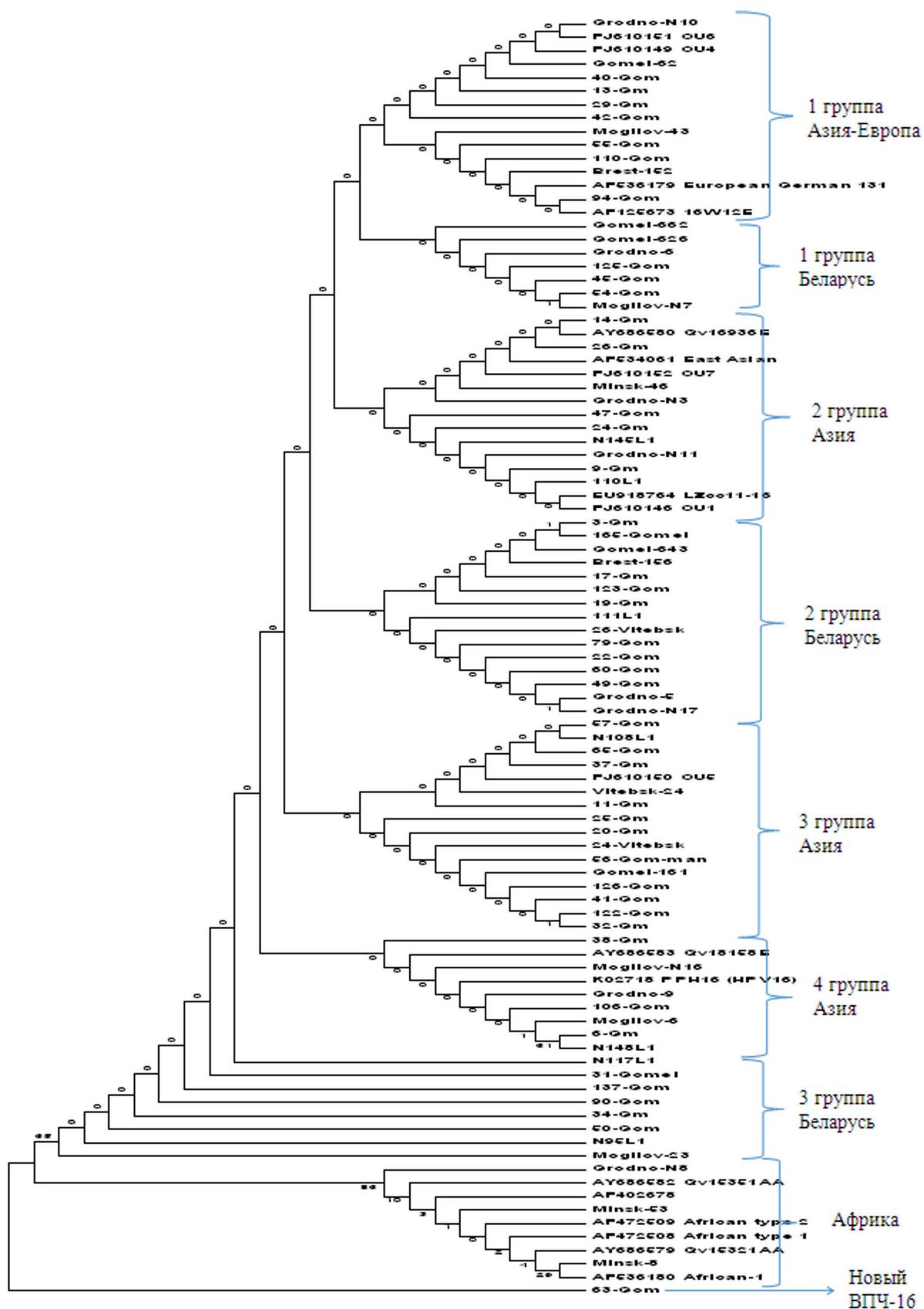


Рисунок 11. — Филогенетический анализ фрагментов ДНК ВПЧ-16 по участку L1

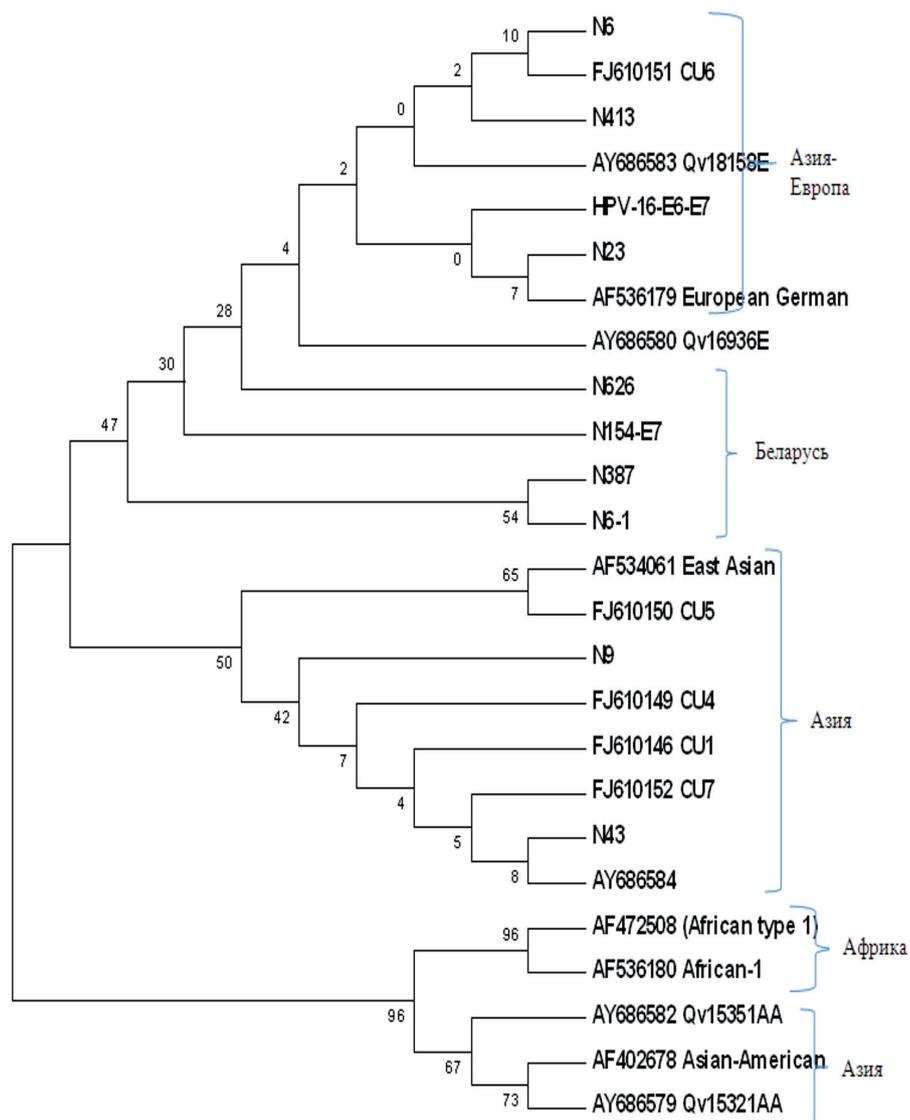


Рисунок 13. — Филогенетический анализ фрагментов ДНК ВПЧ-16 по участкам генов E6/E7

Как видно из данных, представленных на рисунках 11–13, в основном все образцы из Беларуси кластеризовались вокруг референс-последовательностей из юго-восточной Азии и Европы, только 15 и 9 образцов формировали самостоятельные группы друг с другом, *r*-дистанции между белорусскими образцами колебались от 0,000 до 0,024 (средняя *r*-дистанция — 0,001), что указывает как на новые заносы вируса в страну, так и на циркуляцию наших «старых» типов ВПЧ-16, которые и формировали самостоятельные группы образцов на филогенетическом дереве. Отдельно располагался образец 63 из г. Гомеля, он не входил ни в одну из групп и располагался отдельно от всех. Скорее всего это наш старый прародительский вариант ВПЧ-16. Секвенирование полного генома вируса поможет точно установить природу данного изолята. Три вируса, два из Минска и один из Гродненской области, располагались в одной группе «Африка» с африканскими референс-последовательностями, но отдельно друг от друга, что указывает на разное происхождение вируса у данных пациентов.

Секвенирование по участку гена E6 и E6/E7 также разделило вирусы на группы. Также, как и по гену L1 по участкам E6 и E6/E7, вирусы формировали в основном общие группы с азиатскими вариантами ВПЧ-16. В то же время часть изолятов располагались отдельно и образовывали самостоятельные группы.

Для определения возможных различий по участкам генов E6 и E7 у пациентов с разными стадиями ЦИН и пациентов с раком шейки матки мы сравнили полученные нами сиквенсы. Никаких различий в последовательностях обнаружено не было.

По участкам генов L1 и E6/E7 нам удалось секвенировать по 4 образца ВПЧ-18 (рисунки 14, 15). Три фрагмента ДНК ВПЧ по участку L1 генома и 4 по E6/E7 формировали самостоятельную группу, а один образец располагался вместе с референс-последовательностями из Азии. Средние р-дистанции между «белорусскими» образцами составили 0,001, а с образцом 3539-Mn р-дистанция составила 0,003.

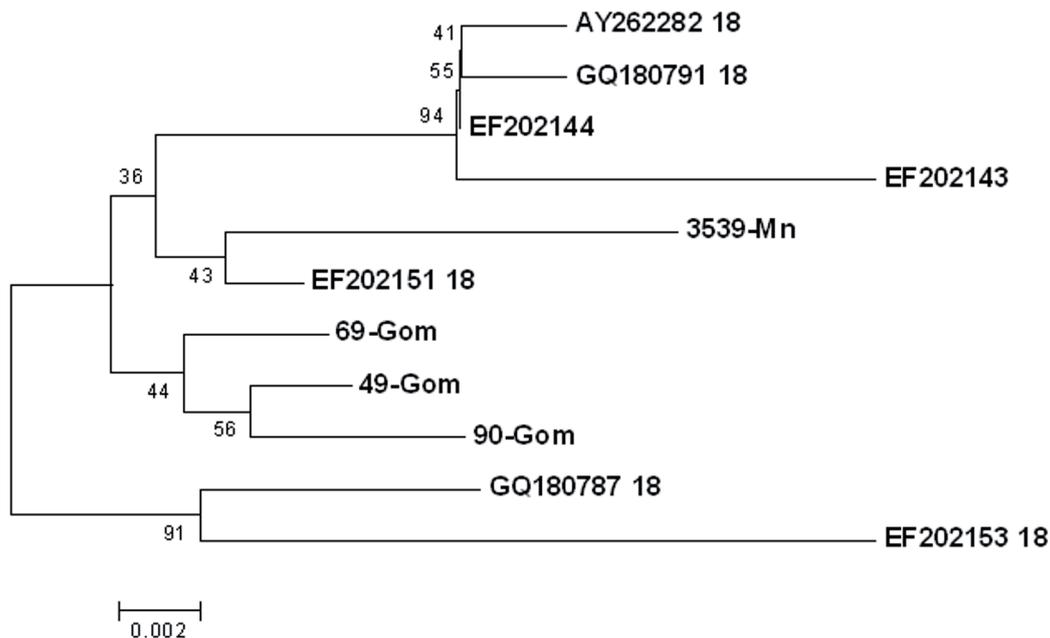


Рисунок 14. — Филогенетический анализ фрагментов ДНК ВПЧ-18 по участку гена L1

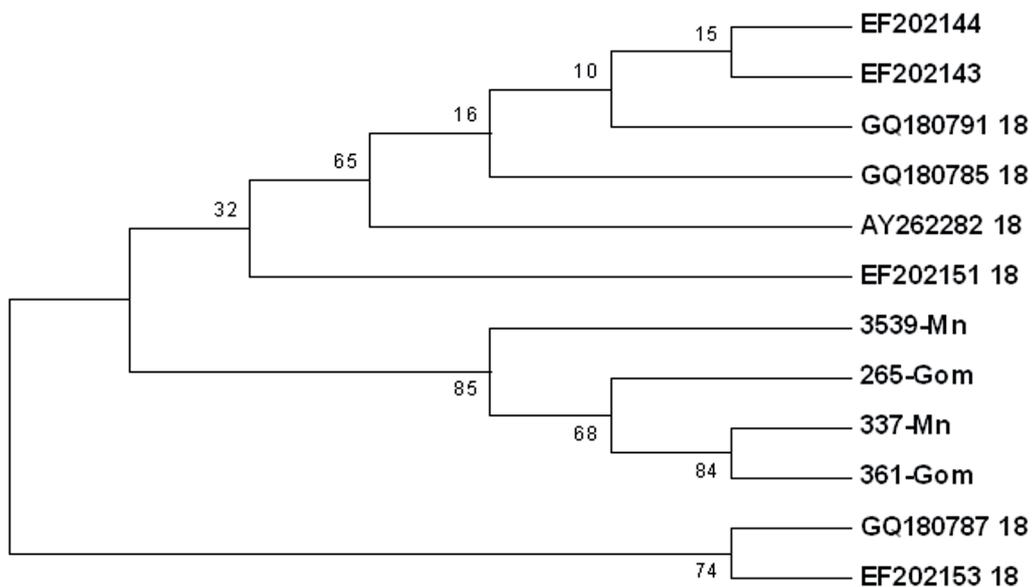


Рисунок 15. — Филогенетический анализ фрагментов ДНК ВПЧ-18 по участку генов E6/E7

По участкам генов L1 и E6/E7 ВПЧ-45 нами было секвенировано по 4 образца (рисунки 16, 17).

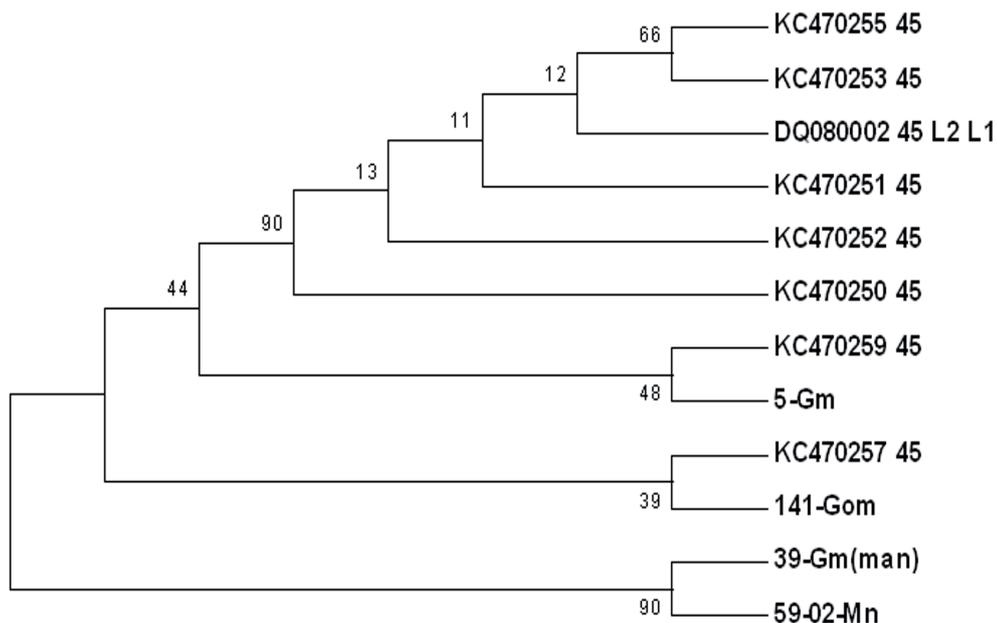


Рисунок 16. — Филогенетический анализ фрагментов ДНК ВПЧ-45 по участку гена L1

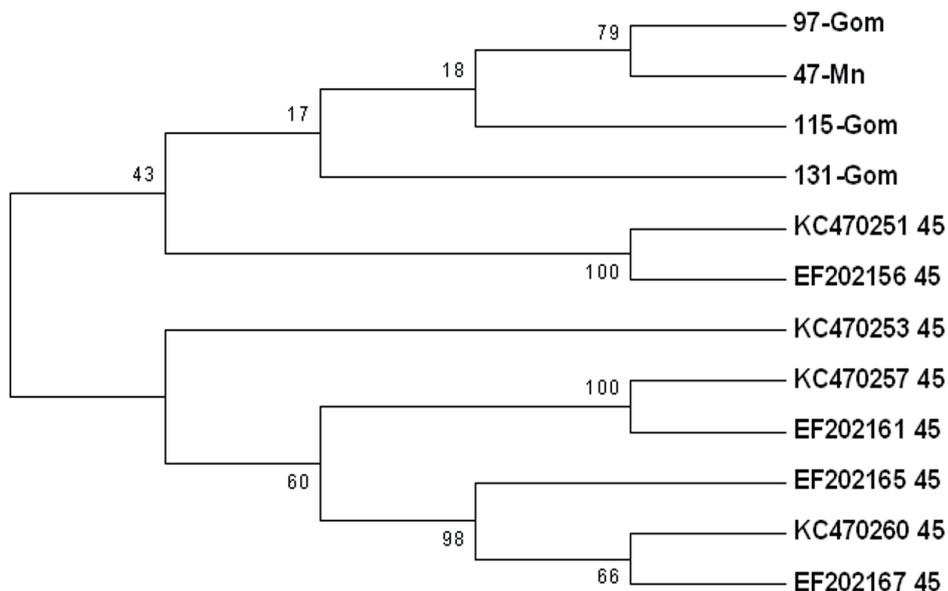


Рисунок 17. — Филогенетический анализ фрагментов ДНК ВПЧ-45 по участку генов E6/E7

По участку гена L1 два образца из Минской и Гомельской областей формировали самостоятельную группу, а два располагались вместе с референс-последовательностями из юго-восточной Азии. Средние p -дистанции между образцами составили 0,003. По участку генов E6/E7 образцы из Беларуси располагались отдельно и формировали две самостоятельные группы, p -дистанции между образцами составили 0,002.

Таким образом, секвенирование и филогенетический показывают, что на территории Беларуси имеет место циркуляция как «старых» вариантов ВПЧ-16, 18 и 45, так и происходит занос новых

типов ВПЧ из-за пределов нашей страны, в основном из стран юго-восточной Азии. Для отслеживания новых вариантов ВПЧ необходимо проводить постоянный мониторинг вируса среди разных групп пациентов в возрасте от 18 до 45 лет. Это необходимо как для принятия решения о вакцинации девочек 13–14 лет, так и для выбора более эффективной вакцины против ВПЧ высокого онкогенного риска. Кроме того, мониторинг необходим и для оценки эффективности вакцинации, поскольку, зная генотипы вируса, использованные в вакцине, и генотипы, доминирующие на исследуемой территории, можно говорить о преимуществах той или иной вакцины после анализа результатов вакцинации и типирования вируса, обнаруженного у вакцинированных лиц.

Заключение. Были отработаны условия проведения ПЦР, секвенирующей ПЦР и секвенирование с парами праймеров к L1, E6/E7 участкам ВПЧ-16, 18, 45. Секвенирование и филогенетический анализ по данным участкам позволили установить, что на территории Республики Беларусь циркулируют в основном варианты ВПЧ-16, 18, 45, занесенные недавно из стран юго-восточной Азии. Вместе с тем нами было показано, что на территории страны циркулируют «старые» местные варианты ВПЧ высокого онкогенного риска, а также вирусы с Африканского континента, и это необходимо учитывать при выборе вакцин и оценке эффективности поствакцинального иммунитета. Впервые выявлен и описан новый вариант ВПЧ-16 типа, который не кластрировался ни с одним из известных вирусов данного типа.

Для эффективной вакцинации и оценки поствакцинального иммунитета необходимо проводить молекулярно-эпидемиологический мониторинг ВПЧ высокого онкогенного риска, определять типы ВПЧ.

Литература

1. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms / H.U. Bernard [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 1994. — Vol. 170, № 5. — P. 1077–1085.
2. Рекомендации по диагностике и лечению папилломавирусных инфекций женского генитального тракта. Официальная публикация Европейского Общества по инфекционным заболеваниям в акушерстве и гинекологии // *Eur. J. Inr. Immunol. Diseases in Obstetrics and Gynaecology.* — 2001. — Vol. 4, suppl. 21. — P. 5.
3. Classification of papillomaviruses / E.M. de Villiers [et al.] // *Virology.* — 2004. — Vol. 324, № 1. — P. 17–27.
4. Genetic variability and phylogeny of high risk HPV type 16, 18, 31, 33 and 45 L1 gene in Greek Women / С.К. Ntova [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* — 2012. — Vol. 13, № 1. — P. 1–17.
5. Мавров, Г.И. Половое инфицирование вирусом папилломы человека — от бессимптомного носительства до злокачественных опухолей / Г.И. Мавров // *Журн. дерматологии и венерологии (МЗ Украины).* — 1998. — № 6. — С. 14–17.
6. Папилломавирусная инфекция. Клиника, диагностика, лечение: пособие для врачей / В.А. Молочков [и др.]; под общ. ред. В.А. Молочкова. — М.: Русский врач, 2004. — 44 с.
7. Шипулина, О. Сравнительная оценка эффективности выявления ДНК ВПЧ с помощью теста HPV Hybrid Capture II (DIGENE) и полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с типоспецифическими праймерами в варианте «Мультиплекс — ПЦР» / О. Шипулина, Е. Гладышева, Д. Куевда // *Генодиагностика инфекционных заболеваний: сб. тез. 4-й Всерос. науч.-практ. конф.* — М., 2002. — С. 93–97.
8. Carr, J Human papillomavirus. Epidemiology, transmission, and pathogenesis / J. Carr, T. Gyorfi // *Clin. Lab. Med.* — 2000. — Vol. 20, № 2. — P. 235–255.

HIGH-RISK HUMAN PAPILLOMA VIRUS GENOTYPING

Eremin V.F., Gasich E.L., Sasinovich S.V.

*State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus*

The data on high-risk human papillomavirus (HPV) typing, diagnosed in women of reproductive age are presented in the paper. Sequencing of more than 100 samples and subsequent phylogenetic analysis of the L1 gene sections, E6 / E7 of HPV-16, 18, 45, revealed that mainly variants of HPV-16, 18, 45, listed the countries of the south east Asia are circulated in the territory of the Republic of Belarus. At the same time, we have shown that “old” local versions of oncogenic HPV, as well as viruses from the African continent

are circulated in the country and this must be considered when choosing and evaluating the effectiveness of vaccines immunity. A new variant of the HPV-16 type is first described.

Keywords: sequencing, phylogenetic analysis, options for oncogenic HPV.

Поступила 25.08.2016

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЖИЗНИ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

Красавцев Е.Л., Свенцицкая А.Л.

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

Реферат. Проведена оценка качества жизни у 50 пациентов с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС), у 30 пациентов с циррозом печени и 30 практически здоровых людей с помощью адаптированного русифицированного специализированного опросника «SF-36v2TM Health Status Survey». Показатели 7 из 8 шкал опросника у пациентов с ХВГС оказались статистически значимо снижены по сравнению с показателями качества жизни группы практически здоровых людей. Показатель физической активности у пациентов с циррозом печени был ниже, а показатель социальной активности выше, чем у пациентов с ХВГС. У женщин наиболее снижены показатели ролевого и эмоционального функционирования. У мужчин, в свою очередь, снижена физическая активность. Опросник «SF-36v2TM Health Status Survey» оказался высокочувствительным инструментом для анализа снижения качества жизни у пациентов, страдающих ХВГС, и позволил количественно оценить различные его компоненты по 8 шкалам.

Ключевые слова: гепатит С, цирроз печени, качество жизни.

Введение. Хронический вирусный гепатит С является одной из актуальных проблем современного здравоохранения в связи с широкой распространенностью, высокой частотой формирования цирроза печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциномы. Ранняя инвалидность и высокая смертность данной категории пациентов свидетельствуют о его медицинском и социальном значении [1].

Согласно последним данным, основанным на скрининговых исследованиях, которые проводились в различных странах, около 200 млн пациентов страдают от ХВГС, а количество инфицированных вирусом гепатита С (HCV) достигает 500 млн человек [1].

Общепринято в качестве критериев тяжести течения заболеваний и эффективности лечения пациентов использовать данные клинического и параклинического исследования. В современной медицине понятие «качество жизни» (КЖ) логически связано с известным определением здоровья Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и трактуется как «качество жизни, связанное со здоровьем». Сам термин «качество жизни» ВОЗ определяет как «восприятие индивидами их положения в контексте культуры и систем ценностей, в которых они живут, в соответствии с их собственными целями, ожиданиями, стандартами и заботами» [2].

Хроническая патология печени осложняется печеночной энцефалопатией, которая проявляется нервно-психическими отклонениями, утяжеляющими течение основного заболевания. В связи с этим восстановление физического, психического и социального статуса пациентов хроническими заболеваниями печени и улучшение их качества жизни приобретает медико-социальное значение.

Изучение КЖ у пациентов с ХВГС позволяет оценивать результативность конкретного вида лечения не только с позиций врача, но и с позиций пациента, что принципиально важно, т. к. их взгляды часто не совпадают. Повышение показателей КЖ является стратегической задачей лечения пациентов с ХВГС.

Одним из широко используемых общих опросников является краткая форма Medical Outcomes Study Short Form (SF-36), разработанная J.E. Ware с соавт. в 1988 г. [3].

Опросник был нормирован для общей популяции США и репрезентативных выборок в Австралии, Франции, Италии. В США и странах Европы были проведены исследования отдельных популяций и получены результаты по нормам для здорового населения и для групп пациентов с различными хроническими заболеваниями (с выделением групп по полу и возрасту) [4].

Опросник «SF-36 health status survey» состоит из 11 разделов, результаты представляются в виде оценок в баллах по 8 шкалам, составленным таким образом, что более высокая оценка указывает на лучшее КЖ. Показатели каждой шкалы варьируют между 0 и 100 баллами, где 100 представляет полное здоровье, все шкалы формируют два показателя: душевное и физическое благополучие [5].

Исследование КЖ в соответствии с требованиями научного управления клинической практикой является обязательным этапом любого клинического исследования, основанного на принципах доказательной медицины [5].

Цель работы — оценка качества жизни пациентов, страдающих ХВГС, с помощью опросника Medical Outcomes Study Short Form (SF-36); сравнение полученных результатов исследования с группой пациентов с ЦП и группой практически здоровых людей.

Материалы и методы. В исследовании приняло участие 110 человек в возрасте от 16 до 84 лет. Основную группу составили 50 пациентов, страдающих ХВГС, средний возраст которых составил $48,7 \pm 2,4$ года. В группы сравнения вошли 30 пациентов с ЦП (средний возраст — $51,6 \pm 1,9$ года) и 30 практически здоровых людей (средний возраст — $47,8 \pm 1,6$ года). Критериями исключения из группы здоровых людей стали наличие хронической патологии и новообразований в анамнезе. Различий паспортного возраста между исследуемыми группами не было. В группе пациентов с ХВГС регистрировалась сопутствующая патология: хронический гломерулонефрит, нефротическая форма у 1 мужчины (3,2%); ИБС: сердечнососудистая недостаточность, функциональный класс 2 стенокардии у 1 мужчины (3,2%); хронический холецистит у 1 женщины (3,2%).

Диагноз «ХВГС» устанавливали на основании клинико-эпидемиологических, биохимических (повышение активности трансаминаз, повышение содержания билирубина в сыворотке крови), серологических (HCV Ab), вирусологических (определение РНК HCV) и сонографических (увеличение размеров печени, диффузные изменения в структуре печени) методов исследования. Диагноз «ЦП» устанавливали на основе клинической картины декомпенсации, а также инструментальных (ультразвуковое исследование печени) данных. У всех пациентов отсутствовали в крови маркеры гепатитов А, В и D. Были также исключены другие диффузные заболевания печени.

Длительность заболевания у исследуемых пациентов с ХГС составляла от 1 года до 19 лет (средняя длительность — $2,8 \pm 0,8$ года).

Качество жизни исследовалось с помощью адаптированного русифицированного специализированного опросника «SF-36v2TM Health Status Survey». Статистическую обработку полученных результатов производили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, USA).

Результаты и их обсуждение. Семь из 8 показателей шкалы «SF-36v2TM Health Status Survey» основной группы оказались снижены ($p < 0,01$) по сравнению с показателями КЖ группы практически здоровых людей (кроме показателя социального функционирования (Social Functioning, SF)) (таблица 1).

Таблица 1. — Качество жизни у пациентов, страдающих ХВГС, ЦП, и практически здоровых людей

№ п/п	Показатели шкалы SF-36	Основная группа, n = 50, баллы	Пациенты с ЦП, n = 30, баллы	Практически здоровые люди, n = 30, баллы
1	GH — Общее восприятие здоровья	$50,2 \pm 2,9^*$	$45,4 \pm 2,2$	$61,9 \pm 2,4$
2	PF — Физическая активность	$67,3 \pm 4,6^*$	$53,3 \pm 3,2^{**}$	$84,1 \pm 2,3$
3	RP — Роль физических проблем в ограничении жизнедеятельности	$38,8 \pm 6,9^*$	$39,6 \pm 6,3$	$67,7 \pm 2,5$

Окончание таблицы 1

№ п/п	Показатели шкалы SF-36	Основная группа, n = 50, баллы	Пациенты с ЦП, n = 30, баллы	Практически здоровые люди, n = 30, баллы
4	RE — Роль эмоциональных проблем в ограничении жизнедеятельности	39,6±6,9*	45,1±6,9	64,8±3,0
5	SF — Социальная активность	40,6±2,2	49,8±1,6**	44,4±1,3
6	BP — Физическая боль	62,7±3,9*	65,6±3,4	74,6±2,0
7	VT — Жизнеспособность	48,8±4,0*	57,9±2,8	76,5±1,2
8	MH — Психическое здоровье	55,5±3,7*	57,6±2,7	78,3±2,0
Примечания: 1 — * — p<0,01 (по сравнению с группой практически здоровых людей). 2 — ** — p<0,05 (по сравнению с основной группой).				

Самым низким показателем КЖ основной группы стало влияние физического состояния на ролевое функционирование (Role-Physical, RP), в баллах — 38,8±6,9, по сравнению с группой практически здоровых людей (p = 0,0006).

Наиболее высоким показателем КЖ основной группы оказалось физическое функционирование (Physical Functioning, PF), отражающее степень, в которой здоровье лимитирует выполнение физических нагрузок — 67,3±4,6 балла; данный показатель достигает своей максимальной отметки и в группы здоровых людей (84,1±2,3 балла).

Были выявлены различия между показателями основной группы пациентов и пациентами с ЦП. Так, показатель PF у пациентов с ЦП ниже — 53,3±3,2 балла (p = 0,015), чем в основной (67,3±4,6 балла) группе, а показатель SF был выше (p = 0,001), чем у пациентов с ХВГС (40,6±2,2 балла), и составил 49,8±1,6 балла. Остальные показатели шкалы «SF-36v2™ Health Status Survey» у пациентов с ЦП по сравнению с соответствующими показателями у пациентов с ХВГС статистически не отличались.

При сравнении показателей мужчин и женщин основной группы по многим шкалам опросника были выявлены различия, в других группах таких различий не наблюдалось. Так, у женщин RP (ролевое функционирование) и RE (эмоциональное функционирование) ниже более чем в 2 раза, чем у мужчин, и составляет 24,0±7,4 и 23,1±5,2 балла соответственно (таблица 2). Самым низким показателем КЖ у мужчин стала социальная активность (SF) — 46,0±1,0 балл. Наиболее высоким показателем КЖ у женщин оказалась физическая активность (PF) — 77,1±5,4 балла. У мужчин, в свою очередь, снижена физическая активность по сравнению с женщинами и составляет 54,4±5,3 балла. Вероятно, на данный показатель могут влиять вредные привычки (курение и употребление алкоголя), которые наиболее распространены у мужской группы населения.

Таблица 2. — Качество жизни у пациентов, страдающих ХВГС различного пола

№ п/п	Показатели шкалы SF-36	ХВГС (у женщин), n = 28, баллы	ХВГС (у мужчин), n = 22, баллы
1	GH — Общее восприятие здоровья	45,7±4,0**	55,5±3,1
2	PF — Физическая активность	77,1±5,4*	54,4±5,3
3	RP — Роль физических проблем в ограничении жизнедеятельности	24,0±7,4*	53,0±9,1
4	RE — Роль эмоциональных проблем в ограничении жизнедеятельности	23,1±5,2**	56,5±6,9

Окончание таблицы 2

№ п/п	Показатели шкалы SF-36	ХВГС (у женщин), n = 28, баллы	ХВГС (у мужчин), n = 22, баллы
5	SF — Социальная активность	34,5±3,2**	46,0±1,0
6	BP — Физическая боль	54,2±4,2*	71,0±5,1
7	VT — Жизнеспособность	39,4±4,4**	58,1±4,8
8	MN — Психическое здоровье	48,8±4,1**	61,9±4,2
Примечания: 1 — * — p<0,05. 2 — ** — p<0,01 (по сравнению с мужчинами).			

Заключение. Качество жизни у пациентов с ХВГС было существенно снижено в большинстве случаев по шкалам опросника SF-36. У данной группы обследованных резко уменьшаются физическая и социальная активность, падает эмоциональный статус, значительно снижаются субъективные оценки эмоционального состояния, настроения и в целом общего состояния здоровья. У женщин наиболее снижены показатели ролевого и эмоционального функционирования. Эмоциональная сфера личности всегда являлась предметом пристального внимания психологов. В ситуации угрозы, опасности, обиды происходят изменения в этой сфере личности, что является предпосылкой развития стрессовых реакций, влекущих за собой тревожность, невротичность, депрессию [6]. У мужчин, в свою очередь, снижена физическая активность. Показатель физической активности у пациентов с ЦП ниже, а показатель социальной активности был выше, чем у пациентов с ХВГС.

Опросник «SF-36v2TM Health Status Survey» оказался высокочувствительным инструментом для анализа снижения качества жизни у пациентов, страдающих ХВГС, и позволил количественно оценить различные его компоненты по 8 шкалам.

Литература

1. Хронический вирусный гепатит: прошлое, настоящее и будущее / В.В. Нечаев [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2013. — № 3. — С. 4–8.
2. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. — 2015. — Режим доступа: <http://apps.who.int>. — Дата доступа: 13.10.2015.
3. Ware, J.E. SF-36 Physical and Mental Health Summary Scales: A User's Manual / J.E. Ware, M. Kosinski, S.D. Keller / The Health Institute, New England Medical Center. — Boston: Mass., 1994. — 8 pp.
4. Бримкулов, Н.Н. Применение опросника SF-36 для оценки качества жизни / Н.Н. Бримкулов, Н.Ю. Сенкевич, А.Д. Калиева // Центр.-азиат. мед. журн. — 1998. — № 4–5. — С. 236–241.
5. Новик, А.А. Руководство по исследованию качества жизни в медицине / А.А. Новик, Т.И. Ионова. — СПб.: Изд. дом «Нева»; М.: «ОЛМА-ПРЕСС» Звездный мир, 2002. — 320 с.
6. Ковалев, Ю.В. Депрессия, клинический аспект / Ю.В. Ковалев, О.Н. Золотухина. — М.: Мед. книга, 2001. — 144 с.

ASSESSMENT OF THE QUALITY OF LIFE OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

Krasavtsev E. L., Sventitskay A. L.

Educational Institution "Gomel State Medical University", Gomel, Republic of Belarus

The quality of life in 50 patients with chronic hepatitis C, 30 patients with liver cirrhosis and 30 healthy people was evaluated using the adapted multi-language specialized questionnaire "SF-36v2TM Health Status Survey". Indicators 7 of the 8 scales of the questionnaire in patients with chronic hepatitis C were significantly reduced in comparison with the quality of life of healthy people group (except for decreased social functioning). The rate of physical activity in patients with liver cirrhosis was lower, and the indicator of social activity is higher than in patients with chronic viral hepatitis C. In women, the most reduced indicators were the role and emotional functioning. In men, in turn, physical activity was reduced. The questionnaire "SF-36v2TM Health Status Survey" turned out to be a highly sensitive tool for the analysis of the impact on quality of life in patients suffering from chronic HCV.

Keywords: chronic viral hepatitis C, liver cirrhosis, the quality of life.

Поступила 08.08.2016

АНАЛИЗ СЛУЧАЕВ ЗАБОЛЕВАНИЯ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ И МЕТАПНЕВМОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ СРЕДИ ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

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

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

Реферат. Проанализированы случаи заболевания респираторно-синцициальной и метапневмовирусной инфекцией в Республике Беларусь за эпидемические сезоны 2012–2013, 2013–2014 и 2014–2015 гг. среди детей, госпитализированных в стационары страны. Для выявления генетического материала респираторно-синцициального и метапневмовирусов использовался метод полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. За три эпидемических сезона было исследовано 1522 назофарингеальных мазка. РНК респираторно-синцициального вируса была обнаружена в 148 из них (9,7%), РНК метапневмовируса — в 39 (2,6%). Наибольшее количество положительных образцов получено от детей первых четырех лет жизни (94% от общего числа положительных образцов для РС-инфекции и 90% — для метапневмовирусной).

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

Введение. Респираторно-синцициальный вирус (далее — РС-вирус) и метапневмовирус (далее — МПВ) относятся к семейству *Paramyxoviridae*, подсемейству *Pneumovirinae*. РС — вирус, впервые выделенный в 1956 г., является одной из основных причин развития острых респираторных вирусных инфекций (далее — ОРВИ) у новорожденных и детей раннего возраста как на территории Республики Беларусь, так и во всем мире [1–3]. МПВ, выделенный относительно недавно — в 2001 г. — и по клиническим проявлениям мало отличающийся от РС-вируса, также является причиной развития тяжелых бронхолитов и пневмоний у детей первых 5 лет жизни [4]. Хотя число случаев метапневмовирусной инфекции среди госпитализированных детей ниже по сравнению с числом случаев, вызванных РС-вирусом, оба вируса вносят существенный вклад в детскую структуру заболеваемости ОРВИ [5–7]. Особенно подвержены риску возникновения заболевания, вызванного данными вирусами, дети первого года жизни [7], недоношенные дети и дети с сопутствующей патологией (бронхолегочной дисплазией, хроническими заболеваниями легких, врожденными пороками сердца) [8, 9].

Цель работы — анализ случаев заболевания, вызванных респираторно-синцициальным и метапневмовирусом, в Республике Беларусь в эпидемические сезоны 2012–2013, 2013–2014 и 2014–2015 гг.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили назофарингеальные мазки, полученные от госпитализированных в дозорные учреждения страны детей в возрасте от 0 до 17 лет с симптомами ОРВИ на протяжении эпидемических сезонов 2012–2013, 2013–2014 и 2014–2015 гг. (с 40 по 20-ю календарные недели).

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

Результаты и их обсуждение. За три эпидемических сезона с 2012 по 2015 гг. было исследовано 1522 образца, полученных от детей в возрасте от 0 до 17 лет с симптомами ОРВИ. Так, в эпидемический сезон 2012–2013 гг. было исследовано 540 образцов, в сезоны 2013–2014 гг. и 2014–2015 гг. — 574 и 408 соответственно (таблица).

Таблица — Результаты исследования назофарингеальных мазков, полученных от детей с симптомами ОРВИ

Эпидемический сезон, годы	Количество исследованных образцов	Число образцов положительных на МПВ, %	Число образцов положительных на РС, %
2012–2013	540	18 (3,3%)	44 (8,1%)
2013–2014	574	4 (0,7%)	85 (14,8%)
2014–2015	408	17 (4,2%)	19 (4,7%)
Итого	1522	39 (2,6%)	148 (9,7%)

Как видно из таблицы, генетический материал МПВ был выявлен в 18 образцах (частота выявления — 3,3%) в 2012–2013 гг., в 4 образцах (0,7%) в 2013–2014 гг. и в 17 образцах (4,2%) в 2014–2015 гг.

РНК РС-вируса была обнаружена в 44 образцах (8,1%) в 2012–2013 гг., в 85 образцах (14,8%) в 2013–2014 гг. и в 19 образцах (4,7%) в 2014–2015 гг.

Чаще всего метапневмовирусная инфекция встречалась среди детей от 1 до 4 лет (82%); в то время как значительный вклад в возрастную структуру заболеваемости РС-инфекцией внесли дети первого года жизни (30%) (рисунки 1,2).

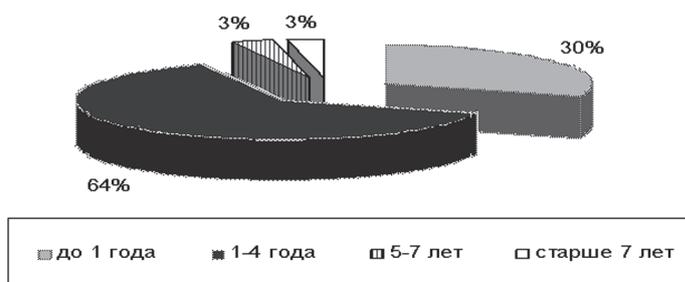


Рисунок 1. — Возрастная структура заболеваемости РС-инфекцией с 2012 по 2015 гг.

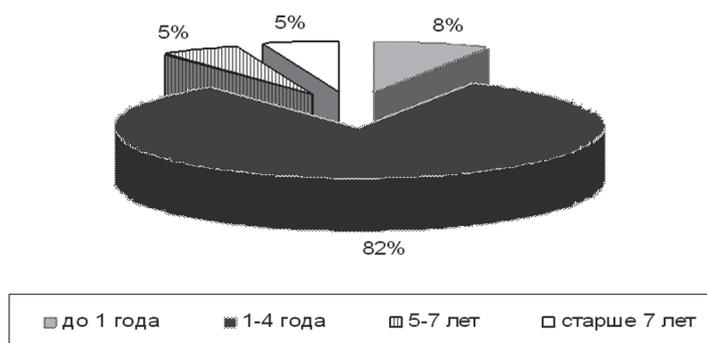


Рисунок 2. — Возрастная структура заболеваемости МПВ-инфекцией с 2012 по 2015 гг.

В течение анализируемых сезонов наиболее активно оба вируса циркулировали в зимние месяцы, однако спорадические случаи регистрировались и в осенне-весенний периоды (рисунки 3–5).

В течение эпидемического сезона 2012–2013 гг. число случаев РС-инфекции значительно преобладало над числом случаев МПВ-инфекции. Однако следует отметить, что в первой половине сезона наблюдалась одновременная циркуляция данных вирусов, тогда как начиная с 3-й календарной недели 2013 г. в циркуляции стал преобладать РС-вирус, постепенно вытеснивший МПВ, последние случаи которого были зарегистрированы на 5-й календарной неделе (рисунок 3).

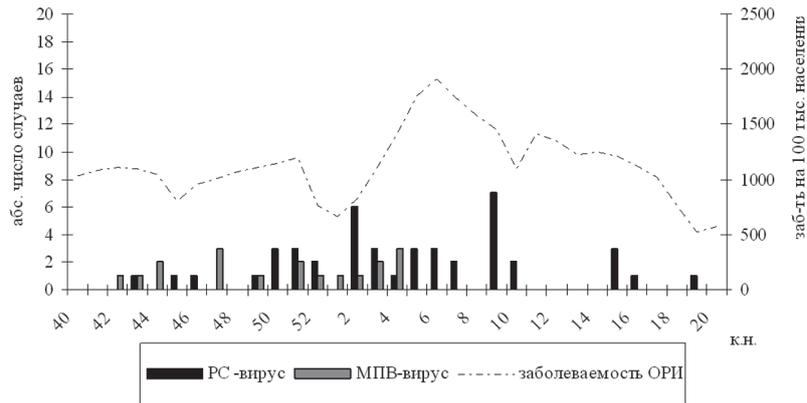


Рисунок 3. — Динамика выявления вирусов РС и МПВ в эпидемический сезон 2012–2013 гг.

Особенностью эпидемического сезона 2013–2014 гг. явилось то, что на протяжении всего сезона циркулировал преимущественно РС-вирус, МПВ встречался в единичных случаях (рисунок 4).

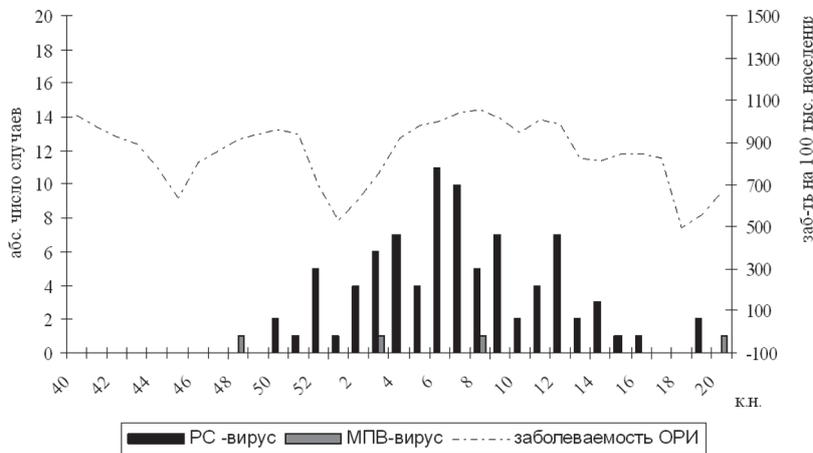


Рисунок 4. — Динамика выявления вирусов РС и МПВ в эпидемический сезон 2013–2014 гг.

Картина, отличающаяся от предыдущих двух сезонов, наблюдалась в эпидемическом сезоне 2014–2015 гг. Так, в начале сезона увеличилось число случаев МПВ-инфекции, а случаи заболевания РС-вирусом не регистрировались, а в его завершении (начиная с 11-й календарной недели) — активно циркулировал РС-вирус (рисунок 5).

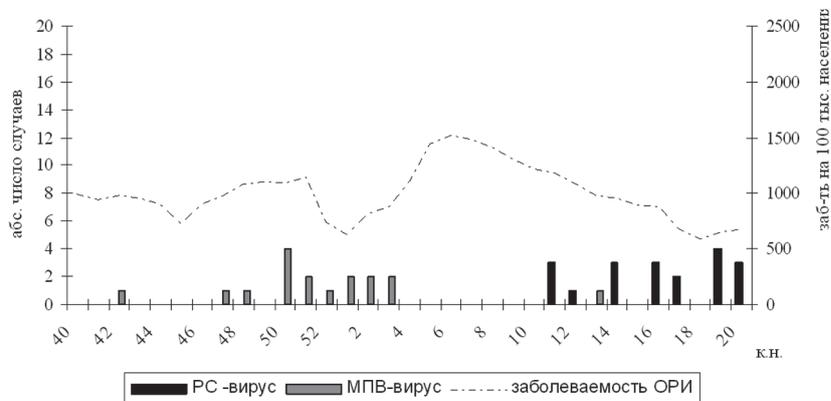


Рисунок 5. — Динамика выявления вирусов РС и МПВ в эпидемический сезон 2014–2015 гг.

В течение исследуемого периода РС-вирус и МПВ циркулировали на всей территории Республики Беларусь. Наибольшее количество положительных образцов было выявлено в г. Минске: 32,5% от общего числа положительных образцов принадлежит РС-вирусу, 20,5% — МПВ. В Гродненской области процент положительных находок, напротив, был самым низким: 1,4% для РС-вируса, 2,6% — для МПВ (рисунок 6).

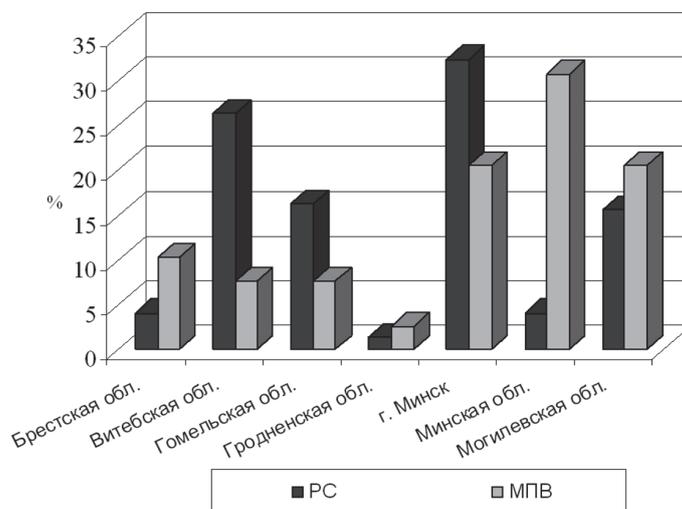


Рисунок 6. — Распределение случаев РС-инфекции и МПВ-инфекции на территории Республики Беларусь с 2012 по 2015 гг.

Заключение. В течение анализируемого периода с 2012 по 2015 гг. РС-вирус и МПВ, являющиеся представителями семейства *Paramyxoviridae*, активно циркулировали на всей территории Республики Беларусь. Наибольший вклад в возрастную структуру заболеваемости внесли дети в возрасте от 0 до 4 лет.

Отсутствие явных закономерностей в картине циркуляции исследуемых вирусов в течение трех сезонов, а также значительное увеличение числа случаев заболевания РС-инфекцией в 2012–2013 гг. по сравнению с предыдущим и последующим сезонами, говорят о наличии особенностей циркуляции вирусов, для установления которых требуется более длительный период наблюдения.

Литература

1. Сергиенко, Е.Н. Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция у детей / Е.Н. Сергиенко, И.Г. Германенко // Мед. журн. — 2010. — № 2. — С. 22–27.
2. Domachowske, J.B. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment / J.B. Domachowske, H.F. Rosenberg, // Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 12, № 2. — P. 298–309.
3. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza / J.A. Morris [et al.] // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1956. — Vol. 92, № 3. — P. 544–594.
4. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease / G. Bernadette [et al.] // Nat. Med. — 2001. — Vol. 7, № 6. — P. 719–724.
5. Human metapneumovirus infections in hospitalized children / G. Boivin [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 9, № 6. — P. 634–640.
6. Этиологический спектр возбудителей ОРВИ у детей Беларуси в 2010–2014 гг. / Н.П. Шмелева [и др.] // Здоровоохранение. — 2014. — № 10. — С. 69–71.
7. Грипп и респираторно-синцитиальная инфекция у детей в эпидемический сезон 2009–2010 гг. в Республике Беларусь / Е.Н. Сергиенко [и др.] // Мед. панорама. — 2011. — № 2. — С. 3–7.
8. Современные клинические особенности РС-инфекции у детей / Т.В. Лобанова [и др.] // Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики у детей: материалы VIII Конгр. дет. инфекционистов России, Москва, 16–18 дек. 2009 г. — М., 2009. — С. 76–77.
9. Аденовирусная и респираторно-синцитиальная инфекции: клинко-иммунологическая характеристика / Ю.А. Климова [и др.] // Актуальные вопросы инфекционной патологии: материалы Междунар. Евро-Азиат. конгр. по инфекц. болезням, Витебск, 5–6 июня 2008 г. / Под ред. В.М. Семенова. — Витебск, 2008. — С. 92–93.

ANALYSIS OF CASES OF RESPIROTARY-CYNCYTIAL AND METAPNEUMOVIRUS INFECTION AMONG CHILDREN IN BELARUS DURING EPIDEMIC SEASONS 2012–2013, 2013–2014 AND 2014–2015

Lapo T.P., Sivets N.V., Shmialiova N.P., Gribkova N.V., Sapotko V.S.
State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology",
Minsk, Republic of Belarus

Respiratory syncytial virus and human metapneumovirus are associated with lower respiratory tract infection in infants and young children. During three epidemic seasons Respiratory syncytial virus and metapneumovirus was identified by RT-PCR in 148 and 39 of 1522 specimens (9.7 and 2.6%) respectively obtained from hospitalized children from 7 regions of Belarus.

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

Поступила 01.09.2016

РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РЕГИОНА, КОДИРУЮЩЕГО РНК-ПОЛИМЕРАЗУ ВИРУСА КОКСАКИ В5

Поклонская Н.В.¹, Лозюк С.К.¹, Прядко А.К.², Амвросьева Т.В.¹

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

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

Реферат. Рекомбинация является важным фактором генетической изменчивости и эволюции энтеровирусов, поэтому целью исследований было изучение ее вклада в формирование генетической гетерогенности вирусов доминирующего в Беларуси серотипа Коксаки В5. На основании полученных результатов установлено, что из 8 геногрупп, идентифицированных по гену VP1, 4 также группировались по гену РНК-полимеразы, что подтверждает их идентификацию как отдельных геновариантов Коксаки В5. Изоляты, циркулировавшие после 2012 г. и входившие в состав отдельных геногрупп по гену VP1, не группировались по гену РНК-полимеразы с изолятами Коксаки В5, циркулировавшими в других странах, что позволяет предположить, что они являются новыми и возникли в результате рекомбинации с другими серотипами энтеровирусов, идентифицировать которые не удалось. Два зарегистрированных в 2006 г. на территории Минской и Витебской областей штамма Коксаки В5 образовались в результате рекомбинации во время их циркуляции на территории Беларуси. Полученные результаты свидетельствуют о том, что рекомбинация вносила существенный вклад в формирование генетической гетерогенности вирусов Коксаки В5, циркулирующих на территории Беларуси с 1999 по 2014 гг.

Ключевые слова: Коксаки В5, генетическое разнообразие, рекомбинация, Беларусь.

Введение. Рекомбинация является важным фактором генетической изменчивости и эволюции энтеровирусов. Как правило, ее механизм обусловлен сменой РНК-матрицы во время активного процесса репликации (согласно «сору-choice»-модели, предложенной Купером в 1974 г. [1]). В случае, когда РНК-полимераза при смене матрицы продолжает репликацию с того же сайта, рекомбинация называется гомологичной; если же с другого сайта, рекомбинация называется негомологичной (или гомологичной aberrантной, если новый сайт был относительно недалеко от предыдущего) [2]. При этом гомологичная рекомбинация может происходить внутри серотипов (т. н. интратипическая рекомбинация) либо между ними (интертипическая), однако никогда не происходит между различными видами [3].

Общая частота рекомбинации может существенно различаться у видов, серотипов и даже геновариантов энтеровирусов. Так, в результате исследований Теету Smuga с соавт. [4] было обнаружено, что у энтеровируса *CVA21* генотипа С в районах 5'UTR и VP1 не было рекомбинаций минимум 60 лет, в то время как у энтеровируса *CVA21* генотипа В появились две линии, каждая из которых частично соответствовала одной из двух предковых линий. По 5'UTR-участку эти две новые линии не совпадали ни с одной из известных. В целом виды *Human Enterovirus A* и *B* более склон-

ны к рекомбинации, в то время как у *Human Enterovirus D* частота рекомбинаций намного ниже. Вид *Human Enterovirus B* наиболее часто подвержен рекомбинации [3]. С учетом того, что доминирующие в Республике Беларусь серотипы энтеровирусов чаще всего относятся именно к этому виду, исследования рекомбинации как фактора, определяющего генетическую гетерогенность популяции энтеровирусов и их молекулярную эпидемиологию, представляется чрезвычайно важным.

Цель работы — изучение вклада рекомбинации в формирование генетической гетерогенности вирусов доминирующего в Беларуси серотипа Коксаки В 5 на основании секвенирования и последующего генетического анализа фрагмента гена РНК-полимеразы.

Материалы и методы. Для исследования были использованы изоляты энтеровирусов серотипа Коксаки В5 из коллекции ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии». Все изоляты были выделены на территории различных областей Республики Беларусь с 1998 по 2014 гг. Среди них были как изоляты, выделенные из клинического материала пациентов с ЭВИ, так и из сточной воды. Секвенирование проводили по фрагменту гена РНК-полимеразы с использованием праймеров, представленных в таблице 1.

Таблица 1. — Праймеры, использованные для амплификации и секвенирования гена РНК-полимеразы

Праймер	Последовательность, 5'-3'	Позиция в геноме ЭВ1
<i>HEVBS3C1</i> [5]	GAC GGT GGG CCG TGT TGC CAC GIC AYG CIA ARC CYG GRC	5466–5506
<i>HEVBR3D1</i> [5]	GCT ATG AGA TGT CCG TCA AGC ATI ACI GGI ATY TTR CTC C	6593–6554
Примечание — ¹ — позиции даны относительно генома ECHO 30, штамм Bastianni (AF311938).		

Всего проанализировано 24 изолята CVB5, принадлежащие к различным геногруппам, согласно ранее проведенному анализу гена VP1. В результате их секвенирования получены нуклеотидные последовательности, длина которых после редактирования составила 517 нуклеотидов.

Выделение РНК из образцов осуществляли с помощью коммерческого комплекта реагентов «Ампли-прайм РИБО-преп», обратную транскрипцию — с помощью коммерческого набора «Реверта L50» в соответствии с инструкциями производителя.

Накопление исследуемого фрагмента проводили в условиях, предложенных разработчиками праймеров [5].

Очистка из геля осуществляли с помощью коммерческого набора «QIAquick Gel Extraction Kit».

Секвенирование ДНК проводили методом терминации цепи с последующим анализом на ДНК-анализаторе CEQ8000.

Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в базе данных NCBI с помощью программы BLAST [6]. Компьютерный анализ последовательностей (множественное выравнивание, определение эволюционных расстояний, филогенетическую реконструкцию и определение достоверности ее топологии) проводили с помощью программы MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis), версии 6.0 [7].

Результаты и их обсуждение. Для подтверждения рекомбинантной природы исследуемого фрагмента РНК-полимеразы его сравнивали с прототипными штаммами CVB5 и ряда других серотипов энтеровирусов.

Полученные результаты (таблица 2) показали, что минимальная доля различий в нуклеотидных последовательностях большинства анализируемых белорусских изолятов наблюдалась при сравнении их не с тем или иным прототипным штаммом CVB5, а с прототипными штаммами других серотипов энтеровирусов. При этом доля различий всех белорусских изолятов с прототипными штаммами была достаточно велика и составляла 28–34%, тогда как максимальная доля различий по гену VP1 между современными штаммами энтеровирусов и прототипными штаммами того же серотипа составляет максимум 25%. Этот критерий используется для молекулярного типирования энтеровирусов [6]. Как известно, гены, кодирующие капсидные белки, подвержены генетическим изменениям в гораздо большей степени, чем гены неструктурных белков, которые являются гораздо более консервативными, т. к. они важнее для эффективной репликации вируса, и большая часть мута-

ций элиминируется вследствие негативного отбора. Таким образом, полученные значения различий в нуклеотидной последовательности анализируемых изолятов и прототипных штаммов наиболее вероятно можно объяснить не генетическим дрейфом, а рекомбинацией.

Таблица 2. — Доля различий в нуклеотидных последовательностях анализируемых изолятов Коксаки В5 при сравнении их с различными прототипными штаммами энтеровирусов

Рег. № изолята	Ближайший прототипный штамм	Доля различий в нуклеотидной последовательности, %
4052	ECHO27 Bacon	30,5
3168	CVB 1954/UK/85	31,2
13113	ECHO9 Barty	30,9
12766	ECHO30 Bastianni	31,1
12760	ECHO30 Bastianni	34,4
11124	ECHO27 Bacon	35,4
6683	ECHO27 Bacon	29,7
5817	ECHO27 Bacon	29,8
5675	ECHO27 Bacon	30,2
5674	ECHO30 Bastianni	34,9
5669	ECHO27 Bacon	29,8
5667	ECHO27 Bacon	28,6
5540	CVB5 Faulkner	32,7
5527	CVB5 Faulkner	29,6
5520	CVB5 Faulkner	29,4
5265	ECHO27 Bacon	31,3
4808	CVB5 Faulkner	31,6
4803	CVB5 Faulkner	31,4
4238	ECHO27 Bacon	30,1
4053	CVB5 Faulkner	31,4
	ECHO27 Bacon	31,8
371	CVB 1954/UK/85	32,7
	ECHO30 Bastianni	32,7
3656	ECHO30 Bastianni	34,3
	CVB 1954/UK/85	34,4
1841	CVB 1954/UK/85	32,7
	ECHO30 Bastianni	32,7

На следующем этапе исследований определяли группирование отдельных изолятов CVB5 на основании их нуклеотидного сходства по гену РНК-полимеразы. Рассчитаны доли нуклеотидных различий между отдельными изолятами, затем эти изоляты объединены в группы согласно обнаруживаемым различиям. Далее сравнивалось группирование изолятов по гену VP1 и фрагменту гена РНК-полимеразы.

Полученные результаты (таблица 3) показали, что по гену РНК-полимеразы исследуемые изоляты формировали 4 группы, 4 изолята не входили в состав ни одной из групп. Из таблицы 3 видно, что в целом изоляты группировались по гену РНК-полимеразы в соответствии с их геновариантом, определенным по основному капсидному белку. Изоляты, принадлежащие к одним и тем же группам, циркулировали в один и тот же период времени и, как правило, в одном и том же географическом регионе. Группа 1 включала изоляты, циркулировавшие в 2005 г. в г. Минске. Все они принадлежали к одному геноварианту 7 по капсидному региону генома. Группу 2 составили изоляты, цир-

кулировавшие в 2003–2004 гг. Они относились к одному и тому же геноварианту 3. Циркуляция данного геноварианта имела место в 2003–2004 гг. в Минской и Брестской областях. Интересно, что выделенный в 1998 г. изолят № 371, принадлежавший к другому геноварианту (8) и даже к другой генетической линии по капсидному региону, по гену полимеразы группировался в составе группы изолятов 2003–2004 гг. и имел с ними крайне незначительную долю различий.

Таблица 3. — Группы изолятов по степени сходства нуклеотидной последовательности гена РНК-полимеразы

№ группы	Изоляты	Максимальная доля нуклеотидных различий внутри группы	Геновариант по основному капсидному белку
1	4025, 4238, 4053	3,1	7
2	3168, 371, 3656, 1841	1,4	3,8
3	6683, 5817, 5675, 5669, 5667, 5265	3,6	1,2
4	5674, 5540, 5527, 5520, 4808, 4803	5,7	2,1
Вне групп	13113, 12766, 12760, 11124	37,1	-

Полученный результат позволяет предположить, что геновариант 1998 г., включающий изолят № 371, был предковым по отношению к геноварианту 2003–2004 гг. по гену полимеразы. Геновариант 2003–2004 гг. получил свой регион РНК-полимеразы от геноварианта 1998 г. в результате рекомбинации, а не генетического дрейфа, о чем свидетельствует значительная удаленность этих геновариантов друг от друга по капсидному региону генома.

Изоляты группы 3 и 4 циркулировали приблизительно в один временной отрезок — в 2006–2007 гг., но на разных территориях (группа 4 заняла северо-восточную часть Беларуси, группа 3 — юго-западную, в основном Брестскую область). При этом по гену VP1 они были весьма далеки друг от друга (принадлежали к различным геновариантам и генетическим линиям вируса). При сравнении группирования изолятов по регионам VP1 и РНК-полимеразы видно, что между этими двумя крупными геновариантами имела место неоднократная рекомбинация. В случае группы 3 по гену VP1 рекомбинантный изолят 5265 был единственным, выделенным в Минской области. В группе 4 по гену VP1 рекомбинантный изолят 5674 был выделен в Витебской области практически одновременно с нерекомбинантным изолятом 5675. При этом изолят 5674 оказался единственным (из рассмотренных) в своей группе по гену РНК-полимеразы, выделенным не в Брестской области.

Изоляты №№ 13113, 12766, 12760, 11124 не формировали групп по гену РНК-полимеразы. Интересно, что изолят 12760 по гену капсидного белка принадлежал к тому же геноварианту, что и изоляты, входящие в группу 3 (таблица 3). Однако он был получен значительно позднее (в 2014 г.), чем остальные изоляты. Очевидно, что данный геновариант является результатом последовательных эволюционных изменений по капсидному региону и рекомбинантным по гену РНК-полимеразы по отношению к изолятом группы 3, циркулировавшим в 2006–2007 гг. Изоляты 13113, 12766 и 11124 представляют отдельные геноварианты Коксаки В5 как по капсидному региону, так и по гену полимеразы.

Для дальнейшего анализа белорусских изолятов CVB5, выделения отдельных геновариантов и изучения их географического распространения была проведена филогенетическая реконструкция, в которую помимо исследуемых последовательностей были включены фрагменты нуклеотидных последовательностей Коксаки В5, циркулировавших в различное время на территории других стран и обладавших значительной степенью сходства с исследуемыми. Эти последовательности были получены из базы данных GenBank. Результатом филогенетической реконструкции стало древо, представленное на рисунке.

Из рисунка видно, что практически все исследуемые изоляты достоверно группируются в составе кластеров со штаммами CVB5, циркулировавшими в тот же или близкий период времени в

других странах мира. Это свидетельствует о том, что регион, кодирующий РНК-полимеразу, был получен в результате их рекомбинации до появления данных геновариантов на территории Беларуси. Так, геновариант 1, включающий штаммы, циркулировавшие на территории Витебской, Могилевской областей и г. Минска, достоверно группируется со штаммами CVB5, циркулировавшими в 2006 г. на территории Франции. Большинство изолятов, входящих в его состав, также образуют общий кластер по гену VP1. Такое группирование одновременно по двум удаленным регионам генома указывает на то, что эти изоляты действительно входят в состав одного геноварианта, который предположительно был занесен на территорию Беларуси из стран Европы. По региону РНК-полимеразы этот геновариант эволюционно наиболее близок к прототипному штамму ЕСНО 14 Tow. Данный факт позволяет предположить, что именно этот штамм являлся предковым по гену РНК-полимеразы.

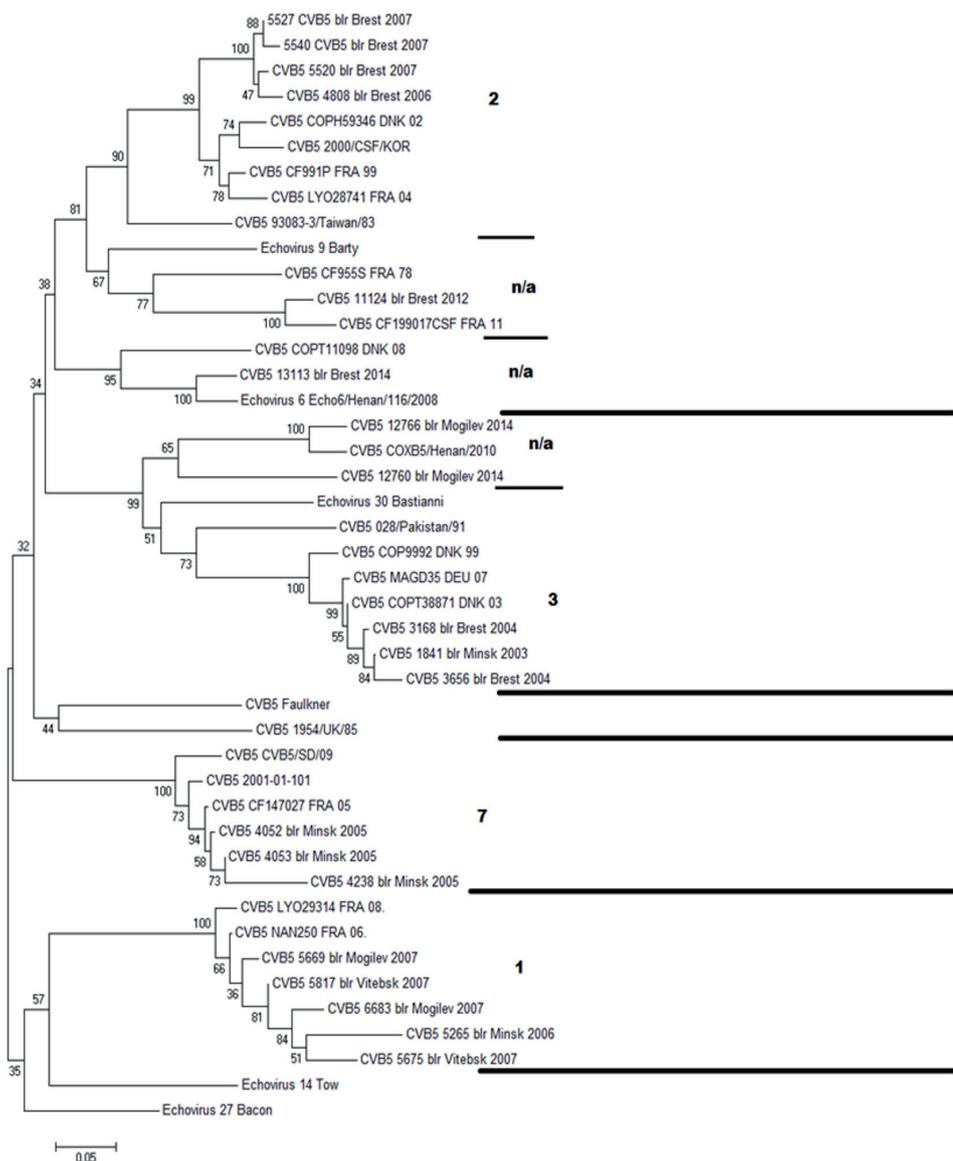
Геновариант 2 по гену РНК-полимеразы также формирует общий кластер, соответствующий кластеру по гену VP1. Он также включает помимо белорусских изолятов штаммы CVB5, выделенные на территории европейских стран и Кореи. Однако штаммы, входящие в этот кластер, были выделены в различное время — с 1999 по 2007 гг. Длительный период циркуляции привел к накоплению значительного количества мутаций и существенному эволюционному расхождению отдельных штаммов данного кластера от гипотетического общего предка. Вместе с тем из результатов филогенетического анализа видно, что геновариант 2 содержит в составе генома регион неструктурных белков, который был получен в результате рекомбинации до 1999 г. и задолго до его появления в Беларуси. На основании этого можно предположить, что прототипным для геноварианта 2 по региону неструктурных белков был штамм CVB5, циркулировавший в Тайване в 1983 г.

Отдельно следует отметить группирование белорусских изолятов 5265 и 5674. Первый из них, под номером 5265, очень четко группируется по региону РНК-полимеразы с геновариантом 1 и в то же время по региону VP1 — с геновариантом 2. Второй, под номером 5674, наоборот, по региону 3D группируется с геновариантом 2, а по VP1 — с геновариантом 1. С учетом того, что оба эти геноварианта циркулировали примерно в одно время на территории Беларуси (2006–2007 гг.), и данные изоляты выделены в тот же период, очевидно, что между этими двумя геновариантами неоднократно происходила рекомбинация, а изоляты 5265 и 5674 образовались в результате этой рекомбинации.

Геновариант 3 также совпадает по группированию в пределах гена VP1 и гена РНК-полимеразы 3D. Вирусы этого геноварианта также были выделены в одно и то же время в Беларуси и на территории стран Европы. Прототипным по региону РНК-полимеразы для данного геноварианта являлся штамм CVB5, циркулировавший на территории Дании в 1999 г.

Аналогичное группирование имело место для геноварианта 7: отдельные изоляты в его пределах группировались вместе по 2-м исследуемым регионам и с изолятами, выделенными в странах Европы. Прототипный штамм для геноварианта 7 по гену РНК-полимеразы найти не удалось.

Особого внимания заслуживают также изоляты 13113, 13114 и 13116. По региону VP1 они группируются в составе общего кластера вместе с вирусами, выделенными в Китае. По региону РНК-полимеразы нуклеотидная последовательность была получена только для изолята 13113, и на филогенетическом древе он группируется в составе общего кластера с вирусом ЕСНО 6, циркулировавшим в Китае. Можно предположить, что данный геновариант получил регион РНК-полимеразы в результате рекомбинации между вирусами Коксаки В5 и ЕСНО 6 при одновременной циркуляции на территории КНР. Однако для проверки этого предположения необходимы дополнительные исследования.



Цифрами отмечены группы, сохраняющие близкую структуру по отношению к аналогичным VP1-группам; изоляты, не образующие 3D-групп, аналогичных таковым для VP1, отмечены как «n/a»

Рисунок — Дендрограмма исследуемых серотипов по результатам анализа гена РНК-полимеразы

Заключение:

1. Рекомбинация по региону неструктурных белков, включающему ген РНК-полимеразы, вносит существенный вклад в формирование генетической гетерогенности вирусов Коксаки В5, циркулирующих на территории Беларуси. Все исследованные в представленной работе изоляты были рекомбинантами по отношению к прототипным штаммам Faulkner и CVB5 1954/UK/85.

2. Из 8 групп, идентифицированных по гену VP1, 4 имели общее группирование по гену РНК-полимеразы в составе кластеров вместе с вирусами, выделенными в других странах, что подтверждает их идентификацию как отдельных геновариантов Коксаки В5, возникших в результате рекомбинации до их появления на территории Беларуси.

3. Изоляты, циркулировавшие после 2012 г. и входившие в состав отдельных геногрупп по гену VP1, не группировались по гену РНК-полимеразы с изолятами Коксаки В5, циркулировавшими в других странах, что позволяет предположить, что они являются новыми и возникли в результате рекомбинации с другими серотипами энтеровирусов, идентифицировать которые не удалось.

4. Два зарегистрированных в 2006 г. на территории Минской и Витебской областей штамма Коксаки B5 — 5265 и 5674 — образовались в результате рекомбинации между описанными геновариантами 1 и 2 во время их циркуляции на территории Беларуси.

Литература

1. Cooper, P.D. Genetics of picornaviruses / P.D. Cooper // *Comprehensive Virology* / eds.: H. Fraenkel-Conrat, R.R. Wagner. — New York: Plenum Press, 1977. — Vol. 9. — P. 133–208.
2. Simmonds, P. Recombination and selection in the evolution of Picornaviruses and other mammalian positive-stranded RNA viruses / P. Simmonds // *J. Virol.* — 2006. — Vol. 80, № 22. — P. 11124–11140.
3. Simmonds, P. Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses / P. Simmonds, J. Welch // *J. Virol.* — 2006. — Vol. 80, № 1. — P. 483–493.
4. Recombination in the evolution of Enterovirus C species sub-group that contains types CVA-21, CVA-24, EV-C95, EV-C96 and EV-C99 / T. Smura [et al.] // *PLoS ONE.* — 2014. — Vol. 9, № 4. — e94579.
5. Emergence of echovirus 30 lineages is marked by serial genetic recombination events / A. Mirand [et al.] // *J. Gen. Virol.* — 2007. — Vol. 88. — P. 166–176.
6. Basic local alignment search tool / S. Altschul [et al.] // *J. Mol. Biol.* — 1990. — Vol. 215, № 3. — P. 403–410.
7. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // K. Tamura [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* — 2013. — Vol. 30, № 12. — P. 2725–2729.

GENETIC ANALYSIS OF COXSACKIEVIRUS B5 RNA-POLYMERASE GENE

Paklonskaya N.V.¹, Lozuk S.K.¹, Priadko A.K.², Amvrosieva T.V.¹

*¹State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus;*

²Educational Establishment “The Belarusian State University”, Minsk, Republic of Belarus

Recombination is important factor of genetic diversity and evolution of enterovirus, thence the aim of proposed study was to assess genetic recombination of Coxsackievirus B5 1999–2014 Belarusian isolates. Obtained data revealed four Coxsackievirus B5 groups of isolates gathered within capsid region and also within RNA polymerase gene, confirming their identity as separate genovariants. All belarusian isolates after 2012 grouped with foreign Coxsackievirus B5 isolates in capsid region but not in RNA-polymerase gene, showing that all of them obtained RNA-polymerase region due to recombination with other enterovirus serotypes. Two strains isolated in 2006 in Minsk and Vitebsk regions arose as a results of recombination between two circulating genovariants. The results suggest that recombination contributes significantly to the formation of the genetic diversity of Coxsackievirus B5.

Keywords: Coxsackievirus B5, genetic diversity, recombination, Belarus.

Поступила 08.08.2016

АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ КЛЕЩЕВЫХ ТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РОССИИ

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

*Федеральное бюджетное учреждение науки «Омский научно-исследовательский институт
природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, Омск, Российская Федерация*

Реферат. Территория России эндемична по целому ряду клещевых трансмиссивных инфекций вирусной и бактериальной (в т. ч. риккетсиальной) этиологии. Впервые охарактеризована многолетняя динамика заболеваемости клещевым энцефалитом за весь период наблюдения. Анализ эпидемиологической ситуации по восьми клещевым инфекциям показал территориальную неравномерность распределения заболеваний разными нозологическими формами, различную степень риска заражения, разную многолетнюю динамику, изменение границ эндемичных территорий, а также сочетанность природных очагов. Приведенные в статье данные содержат важную информацию для организации эпидемиологического надзора за клещевыми трансмиссивными инфекциями.

Ключевые слова: трансмиссивные клещевые инфекции, эпидемиология, мониторинг природных очагов, Российская Федерация.

Введение. Начало целенаправленного изучения очагов клещевого энцефалита и клещевого риккетсиоза (сибирского клещевого тифа) на Дальнем Востоке и в Сибири приходится на период 1937–1938 гг. За истекший период исследованы основные аспекты этиологии, эпидемиологии, природной очаговости, клиники, диагностики, профилактики клещевых трансмиссивных (англ. — tick-borne) инфекций. Многолетние данные наблюдения свидетельствуют, что их природные очаги проявляют стойкость, тенденцию к изменениям эпидемической активности и расширению нозоареалов. Вместе с тем в современный период проблема клещевых трансмиссивных инфекций приобрела еще большую актуальность в связи с выявлением новых патогенных микроорганизмов, экологически связанных с иксодовыми клещами [1].

Цель работы — характеристика современной динамики заболеваемости населения клещевыми трансмиссивными инфекциями в России, в т. ч. недавно выявленными, анализ их нозоареалов и основных эпидемиологических параметров, обоснование комплексных подходов к профилактике.

Материалы и методы. В основу работы положены результаты многолетних наблюдений за динамикой эпидемического процесса и основными параметрами восьми клещевых инфекций, изменениями в пространственной структуре нозоареалов этих инфекций на очаговых территориях России и анализ статистических данных по заболеваемости населения за весь период регистрации. Методами эпидемиологического анализа определено долевое значение отдельных географических регионов в распределении заболеваемости клещевыми инфекциями.

Результаты и их обсуждение. *Клещевой энцефалит (КЭ)* — одна из наиболее актуальных и широко распространенных природно-очаговых инфекций в Российской Федерации. Особенностью современной эпидемиологии КЭ является изменение границ и расширение нозоареала, изменение профессионально-социального состава заболевших этой инфекцией, изменение поражаемых контингентов, преобладание доли городских жителей.

Регистрация заболеваний населения КЭ в РФ осуществляется с 1939 г. Общее число официально зарегистрированных случаев этой инфекции в 1939–2015 гг. составило 237129. За последние 30 лет (1985–2015 гг.) в России учтено 148780 случаев заболеваний КЭ, что составляет 60,2% от общего их числа за 76 лет регистрации. К настоящему времени КЭ выявляется на территориях 51 субъекта РФ, в т. ч. на 20 административных территориях Сибири и Дальнего Востока.

В конце XX в. — начале XXI в. отмечается смещение эпидемиологических зон максимального реализованного риска заражения населения КЭ из традиционно известных в другие, ранее считавшиеся относительно благополучными районы. Пространственная структура нозоареала КЭ изменилась в пределах отдельных очаговых территорий в европейской части России, на Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке. Перечисленные изменения объясняются изменением ареала клещей-переносчиков, в частности ареала таежного клеща, что обусловлено действием целого ряда факторов природного и социального характера (вырубка лесов и другие виды природопользования, потепление климата, более частые выезды населения в леса для сбора дикоросов и других хозяйственных целей, развитие туризма).

Сказывается влияние и такого фактора, как снижение доли участия диких животных в кормлении имаго иксодовых клещей и возрастание значения домашних животных, что, в свою очередь, привело к расширению ареала клещей *I. persulcatus*, продвижению его в новые районы и к резкой активизации природных очагов на этих территориях.

В многолетней динамике заболеваемости КЭ в России выделяются два максимально выраженных периода подъема: 1952–1964 и 1989–2007 гг. [2], различие показателей достоверно — $p < 0,05$. Второй подъем является наиболее затяжным и характеризуется самыми высокими показателями в 1996 г., когда было учтено 10298 случаев КЭ (6,9 на 100 тыс. населения), и в 1999 г. — 9955 случаев (6,79 на 100 тыс. населения).

В 2000–2015 гг. показатель варьировал в пределах 1,3–4,38 (рисунок 1).

Территориальное распределение заболеваний КЭ в динамике в различные периоды отличается сменой долевого значения отдельных регионов России (таблица).

Если в 1948–1960 гг. существенная часть заболеваний КЭ, зарегистрированных в России, приходилась на Западную Сибирь (45,3%), на Урал — несколько меньшая часть (33,9%), а на Восточную Сибирь — только 6,3%, то в 1975–1978 гг. заметно повысилась и преобладала доля Урала, в то время как доля Западной Сибири снизилась в 2,3 раза [3]. В 1991–1994 гг. отмечалось снижение доли

Урала, возрастание значения Западной Сибири. В последующие периоды 1999–2000 и 2012–2015 гг. доля Урала еще более снизилась, но до 2000 г. сохранялась первенствующей, снизилась и доля Западной Сибири, в то время как эпидемиологическое значение Восточной Сибири повысилось в 4,6 раза и практически приравнялось к уровню Западной Сибири. Долевое значение Дальнего Востока на протяжении этого периода находилось в пределах 1,4–6,6%. В 2012–2015 гг. долевое значение Западной Сибири фактически сохранилось, а доля Дальнего Востока снизилась до 1,4%.

Показатели заболеваемости по регионам также варьировали в различные периоды с тенденцией к повышению до 2006 г. В Уральском регионе в 1975–1978 гг. наиболее высокие показатели заболеваемости КЭ регистрировались в Удмуртии (16,6–22,46) и Пермской области (11,3–18,0). На этих же территориях к 1999–2000 гг. показатели повысились более чем в 3,0–3,2 раза и достигли в Удмуртии — 52,9, а в Пермской области — 32,3.

В Западной Сибири самые высокие показатели заболеваемости КЭ отмечались в Томской области: в 1975–1978 гг. — 5,9–10,0, в 1999–2000 гг. — 41,1–64,2, т. е. произошло возрастание в 6,4–6,6 раза. Повышение показателей заболеваемости зарегистрировано также в Новосибирской области в 3,1–3,3 раза. Осложнение эпидемической ситуации произошло и в Республике Алтай, Тюменской и Кемеровской областях.

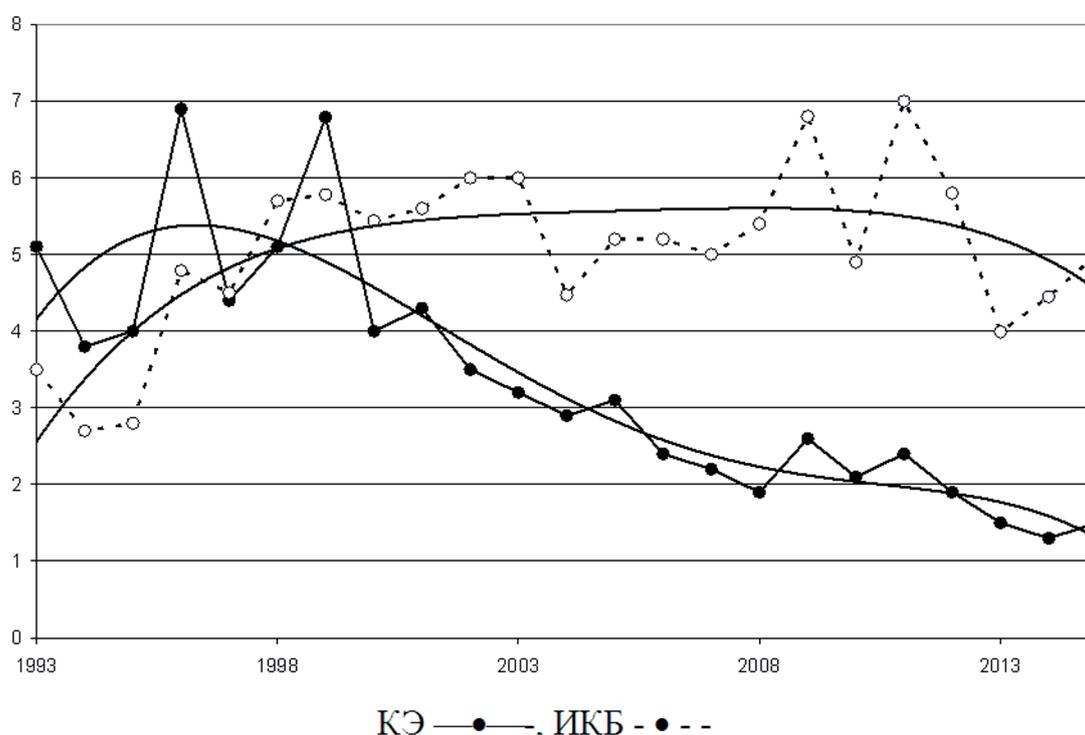


Рисунок 1. — Динамика заболеваемости КЭ и иксодовым клещевым боррелиозом на 100 тыс. населения в Российской Федерации в 1993–2015 гг. и линии полиномиальных трендов

Таблица — Эпидемиологическое значение отдельных регионов России в заболеваемости клещевым энцефалитом в России в различные периоды (в процентах)

Регионы	1948–1960 гг.	1975–1978 гг.	1991–1994 гг.	199–2000 гг.	2012–2015 гг.
Урал	33,9	44,4	39,3	36,0	23,7
Западная Сибирь	45,3	19,9	32,9	26,3	25,5
Восточная Сибирь	6,3	8,9	16,9	27,2	29,0
Дальний Восток	5,9	6,6	3,4	2,4	1,4
Доля Урала, Сибири и Дальнего Востока в заболеваемости по России	91,4	79,8	92,5	81,9	79,6

На территории Восточной Сибири максимальных значений показатели заболеваемости КЭ достигали в Красноярском крае — 25,2–52,8 в 1999–2000 гг., т. е. возросли за последние 25 лет в 8,4–11,0 раза.

Дальний Восток с начала 90-х годов в целом характеризуется повышением показателей заболеваемости по сравнению с уровнем 1975–1978 гг., в то время как в Хабаровском крае показатели снизились в 2,0–2,6 раза. В 2012–2015 гг. на всех территориях региона Дальнего Востока показатель заболеваемости не превышал 1,49.

На территории Западной Сибири в 2012–2015 гг. показатели заболеваемости в Томской области не превышали 14,9, в Республике Алтай — 13,9, а на других эндемичных территориях снизились до 4,0–6,0. Восточная Сибирь в 2012–2015 гг. характеризовалась снижением показателей до 2,6–18,2, а на Дальнем Востоке показатель не превышал 1,5.

На долю детей до 14 лет в 1991–2000 гг. приходилось 18,8–23,5%, в 2010–2015 гг. — 9,9–11,9%.

Особенностью современной эпидемиологической ситуации по КЭ является преобладание городских жителей в суммарной структуре: в 1991–1999 гг. горожане составляли 64,1–74,7%. В те же годы показатели заболеваемости КЭ сельских жителей несколько превышали таковые среди горожан. В последние годы (2010–2015 гг.) эта тенденция сохранилась.

Официальная регистрация не отражает действительной эпидемиологической ситуации по КЭ, как и по другим трансмиссивным клещевым инфекциям. Подавляющая часть заражений заканчивается субклиническим течением инфекции с развитием иммунного ответа: в среднем 1 клинический случай на 60 бессимптомных [4]. Кроме того, далеко не всегда верифицируют лихорадочные формы заболевания.

Это обстоятельство подчеркивает важность серологического мониторинга для оценки степени интенсивности эпидемического процесса КЭ, оценки иммунной прослойки, а также дифференциальной лабораторной диагностики клещевых трансмиссивных инфекций.

Спонтанная зараженность вирусом КЭ установлена у 16 видов иксодовых клещей. Из них только два вида являются его основными переносчиками и долговременными хранителями вируса *I. persulcatus* на большей части ареала инфекции и *I. ricinus* в западной части ареала.

Уровень вирусофорности клещей отличается значительной амплитудой колебаний, зависящей от ландшафтных особенностей природных очагов, их функциональной структуры и других биотических факторов. В 2010–2014 гг. инфицированность клещей вирусом КЭ составляла в среднем в РФ 7,7%, ИКБ — 22,5%. На отдельных территориях данный показатель превышал средние значения по стране и колебался в значительных интервалах. Так, инфицированность клещей возбудителем КЭ в Кемеровской, Кировской областях, Удмуртской Республике и Республике Бурятия составляла 15–20%. Инфицированность переносчиков боррелиями была максимальной и составляла 40–50% в Удмуртской Республике, Свердловской области, Красноярском и Приморском краях [5]. Эти параметры свидетельствуют об интенсивности эпизоотического процесса в природных очагах и с учетом различного населения переносчиков обуславливают региональную вариабельность сезонности заболеваний КЭ в пределах его нозоареала и продолжительность эпидемического сезона, который может составлять от 3 до 7 мес.

Эти региональные особенности следует учитывать в процессе эпидемиологического надзора, когда требуется дифференцированное знание времени риска заражения населения вирусом КЭ.

КЭ — единственная из клещевых трансмиссивных инфекций, в отношении которой используют средства специфической профилактики. В 2012–2013 гг. в РФ вакцинированы и ревакцинированы против КЭ 6538100 человек. Иммунная прослойка к вирусу КЭ за счет вакцинации и ревакцинации в течение трех лет (2011–2013 гг.) составила по РФ в среднем 6%. Наибольшие показатели иммунной прослойки достигнуты в Свердловской области — 45,1%, Республике Хакасия — 38,9%, Амурской — 27,3%, Курганской — 26,0% областях, в Пермском крае — 24,2% [6].

На основании оценки основных критериев эндемичности территорий разработаны принципы отнесения их к одной из эпидемиологических зон (высокого, среднего и низкого риска) по степени риска заражения населения [7].

Применительно к каждой из эпидемиологических зон рекомендуются определенный комплекс профилактических мероприятий, объем и состав которых может подвергаться корректировке, исходя из учета особенностей территорий. Относительно КЭ наиболее полный комплекс профилак-

тических мероприятий рекомендуется для территорий, отнесенных к эпидемиологической зоне высокого риска заражения.

Комплексность профилактики следует также понимать как ее направленность на предупреждение КЭ и других клещевых инфекций [8].

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ). Статистическая отчетность по ИКБ введена с 1992 г. В настоящее время ИКБ регистрируется в 73 субъектах РФ. Показатели заболеваемости ИКБ в 2011–2015 гг. составляли 3,99–7,02 (5715–9957 случаев).

Зоны высокого реализованного риска заражения населения ИКБ и КЭ в целом близки, хотя нозоареал ИКБ обширнее. Территориальное распределение заболеваний ИКБ в РФ неравномерное. В 2012–2015 гг. в общей сумме заболеваний ИКБ в РФ 30,7% приходилось на Центральный ФО, Сибирский составлял 19,5%, Приволжский — 16,5%, Северо-Западный — 15,1%, Уральский — 18,9%, Дальневосточный — 3,26%, Южный — 1,2%, Северо-Кавказский — 0,4%. С 2014 г. подаются сведения о регистрации ИКБ в Крымском ФО — 62 случая — 0,4%.

Основная часть заболеваний ИКБ отмечалась среди взрослого населения, а на долю детей до 14 лет приходилось лишь 7,3–9,7%. Как и при КЭ, преобладала заболеваемость среди городских жителей — 80,7–82,3%.

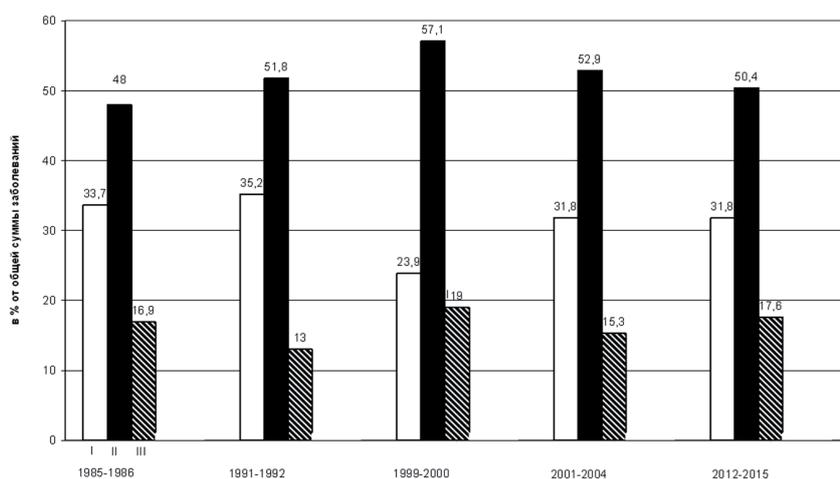
В последние годы выявлены новые виды боррелий, роль которых в патологии человека уточняется (*B. spielmanii*, *B. miyamotoi*). Основным вектором патогенных боррелий являются клещи *I. persulcatus* и *I. ricinus*, хотя имеются также данные об инфицированности клещей родов *Dermacentor* и *Haemaphysalis* и их возможной роли в циркуляции боррелий и передаче при присасывании клещей [9].

Сибирский клещевой тиф (СКТ) или *клещевой риккетсиоз (КР)* распространен на территории 17 субъектов РФ. Нозоареал СКТ в РФ со значительными эпидемиологическими проявлениями довольно обширен и охватывает южные районы Сибири, Приморье с его островной частью и Приморье. С 1979 г. в России зарегистрировано 71877 случаев СКТ. Постепенный рост заболеваемости СКТ отмечался с 0,2 в 1979 г. до 2,0 в 1999 г., т. е. в 10 раз, после чего максимальный за весь период показатель зарегистрирован в 2001 г. — 2,38 на 100 тыс. населения (3460 случаев). С 2002 г. по 2015 г. показатель снизился и варьировал в пределах 1,02–1,78 (от 1365 до 1797 случаев).

Параллельно происходило увеличение показателей заболеваемости СКТ в Западной Сибири — с 0,9 в 1979 г. до 10,3 в 2000 г., т. е. в 11,4 раза. Причем показатели в Западной Сибири в разные годы превышали среднефедеративные в 4–7 раз. В Западной Сибири СКТ регистрируется в Алтайском крае, Республике Алтай, Новосибирской, Кемеровской и Тюменской областях. В 2014 и 2015 гг. впервые были зарегистрированы 4 случая СКТ в Омской области (0,10). Основную заболеваемость СКТ в Западной Сибири в 2012–2015 гг. определяли Алтайский край. Новосибирская область и Республика Алтай — 98,0%. Показатели заболеваемости в Алтайском крае в этот период составляли 20,8–26,5; в Новосибирской области — 6,2–9,5; в Республике Алтай — 69,2–87,9.

В этот период произошло повышение показателей заболеваемости СКТ в Новосибирской области с 2,3 в 2000 г. до 9,56 в 2015 г. (от 63 до 260 случаев), тогда как в Алтайском крае и Республике Алтай они не превышали ранее зарегистрированные.

За последние 30 лет отмечается повышение на 11,7% долевого значения Западной Сибири в общем числе заболеваний СКТ в России: в 1985–1986 гг. — 59,4%, в 1999–2000 гг. — 62,5%, в 2012–2015 гг. — 60,7%, причем 46,9% приходилось на Алтайский край. К 2015 г. произошло восстановление доли заболеваний СКТ на горно-степных и степных очаговых территориях с доминированием клещей *D. nuttalli* до 31,8% (рисунок 2).



I — очаги с доминированием *D. nuttalli*; II — очаги с доминированием *D. marginatus*, *D. silvarum*, *D. reticulatus*; III — очаги с *D. silvarum* и *H. concinna*

Рисунок 2. — Долевое значение различных природных очагов СКТ в заболеваемости населения Сибири Дальнего Востока в 1985–2015 гг., %

К этим территориям относятся Республики Алтай: Хакасия, Тыва, Бурятия, Красноярский и Забайкальский края, Иркутская область.

На очаги с доминированием клещей *D. marginatus*, *D. silvarum* и *D. reticulatus* в 2012–2015 гг. приходилось 50,4%. Это объясняется повышением эпидемической активности указанных видов очагов СКТ, преимущественно в Алтайском крае и Новосибирской области.

Долевое значение очаговых территорий с переносчиками *D. silvarum* и *H. concinna* на Дальнем Востоке в 2000–2015 гг. оставалось стабильным — 17,6%. В этом регионе отмечается возрастание числа заболеваний СКТ в Хабаровском крае с 75 в 1985 г. до 166 в 2013 г. (рост в 2,2 раза). Показатели заболеваемости в 2012–2015 гг. в Хабаровском крае составляли 9,4–12,27; в Приморском — 3,59–9,45; в Еврейской АО — 9,33–11,81.

В отличие от КЭ при СКТ доля детей до 14 лет в последние годы в 2,2–2,5 раза была выше — 24,3–28,0%. Большую часть заболевших составляли жители сельской местности — 62,4–64,4%.

До недавнего времени считалось, что СКТ с возбудителем *R. sibirica* — единственный в РФ клещевой риккетсиоз. В последние годы в России выявлено еще 6 видов патогенных для человека риккетсий, экологически связанных с иксодовыми клещами — *R. conorii subsp. caspiensis*, *R. heilongjiangensis*, *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, *R. slovacica*, *R. raoultii* [10].

Учитывая это обстоятельство, следующей задачей является налаживание лабораторной диагностики клещевых риккетсиозов, этиологическими агентами которых служат перечисленные виды риккетсий, и включение заболеваний в статистическую отчетность.

В Северокавказском и Южном ФО регистрируются заболевания *Крымской-Конго геморрагической лихорадкой* (ККГЛ) — преимущественно в Ростовской области и Ставропольском крае. В 2012–2015 гг. учтено 384 случая ККГЛ, показатели составляли 0,05–0,1.

С 2013 г. приказом Росстата от 20.12.2012 № 645 утверждена статистическая отчетность по форме № 2 по *Астраханской пятнистой лихорадке* (АПЛ), *гранулоцитарному анаплазмозу человека* (ГАЧ) и *моноцитарному эрлихиозу человека* (МЭЧ). За 2013–2015 гг. выявлено 1007 случаев АПЛ в Южном ФО (Астраханская область и Республика Калмыкия), показатели — 0,22–0,28 на 100 тыс. населения. Дети до 14 лет составляли 16,2–20,6%; показатели — 0,2–0,36; сельские жители — 54,2–60,0%, показатели — 0,47–1,58.

В связи с вхождением Крыма в состав РФ необходимо хотя бы кратко остановиться на вопросах природной очаговости и эпидемиологии еще одного клещевого риккетсиоза — *марсельской лихорадки* (МЛ). Эта инфекция клинически была выявлена в Крыму в 30-х гг. XX в. В 1996–2002 гг. в Крыму зарегистрировано 411 случаев заболеваний МЛ [11]. Заболеваемость этой нозоформой еще не включена в форму 2 статистической отчетности. По данным литературы, в 2014–2015 гг. в Кры-

му зарегистрировано 28 случаев заболеваний МЛ, показатель — 0,5 [11]. Передача возбудителя МЛ осуществлялась в результате присасывания клещей *R. sanguineus*. Заболевания МЛ отмечались среди взрослого населения от 27 до 62 лет, с мая по ноябрь; из них 71,5 случая выявлены в июле и августе. Диагноз был поставлен на основании клинических симптомов средней тяжести [12].

Заболеваемость ГАЧ выявлена в Центральном, Приволжском, Уральском, Сибирском, Северо-Кавказском ФО: Пермский край, Тюменская, Тверская, Вологодская, Астраханская и другие области. За три года учтено 542 случая, показатели — 0,08–0,18. Дети до 14 лет составляли 7,8–16,2%, показатели — 0,04–0,18; сельские жители — 17,0–28,4%, показатели — 0,12–0,13. Выявлено 94 заболевания МЭЧ, преимущественно в Сибирском, Уральском, Приволжском, Северо-Западном округах — показатели 0,01–0,04.

Перечисленные клещевые трансмиссивные инфекции не существуют изолированно. Многолетние исследования позволили установить довольно распространенное и даже обычное явление сочетанности природных очагов клещевых инфекций в различных вариантах. Наиболее распространенными являются сочетанные очаги КЭ, ИКБ, ГАЧ, МЭЧ. Наличие общего переносчика вируса КЭ и боррелий — наиболее массового вида клещей *I. persulcatus* — обуславливает частое развитие микст-инфекций у людей.

Очевидно, особенно высокой полиадаптивностью отличаются клещи *H. concinna*. В Красноярском крае (Минусинский, Каратузский районы) на основании выявления зараженности клещей *H. concinna* вирусом КЭ, *B. afzelii*, *R. sibirica*, *R. heilongjiangensis* и *F. tularensis* доказано существование уникального сочетанного природного очага пяти трансмиссивных инфекций. Причем зараженность клещей *H. concinna* боррелиями генотипа *B. afzelii* установлена в мире впервые.

Наличие сочетанных природных очагов клещевых инфекций и выявление целого ряда новых клещевых патогенов требуют новых алгоритмов лабораторной верификации диагноза всего спектра клещевых инфекций человека с использованием ИФА и ПЦР-технологий с исследованием снятых с пациентов присосавшихся переносчиков и превентивной терапией заболеваний.

Заключение. Приведенные выше данные по эпидемиологии клещевых трансмиссивных инфекций свидетельствуют не только о различной степени эпидемической опасности регионов, но и об изменениях в распределении территорий риска, флюктуации очаговых территорий. В связи с этим территориальное распределение заболеваний КЭ в динамике в различные периоды отличалось некоторой сменой долевого эпидемиологического значения отдельных регионов России.

Сравнительная эпидемиология трансмиссивных клещевых инфекций позволяет выявить как общие, так и региональные особенности распространения их природных очагов, вариативность проявления активности и спектр этиологических агентов. В основе эпидемиологического надзора, диагностики и профилактики клещевых инфекций должен быть положен комплексный подход, включающий мониторинг паразитарных систем, слежение за интенсивностью эпидемического процесса, прогнозирование неблагоприятных тенденций, оптимизацию мер своевременной профилактики с учетом различной степени риска заражения населения.

При эпидемиологическом надзоре за трансмиссивными клещевыми инфекциями необходимо учитывать сочетанность природных очагов, применять современный алгоритм лабораторной диагностики с использованием экспресс-методов и практиковать дифференцированный подход к превентивной индивидуальной профилактике.

Литература

1. Злобин, В.И. Клещевые трансмиссивные инфекции / В.И. Злобин, Н.В. Рудаков, И.В. Малов. — Новосибирск: Наука, 2015. — 224 с.
2. Ястребов, В.К. Сравнительная эпидемиология / В.К. Ястребов. — Омск: Изд-е ОмГУ, 1998. — 56 с.
3. Ястребов, В.К. Современные нозоареалы клещевого энцефалита и клещевого риккетсиоза в Сибири / В.К. Ястребов // Бюл. сибир. медицины. — 2006. — № 5, прилож. 1. — С. 131–136.
4. Львов, Д.К. Энцефалиты, вызываемые вирусами рода *Flavivirus* / Д.К. Львов, В.И. Покровский // Руководство по зоонозам / Под ред. В.И. Покровского. — Л.: Медицина, 1983. — С. 80–83.
5. Мониторинг инфекций, переносимых клещами, на территории Российской Федерации / Е.В. Веригина [и др.] // Общие угрозы — совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: материалы междунар. конф., Москва, 23–24 июня 2015 г. / Под ред. А.Ю. Поповой, В.В. Кутырева. — М., 2015. — С. 72–75.

6. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологическом благополучии населения в Российской Федерации в 2013 году». — М., 2014. — С. 111–112.
7. Ястребов, В.К. Оптимизация системы эпидемиологического надзора и профилактики клещевого вирусного энцефалита / В.К. Ястребов, Т.Г. Хазова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2012. — № 1. — С. 19–24.
8. Львов, Д.К. Стратегия и тактика профилактики клещевого энцефалита на современном этапе / Д.К. Львов, В.И. Злобин // Вопр. вирусологии. — 2007. — № 5. — С. 26–30.
9. Рудакова, С.А. Молекулярно-генетические аспекты изучения ИКБ в Сибири / С.А. Рудакова // Инфекции, передаваемые клещами в Сибирском регионе. — Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011. — С. 214–228.
10. Риккетсии и риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки в Сибири / Н.В. Рудаков [и др.]. — Омск: Изд. центр «Омский научный вестник», 2012. — 288 с.
11. Горovenko, М.В. Актуальные трансмиссивные природно-очаговые инфекции Крыма / М.В. Горovenko, И.З. Каримов // Инфекция и иммунитет. — 2016. — Т. 6, № 1. — С. 25–32.
12. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекциям в Крымском федеральном округе / А.Ю. Попова [и др.] // Журн. микробиологии. — 2016. — № 2. — С. 62–69.

ACTUAL ASPECTS OF EPIDEMIOLOGY OF THE TICK-BORNE INFECTIONS IN RUSSIA

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

*Federal Budgetary Institution of Science "Omsk Research Institute of Natural Foci Infections"
of Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection & Human Welfare, Omsk, Russia*

Russia is endemic for a variety of viral and bacterial (including rickettsial) tick-borne infections. Long-term dynamics of the incidence of tick-borne encephalitis over the entire period of observation first described. An analysis of the epidemiological situation of 8 tick-borne infections revealed uneven territorial distribution of diseases, varying degrees of risk of infection, different longitudinal dynamics and alteration of the boundaries of endemic areas as well as combinations of natural foci. Our findings are important for the organization of epidemiological surveillance of tick-borne infections.

Keywords: transmissible tick-borne infections, epidemiology, monitoring natural foci, Russia.

Поступила 24.08.2016

АНАЛИЗ ЗАРАЖЕННОСТИ КРОВСОСУЩИХ КОМАРОВ И МОШЕК ВИРУСОМ ЗАПАДНОГО НИЛА В БЕЛАРУСИ ЗА 2001–2015 гг.

*Самойлова Т.И.¹, Красько А.Г.¹, Колтунова Ю.Б.¹,
Рустамова Л.М.¹, Яшкова С.Е.², Соловьева Е.В.², Цвирко Л.С.³*

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

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

³Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, Хойники, Республика Беларусь

Реферат. В статье представлены результаты исследования кровососущих комаров и мошек, собранных на территории всех областей Республики Беларусь за 2001–2015 гг., на зараженность их вирусом Западного Нила.

Ключевые слова: кровососущие комары, мошки, вирус Западного Нила, антиген, Беларусь.

Введение. Среди вновь выявленных арбовирусов и вызываемых ими инфекций вирус Западного Нила (ЗН) имеет наряду с возбудителем клещевого энцефалита наибольшую эпидемиологическую значимость для республики. Вирус ЗН широко циркулирует на сопредельных с РБ территориях, а также в других странах [1, 2]. Переносчиками вируса являются кровососущие комары, о роли же мошек в циркуляции вируса ЗН имеются ограниченные сведения [3, 4].

Цель работы — анализ зараженности кровососущих комаров и мошек антигеном вируса ЗН в Беларуси за 2001–2015 гг.

Материалы и методы. Материалом для выявления антигена вируса ЗН в кровососущих комарах и мошках явились кровососущие комары, представленные тремя родами — *Anopheles*, *Aedes* и *Culex*, а также мошки рода *Boopthora*. Комары и мошки были отловлены на территории всех областей республики.

Для обнаружения антигена вируса Западного Нила было собрано 114552 экземпляра (1985 биопроб) кровососущих комаров 3-х родов: р. *Aedes* — 43122 экземпляра (638 биопроб), р. *Anopheles* — 36643 (483 биопробы), р. *Culex* — 34787 (864 биопроб), а также 36045 экземпляров (292 биопробы) мошек рода *Boopthora*.

Кровососущих насекомых предварительно определяли до рода, раскладывали по биопробам. В одну биопробу брали от 50 и более экземпляров кровососущих комаров и мошек одного рода из одного района (деревни) и с учетом даты сбора. Затем комаров и мошек тщательно отмывали эфиром и 70% этиловым спиртом, растирали в фарфоровой ступке и готовили суспензии на фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) (рН = 7,0). Приготовленные из комаров и мошек суспензии исследовали методом ИФА для выявления в них антигена вируса ЗН. При этом использовали диагностические наборы Института вирусологии им. Д.И. Ивановского (г. Москва, РФ) согласно инструкции производителя.

Результаты и их обсуждение. Исследования кровососущих комаров и мошек, собранных на территории всех областей республики, позволили выявить их зараженность вирусом Западного Нила (таблица).

Как видно из таблицы, процент выявления антигена вируса ЗН в кровососущих комарах за 2001–2015 гг. составил: по Витебской области — 10,9; по Могилевской — 12,3; по Гродненской — 10,9; по Минской — 11,1; по Брестской — 14,0; по Гомельской — 11,1 и по г. Минску — 18,0. В целом по республике процент выявления антигена вируса ЗН в кровососущих комарах — 9,2%. В мошках антиген вируса ЗН был выявлен во всех областях РБ, и процент положительных биопроб мошек составил в среднем 6,5%.

Таблица — Данные ИФА зараженности кровососущих членистоногих (комаров и мошек) антигеном вируса Западного Нила в 2001–2015 гг.*.

Области	2001–2015 гг.											
	<i>кровососущие комары</i>		<i>Aedes</i>		<i>Anopheles</i>		<i>Culex</i>		<i>Мошки</i>			
	б/п	%	б/п	%	б/п	%	б/п	%	б/п	%		
Брестская	172/24	14,0	59/10	16,9	56/11	19,6	57/3	5,3	55/6	10,9		
Витебская	303/33	10,9	114/8	7,0	122/21	17,2	67/4	6,0	72/5	6,9		
Гомельская	276/31	11,2	140/6	4,3	77/16	20,8	59/9	15,3	62/4	6,5		
Гродненская	229/25	10,9	95/10	10,5	66/13	19,7	68/2	2,9	37/2	5,4		
Минская	296/33	11,1	115/15	13,0	83/7	8,4	98/11	11,2	34/1	2,9		
г. Минск	50/9	18,0	18/3	16,7	11/4	36,4	21/2	9,5	Не исслед.	Не исслед.		
Могилевская	227/28	12,3	97/5	5,2	68/14	20,6	62/9	14,5	32/1	3,1		
ИТОГО:	1985/183	9,2	638/57	8,9	483/86	17,8	864/40	4,6	292/19	6,5		
									114552 экземпляра, 1985/183 биопробы (9,2%)		36045 экземпляров	
Примечание — * — в таблице указаны количество исследованных биопроб/количество положительных на антиген вируса ЗН.												

На рисунке 1 представлено процентное выявление антигена вируса ЗН в комарах по годам и по родам. Как видно, антиген вируса ЗН выявлялся ежегодно на протяжении всего периода наблюдения. Степень зараженности комаров антигеном вируса ЗН на протяжении 2001–2015 гг. от года к году изменялась, показывая устойчивые пики в 2009 и 2012 гг.

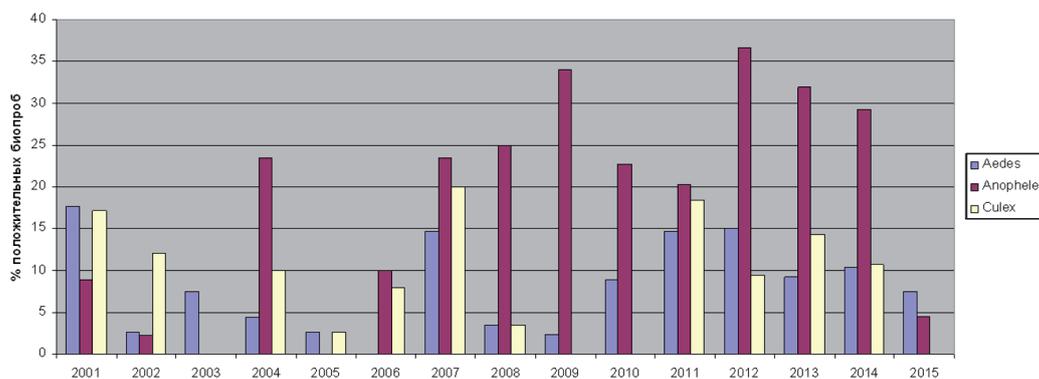


Рисунок 1. — Выявление антигена антивируса ЗН в комарах различных видов по годам в период 2001–2015 гг.

Процент биопроб, положительных в ИФА на антиген вируса ЗН, был наибольшим в 2009 и 2012 гг. среди кровососущих комаров рода *Anopheles* и составил 34,0 и 36,6% соответственно. В 2003, 2005 и 2015 гг. в комарах данного рода антиген ВЗН не определялся. Наименьший процент положительных биопроб среди комаров рода *Anopheles* отмечался в 2002 и 2001 гг. и составлял 2,2 и 8,8% соответственно.

Среди комаров рода *Aedes* максимальный процент положительных биопроб был отмечен в 2001 и 2012 гг., составил 17,6 и 15% соответственно, а минимальный — в 2009 г. (2,3%).

У комаров рода *Culex* процент положительных биопроб достигал максимума в 2007 и 2011 гг. и составлял соответственно 20,0 и 18,4%, при этом в 2003, 2009 и 2015 гг. положительных биопроб из числа комаров рода *Culex* выявлено не было.

Из вышеизложенного следует, что кровососущие комары, отловленные на территории РБ, инфицированы вирусом ЗН. Степень их зараженности на протяжении 2001–2015 гг. от года к году изменялась с пиком в 2009–2012 гг.

На рисунке 2 приведены данные выявления антигена вируса ЗН в комарах по родам за весь период исследования. Видно, что зараженность комаров рода *Anopheles* антигеном вируса ЗН составляет для указанного периода 17,8%. Для кровососущих комаров рода *Aedes* процент выявления антигена вируса составил в среднем 8,9%, а для комаров рода *Culex* — 4,6%.

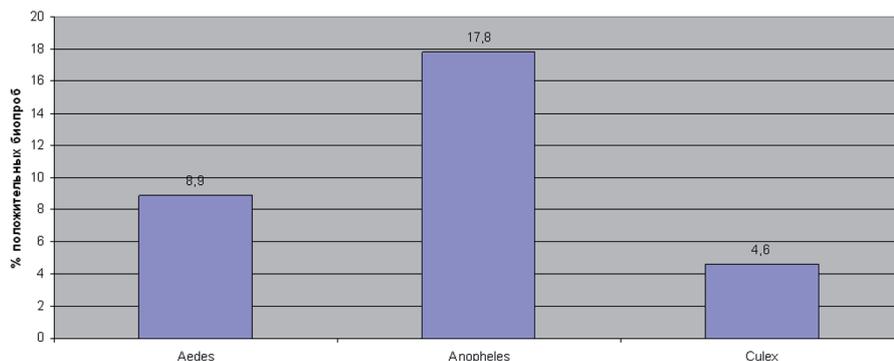


Рисунок 2. — Выявление антигена вируса Западного Нила в комарах за 2001–2015 гг.

На рисунке 3 показано, что наибольший процент зараженности комаров рода *Anopheles* антигеном вируса ЗН наблюдается в г. Минске (36,4%), а наименьший — в Минской области (8,4%), $p < 0,05$. Такое различие может быть связано с целым комплексом эколого-географических и антропогенных факторов города. Также высокий уровень зараженности комаров рода *Anopheles* в течение долгого времени сохраняется на территории Гомельской и Могилевской областей, где существуют устойчивые очаги циркуляции вируса ЗН.

Комары рода *Aedes*, отловленные в на территории Брестской области, характеризуются высокой (16,9%) зараженностью антигеном вируса ЗН.

Комары рода *Culex* на большей части территории РБ заражены вирусом ЗН в меньшей степени, при этом наибольший процент зараженности наблюдается на территории Гомельской и Могилевской (15,3 и 14,5% соответственно) областей.

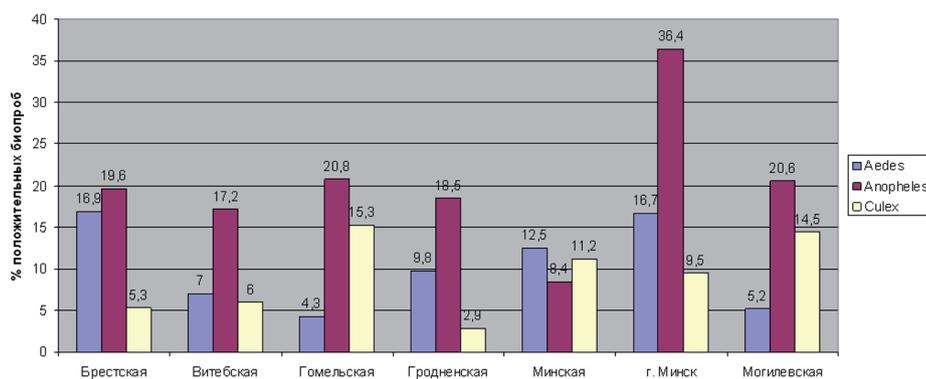


Рисунок 3. — Выявление антигена вируса Западного Нила в комарах pp. *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* по областям

На рисунке 4 приведена зараженность комаров антигеном вируса ЗН на территории Республики Беларусь в течение 15 лет. Многолетние наблюдения по исследованию зараженности комаров антигеном вируса ЗН показали, что наиболее высокие проценты зараженности выявлялись в комарах, отловленных на территории г. Минска (20,9%), на высоком уровне — на территории Брестской, Могилевской, Гомельской областей (13,9; 13,5 и 13,4% соответственно).

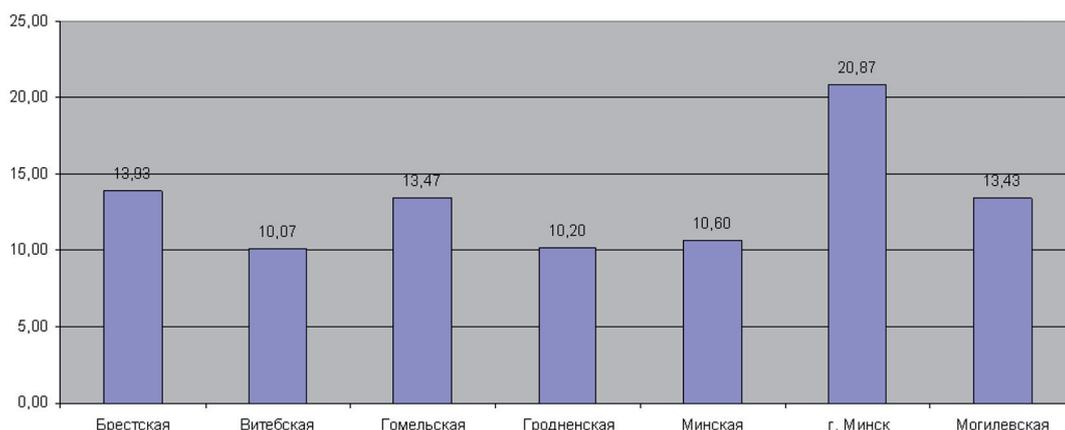


Рисунок 4. — Процент зараженности комаров на территории Республики Беларусь в 2001–2015 гг. по областям

Наряду с исследованием кровососущих комаров на зараженность антигеном вируса ЗН были исследованы биопробы кровососущих мошек рода *Boopthora*, отловленных во всех областях страны в 2001–2015 гг.

Исследование кровососущих мошек на зараженность мошек их вирусом ЗН приведено на рисунке 5.

Из рисунка 5 видно, что наибольшая зараженность вирусом ЗН отмечалась в Брестской области (10,9%). В Минской и Могилевской областях республики процент выявления антигена вируса ЗН в мошках составлял 2,9 и 3,1% соответственно. В среднем же по республике зараженность мошек за анализируемый период составила 6,5%. Полученные данные по изучению зараженности мошек могут свидетельствовать об участии кровососущих мошек в циркуляции вируса ЗН на территории Беларуси.

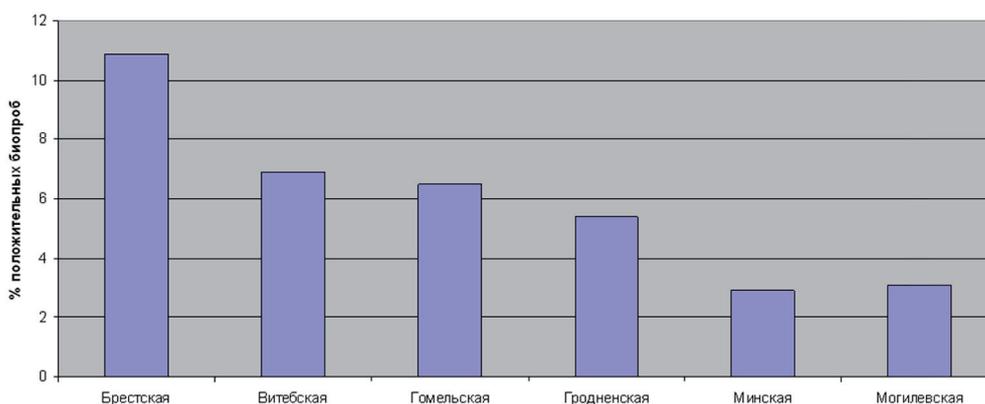


Рисунок 5. — Выявление антигена в кровососущих мошках в 2001–2015 гг.

Заклучение. На основании анализа зараженности кровососущих комаров и мошек Беларуси за 2001–2015 гг. можно сделать вывод, что инфицированность кровососущих комаров вирусом ЗН остается на значимом уровне и составляет в среднем по Республике Беларусь 9,2%. Антиген вируса ЗН обнаруживается в кровососущих комарах всех трех исследуемых родов (*Aedes*, *Anopheles* и *Culex*), при этом наиболее высокий процент (17,8%) выявляется в комарах рода *Anopheles*. Циркуляция вируса происходит на территории всех областей республики, однако наиболее интенсивно — на территории г. Минска, Брестской, Гомельской и Могилевской областей. Анализ полученных данных по зараженности мошек показывает, что они также принимают участие в циркуляции вируса ЗН.

Литература

1. Бурлаков, С.А. Комары и клещи — переносчики возбудителей вирусных и риккетсиозных заболеваний человека / С.А. Бурлаков, В.Н. Паутов. — М., 1975. — 215 с.
2. Самойлова, Т.И. Арбовирусы в Республике Беларусь (полевые и экспериментальные исследования): автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.06, 14.00.30 / Т.И. Самойлова; НИИ эпидемиологии и микробиологии. — Минск, 2003. — 41 с.
3. Самойлова, Т.И. Изучение циркуляции новых для Беларуси арбовирусов / Т.И. Самойлова // Принципы и перспективы диагностики новых и вновь появляющихся инфекционных заболеваний: ст. и тез. докл. междунар. науч.-практ. конф., Смолевичи, 27–28 февр. 1997 г. — Минск, 1997. — С. 81–82.
4. Инфицированность кровососущих комаров и мошек вирусом Западного Нила на территории Республики Беларусь в 2011–2013 гг. / А.А. Соглаева [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2014. — Вып. 7. — С. 95–98. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

WEST NILE VIRUS INFECTION OF BLOOD-SUCKING MOSQUITOES IN THE REPUBLIC OF BELARUS, 2010–2014

*Samoilova T.I.¹, Krasko A.G.¹, Koltunova Yu.B.¹, Rustamova L.M.¹, Yashkova S.E.²,
Solov'eva E.V.², Tsvirko L.S.³*

¹State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus;

²State Institution “Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health”, Minsk, Belarus;

³Polesye State Radiation-Ecological Reserve, Hoiniki, Belarus

In this paper results of detection of West Nile virus in blood-sucking mosquitoes and midges collected in Belarus in 2001–2015 are presented.

Keywords: blood-sucking mosquitoes, midges, West Nile virus, antigen, Belarus.

Поступила 31.08.2016

ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Самойлова Т.И.¹, Красько А.Г.¹, Колтунова Ю.Б.¹, Яикова С.Е.¹, Соловьева Е.В.², Сеньковец Т.А.³

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

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

³Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, Хойники, Республика Беларусь

Реферат. В статье представлены данные о зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита в период эпидсезона 2015 г. в Беларуси.

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

Введение. В последние годы отмечается рост зараженности иксодовых клещей вирусом КЭ и расширение ареала их обитания, что создает предпосылки для ежегодного мониторинга зараженности переносчиков вирусом КЭ [1, 2].

Одним из основных методов изучения вирусофорности клещей является экспресс-метод иммуноферментного анализа (ИФА). К его достоинствам можно отнести высокую чувствительность, простоту в использовании и скорость получения результата. Эффективность этого метода ничем не уступает методу биопробы на животных [3].

В статье приведены результаты исследования иксодовых клещей, собранных на территории республики в 2015 г., на выявление антигена вируса КЭ.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись иксодовые клещи двух видов: *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) и *Dermacentor reticulatus* (*D. reticulatus*), собранные на территории всех областей республики в 2015 г. Для исследований в ИФА был собран и исследован 791 экземпляр (190 биопроб) клещей. Из них 636 экземпляров (149 биопроб) — *I. ricinus* и 155 экземпляров (41 биопроба) — *D. reticulatus* из природных очагов. Перед постановкой ИФА иксодовых клещей подвергали первичной биологической обработке. Переносчиков распределяли по биопробам в зависимости от их вида, пола, стадии развития, степени насыщения. В одну биопробу брали 10–15 экземпляров голодных или полунапитавшихся самок; 10 голодных самцов; 2–5 напитавшихся самок или 50–100 нимф иксодовых клещей. Далее членистоногих отмывали фосфатным буферным раствором (рН = 7,0), растирали в фарфоровой ступке и готовили суспензии [4], которые исследовали методом ИФА для выявления в них антигена вируса КЭ. При этом использовали диагностические наборы фирмы Вектор-БЕСТ (РФ) согласно инструкции производителя.

Результаты и их обсуждение. В результате исследований иксодовых клещей антиген вируса КЭ в целом по республике выявлялся в клещах *I. ricinus* (19,5% случаев), а в *D. reticulatus* — в 14,6%.

Таблица — Характеристика зараженности иксодовых клещей антигеном вируса клещевого энцефалита в Беларуси по ИФА

Регионы	<i>I. ricinus</i>			<i>D. reticulatus</i>		
	биопробы/ экземпляры	кол-во положительных	%	биопробы/ экземпляры	кол-во положительных	%
Витебская	41/137	8	19,5	2/7	0	0,0
Могилевская	19/110	3	15,8	2/10	0	0,0
Гродненская	22/78	4	18,2	18/72	3	16,7
Минская	8/75	2	25,0	3/10	0	0,0
Брестская	16/74	4	25,0	0	0	0,0
Гомельская	14/63	1	14,3	12/44	3	25,0
г. Минск	29/99	4	13,8	4/12	0	0,0
Всего по РБ	149/636	29	19,5	41/155	6	14,6

Как видно из таблицы, наиболее высокие показатели выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* были обнаружены в Брестской (25%) и Минской (25%) областях республики. В то же время по Гродненской области процент выявления антигена вируса КЭ по сравнению с 2011 г. несколько снизился (18,2%), а по Минской области, наоборот, увеличился с 15 до 25%. Зараженные вирусом клещи по Минской области были обнаружены в Молодечненском и Столбцовском районах, а по г. Минску антиген вируса КЭ выявили в клещах, собранных на территории Первомайского района, ботанического сада и на водохранилище «Дрозды». Что касается клещей *D. reticulatus*, то их зараженность вирусом КЭ по Гомельской области составила 25,0%, а по Гродненской — 16,7%.

Таким образом, в результате проведенных исследований, можно сделать заключение о том, что уровень зараженности иксодовых клещей антигеном вируса КЭ сохраняется достаточно высоким, и составляет, в среднем в целом по стране для *I. ricinus* – 19,5%, а для *D. reticulatus* – 14,6%, что свидетельствует об активной циркуляции вируса КЭ на территории Беларуси.

Литература

1. Самойлова, Т.И. Современное состояние проблемы арбовирусных инфекций в Республике Беларусь / Т.И. Самойлова // Вестн. Урал. гос. мед. акад. (Екатеринбург). — 2010. — Вып. 21. — С. 133–141.
2. Львов, Д.К. Стратегия и тактика профилактики клещевого энцефалита на современном этапе / Д.К. Львов, В.И. Злобин // Вопр. вирусологии. — 2007. — № 5. — С. 26–30.
3. Мельникова, О.В. Вирусологический мониторинг природных очагов клещевого энцефалита в Прибайкалье на основании индивидуального исследования иксодовых клещей: автореф. дис. ... канд. биол. наук / О.В. Мельникова. — Томск, 1995. — 25 с.
4. Методические рекомендации по выявлению циркуляции арбовирусов // Итоги науки и техники. Сер. Вирусол. — М.: ВИНТИ, 1991. — Т. 25. — 111 с.

TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS CONTAMINATION OF IXODES TICKS IN BELARUS

Samoilova T.I.¹, Krasko A.G.¹, Koltunova Yu.B.¹, Yashkova S.E.², Solov'eva E.V.², Senkovets T.A.³

*¹State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology",
Minsk, Republic of Belarus;*

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

³Polesye State Radiation-Ecological Reserve, Hoiniki, Republic of Belarus

In the paper the results of Ixodes ticks contamination by tick-borne encephalitis virus in Belarus for the period of 2015 are presented.

Keywords: Ixodes ticks, contamination, tick-borne encephalitis virus, Belarus.

Поступила 30.08.2016

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ NS5 ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Семижон П.А.¹, Счесленок Е.П.¹, Фомина Е.Г.¹, Школина Т.В.¹, Рогачева Т.А.², Владыко А.С.¹

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

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

Реферат. Получены гибридные векторные конструкции, обеспечивающие экспрессию рекомбинантных полипептидов NS5 вируса гепатита С (ВГС) генотипов 1b и 3a в прокариотической системе *Escherichia coli*, штамм BL 21 (DE3). Высокоочищенные препараты рекомбинантных полипептидов способны специфически связывать антитела к ВГС, что позволяет использовать их в качестве антигенов при разработке иммунодиагностических препаратов.

Ключевые слова: вирус гепатита С, рекомбинантная плазмидная ДНК, экспрессия рекомбинантных полипептидов, аффинная хроматография, иммунный блоттинг.

Введение. В диагностике инфекции, вызываемой вирусом гепатита С (ВГС), можно условно выделить два основных направления: первое — выявление специфических серологических маркеров с использованием иммуноферментных методов (иммуноферментный анализ, иммунный блоттинг), второе — выявление прямых маркеров инфекции — вирусной РНК с использованием метода ПЦР. Немаловажное значение имеет и установление генотипа вируса, поскольку является определяющим при прогнозировании перехода острой формы заболевания в хроническую и при выборе схемы лечения [1–3]. В соответствии с действующей нормативной документацией первично-положительное обнаружение антител к ВГС в обязательном порядке подтверждается повторной постановкой пробы в двух лунках или конфирматорными тестами — ИФА либо иммуноблоттингом на определение спектра антител [4]. Все современные иммунодиагностические препараты для выявления инфекции, вызываемой ВГС, в обязательном порядке в качестве антитело-связывающего субстрата содержат Core, NS3, NS4 и NS5 — рекомбинантные и/или синтетические фрагменты структурных и неструктурных белков ВГС.

Учитывая то, что наиболее распространенными в республике являются 1b и 3a генотипы ВГС [5–7] и что различие в аминокислотных последовательностях среди различных генотипов составляет до 30% [8], перспективным направлением исследований является получение рекомбинантных аналогов основных антигенов ВГС для 1b и 3a генотипов (Core, NS3, NS4, NS5) либо их фрагментов для включения в качестве антигенных компонентов в состав иммунодиагностических препаратов, а также дальнейшая сравнительная оценка их свойств при исследовании проб биологического материала на наличие антител к ВГС от пациентов с разными генотипами вируса.

Цель работы — получение препаратов рекомбинантных белков, включающих антигензначимые участки аминокислот NS5 области ВГС генотипов 1b и 3a, оценка их диагностической значимости.

Материалы и методы. *Образцы плазмы крови* людей, содержащие РНК ВГС с известным генотипом, используемые в качестве исходного материала, образцы сыворотки крови людей, содержащие антитела к ВГС, были получены из Учреждения здравоохранения «Городская инфекционная клиническая больница» г. Минска.

Топологический анализ аминокислотной последовательности был проведен с использованием авторской компьютерной программы wxGeneBee, в которой за основу взяты шкалы гидрофобности и гидрофильности, предложенные Norr and Woods (1981) и Kyte and Doolittle (1982). В критерии оценки входят такие параметры, как растворимость, заряд, удаленность от NC-остова, наличие спиралей, сульфгидрильных остатков.

В качестве исходного вектора для клонирования фрагментов ДНК, соответствующих нуклеотидным последовательностям иммунореактивных эпитопов ВГС, использовали плазмидный вектор pJC40 [9].

Для анализа нуклеотидных последовательностей с целью последующего синтеза олигонуклеотидных затравок (праймеров), а также определения оптимальных условий для ОТ-ПЦР были использованы компьютерные программы «Gene Runner 3.00», «Vector NTI Advance 9.1».

Для выделения вирусной РНК из вирусосодержащего материала (плазма крови) использовали наборы QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, 57704), Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience, PP-210S) в соответствии с прилагаемыми инструкциями.

Олигонуклеотидные последовательности (праймеры):

- NS5D1: 5'-CGCGAAGCTTTTYCCCATCAAYGMG-3';

- NS5XR1b: 5'-GCGCCTCGAGCCCGTGTACCACTGG-3';

- NS5XR3a 5'-GCGCCTCGAGCCCGTGTACCACTGG-3', используемые для амплификации фрагментов ДНК, кодирующих иммунореактивные эпитопы области NS5 ВГС генотипов 1b и 3a, были синтезированы и очищены по заказу в ОДО «Праймтех» (г. Минск, РБ).

Постановку ОТ-ПЦР проводили с использованием коммерческих наборов OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, 210210), предназначенных для одностадийной ОТ-ПЦР в соответствии с прилагаемыми инструкциями. В реакции использовали по 25 пмоль прямого и обратного праймеров.

Анализ продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле, продукты рестрикции гибридных плазмид анализировали в 0,8% агарозном геле. Электрофорез вели при напряжении тока 10 в/см геля в ТРИС-ацетатном буфере (pH = 8,0). ДНК визуализировали окрашиванием геля бромистым этидием с последующим просмотром в УФ на трансиллюминаторе.

Гидролиз ДНК осуществляли с использованием специфических рестриктаз (Thermo Scientific) в соответствии с прилагаемыми инструкциями.

Лигирование фрагментов ДНК в исходный вектор pJC40 проводили в объеме 30 мкл при температуре +22°C в течение 1 ч с использованием T4 DNA Ligase (Thermo Scientific). Полученную лигазную смесь использовали далее для трансформации компетентных клеток *E. coli*, штамм DH5α.

Трансформация культуры клеток плазмидной ДНК: в 100 мкл клеток, ресуспендированных в 100 мкл 0,1 М CaCl₂, вносили 20 мкл лигазной смеси (либо 20 нг гибридной плазмиды), выдерживали 30 мин при +4°C, тепловой шок проводили при +42°C в течение 90 с на водяной бане, далее пробирки быстро охлаждали на льду в течение 2–3 мин, вносили среду LB до конечного объема 1 мл и помещали в термостат на 1 ч при +37°C. Осаждали клетки центрифугированием при 2000 об./мин в течение 5 мин, высевали на чашки Петри с плотной средой, содержащей в качестве селективного агента ампициллин в концентрации 50 мкг/мл. Чашки помещали в термостат на ночь при +37°C.

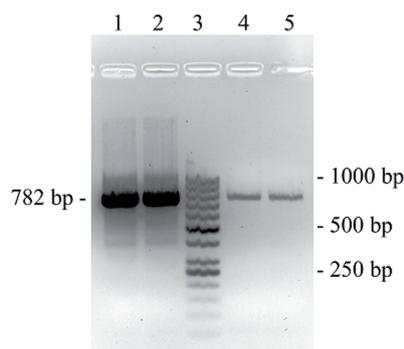
Выделение плазмидной ДНК осуществляли с использованием коммерческого набора реагентов QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, 27104) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу Laemmli [10]. Концентрация разделяющего геля составляла 15%, фокусирующего — 6%. Электрофорез проводили при напряжении 200 В в течение 1 ч. После окончания гель окрашивали раствором Кумасси R-250.

Очистку рекомбинантных полипептидов проводили методом аффинной металлохелатной хроматографии на HisBind колонке (Sigma) с иммобилизованными катионами Ni²⁺ в денатурирующих условиях (все используемые буферные растворы содержали 6 М мочевины). Фракции элюции и все остальные фракции хроматографии анализировали электрофорезом в 15% ПААГ.

Для постановки иммунного блоттинга осуществляли электроперенос белков, разделенных в 15% полиакриламидном геле, на нитроцеллюлозную мембрану (размер пор 0,22 мкм) в Criterion Blotter 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 = 7,2, содержащем 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА), для блокирования неспецифических мест связывания. Затем инкубировали стрипы с сыворотками крови человека, разведенными в 100 раз ФСБ, содержащем 0,05% твин 20 и 1% БСА (ФСБ-Т-БСА), в течение 2 ч при постоянном покачивании. Далее 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 стрипы помещали в раствор субстрата, в качестве которого использовали диаминобензидин, растворенный в ФСБ (pH = 7,2), содержащем 0,3% перекись водорода. После развития окраски реакцию останавливали, отмывая стрипы трижды дистиллированной водой.

Результаты и их обсуждение. Для получения векторных конструкций, обеспечивающих экспрессию рекомбинантных полипептидов, включающих антигензначимые участки NS5 ВГС, первоначально был проведен топологический анализ аминокислотной последовательности ВГС, установлены потенциальные антигензначимые участки. Для синтеза специфических фрагментов ДНК, кодирующих часть нуклеотидной последовательности области неструктурного белка NS5 ВГС, были подобраны и искусственно синтезированы олигонуклеотиды (праймеры) NS5D1 (прямой) — универсальный праймер для 1b и 3a генотипов, NS5XR1b (обратный) — для 1b генотипа и NS5XR3a (обратный) — для 3a генотипа. Постановку ОТ-ПЦР осуществляли на матрицах РНК, выделенных из плазмы крови от пациентов с установленным генотипом ВГС. В результате ОТ-ПЦР с парами праймеров NS5D1/NS5XR1b для 1b генотипа и NS5D1/NS5XR3a для 3a генотипа были получены специфические фрагменты ДНК размером 782 п.о., соответствующие нуклеотидной последовательности иммунореактивных эпитопов неструктурного белка NS5 генотипов 1b и 3a (рисунок 1).

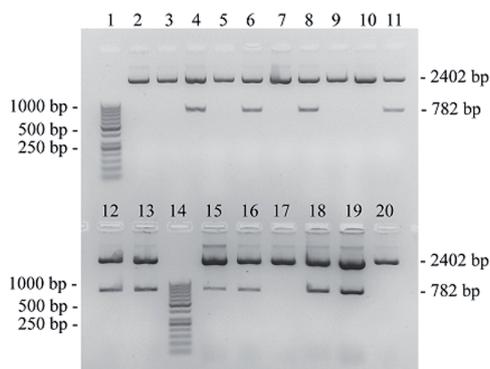


Дорожки: 1, 2 — продукты амплификации с парой праймеров NS5D1/NS5XR1b на матрице РНК ВГС с генотипом 3а; 3 — ДНК-маркер GeneRuler 50 bp DNA ladder; 4, 5 — продукты амплификации с парой праймеров NS5D1/NS5XR3а на матрице РНК ВГС с генотипом 1b

Рисунок 1. — Электрофоретический анализ продуктов амплификации на матрицах РНК ВГС генотипов 1b и 3а

Из представленного рисунка видно, что в результате постановки ОТ-ПЦР на матрицах РНК, выделенных от пациентов с установленными генотипами ВГС (1b и 3а), амплифицированы фрагменты ДНК, кодирующие потенциальные антигензначимые участки неструктурного белка NS5.

Для создания векторов, способных обеспечить экспрессию рекомбинантных полипептидов, полученные ампликоны были лигированы в полилинкер вектора pJC40 по сайтам Hind III и Xho I, в результате чего были получены гибридные плазмиды pJC40/NS5/1b и pJC40/NS5/3а. Полученными лигазными смесями были трансформированы компетентные клетки *E. coli*, штамм *DH5α*. Клетки выращивали в течение ночи при +37°C на твердой селективной питательной среде, содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл. Для селекции клонов, содержащих гибридные плазмиды, отдельные колонии клеток рассеивали штрихом и выращивали при тех же условиях. Далее выделяли плазмидную ДНК и анализировали методом рестрикционного анализа. На рисунке 2 показаны результаты обработки выделенной плазмидной ДНК ферментами рестрикции Hind III и Xho I.



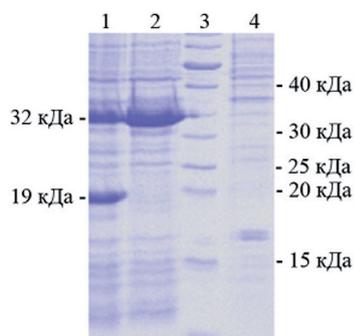
Дорожки: 1, 14 — ДНК-маркер GeneRuler 50 bp DNA ladder; 2–11 — продукты рестрикции плазмидной ДНК, выделенной из гибридных клонов клеток DH5α/pJC40/NS5/1b; 12–13, 15–20 — продукты рестрикции плазмидной ДНК, выделенной из гибридных клонов клеток DH5α/pJC40/NS5/3а

Рисунок 2. — Электрофоретический анализ продуктов рестрикции плазмидной ДНК, выделенной из гибридных клонов клеток

Анализируя продукты рестрикции, видно, что клоны клеток содержат гибридные плазмиды pJC40/NS4-A/1b (дорожки 4, 6, 8) и pJC40/NS5/3а (дорожки 12, 13, 15, 16, 18, 19).

Для экспрессии рекомбинантных полипептидов полученными гибридными плазмидами были трансформированы перmissive компетентные клетки *E. coli*, штамм *BL21(DE3)*. Трансформанты выращивали на жидкой питательной среде, содержащей 0,2% глюкозы и 50 мкг/мл ампицилли-

на, в момент достижения бактериальной культурой оптической плотности $OD_{600} = 0,3$ осуществляли индукцию биосинтеза рекомбинантного полипептида путем внесения в среду изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (IPTG), после чего клетки инкубировали еще 3,5 ч. Далее осаждали клетки центрифугированием и обрабатывали лизирующим буфером. Уровень экспрессии рекомбинантных полипептидов оценивали электрофорезом в 15% полиакриламидном геле (рисунок 3).

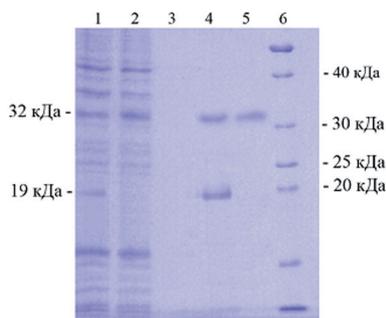


Дорожки: 1 — лизат клеток *E. coli*, штамм BL21, экспрессирующих рекомбинантный полипептид NS5/1b; 2 — лизат клеток *E. coli*, штамм BL21, экспрессирующих рекомбинантный полипептид NS5/3a; 3 — маркерные белки; 4 — лизат клеток *E. coli*, штамм BL21 (контроль)

Рисунок 3. — Электрофоретический анализ уровня экспрессии рекомбинантных полипептидов NS5 ВГС

Из рисунка 3 видно, что по сравнению с контрольным образцом (лизат *BL21(DE3)* — дорожка 4) в лизате клеток, содержащем рекомбинантную плазмиду pJC40/NS4-A/1b, наблюдается экспрессия полипептида с распределением в области 32 и 19 кДа — дорожка 1; в лизате клеток, содержащем рекомбинантную плазмиду pJC40/NS4-A/3a, наблюдается экспрессия полипептида с распределением в области 32 кДа — дорожка 2.

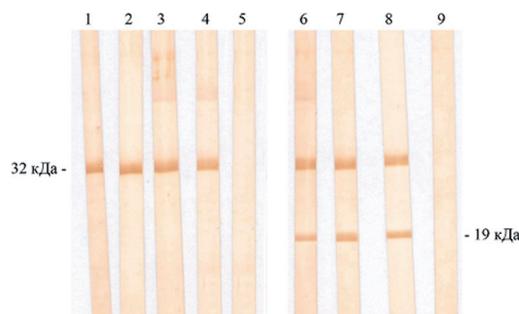
Для получения рекомбинантных полипептидов, максимально очищенных от клеточных белков, был использован метод высокоаффинной металлохелатной хроматографии. На рисунке 4 показаны результаты очистки рекомбинантных полипептидов NS5 ВГС.



Дорожки: 1 — лизат бактериальных клеток, содержащий полипептид NS5/1b; 2 — лизат бактериальных клеток, содержащий полипептид NS5/3a; 3 — фракция отмывки, 4, 5 — фракции элюции полипептидов NS5 генотипов 1b и 3a соответственно; 6 — маркерные белки

Рисунок 4. — Электрофоретический анализ фракций металлохелатной хроматографии рекомбинантных полипептидов NS5 ВГС

Оценку антигенных свойств полученных полипептидов проводили методом иммунного блоттинга. Для этого полоски нитроцеллюлозной мембраны с иммобилизованными рекомбинантными полипептидами NS5 ВГС (используемыми в качестве вирусных антигенов) обрабатывали референс-сыворотками, содержащими специфические антитела (наличие антител к NS5 ВГС было подтверждено с использованием коммерческого набора INNO-LIA™ HCV Score, Бельгия) и референс-сыворотками, не содержащими антител к ВГС. Результаты исследований представлены на рисунке 5.



Дорожки: 1–4 — рекомбинантный полипептид NS5/3a, обработанный референс-сыворотками, содержащими антитела к ВГС; 5 — рекомбинантный полипептид NS5/3a, обработанный референс-сывороткой, не содержащей антител к ВГС; 6–8 — рекомбинантный полипептид NS5/1b, обработанный референс-сыворотками, содержащими антитела к ВГС; 9 — рекомбинантный полипептид NS5/1b, обработанный референс-сывороткой, не содержащей антител к ВГС

Рисунок 5. — Оценка специфичности рекомбинантных полипептидов NS5

Оценку результатов осуществляли визуально: в результате реакции наблюдали полосу связывания коричневого цвета в области, соответствующей распределению иммобилизованных рекомбинантных полипептидов (антигенов) при наличии в сыворотке крови антител к ВГС. Таким образом, установлено наличие специфических полос связывания в области 32 кДа для NS5/3a полипептида ВГС, соответствующего генотипу 3a; 32 и 19 кДа — для рекомбинантного полипептида ВГС NS5/1b, соответствующего генотипу 1b. В то же время рекомбинантные полипептиды, сорбированные на нитроцеллюлозной мембране, не взаимодействовали с компонентами нормальной человеческой сыворотки, о чем свидетельствовало отсутствие полосы связывания в соответствующей области.

В результате исследований с использованием методов генетической инженерии получены гибридные векторные конструкции, обеспечивающие экспрессию рекомбинантных полипептидов NS5 ВГС генотипов 1b и 3a в прокариотической системе *E. coli*, штамм *BL 21 (DE3)*. Высокоочищенные препараты рекомбинантных полипептидов, используемые в качестве антигенов при постановке иммунного блоттинга, способны специфически связывать антитела, находящиеся в сыворотке крови человека, что позволяет в дальнейшем использовать их в качестве антигенов при разработке иммунодиагностических препаратов.

Литература

1. Correlation between virus genotype and chronicity rate in acute hepatitis C / P. Amoroso [et al.] // *J. Hepatol.* — 1998. — Vol. 28, № 6. — P. 939–944.
2. Severity of liver disease with different hepatitis C viral clones / G. Pozzato [et al.] // *Lancet.* — 1991. — Vol. 338, № 8765. — P. 509.
3. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. Collaborative Study Group / J.B. Noursbaum [et al.] // *Ann. Intern. Med.* — 1995. — Vol. 122, № 3. — P. 161–168.
4. Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов [Электронный ресурс]: постановление М-ва здравоохран. Респ. Беларусь, 6 февр. 2013, № 11 // Законодательство Республики Беларусь. — Режим доступа: <http://pravo.newsby.org/belarus/postanov1/pst002.htm>. — Дата доступа: 09.09.2016.
5. Мицура, В.М. Гепатит С: механизмы патогенеза, методы диагностики, лечения и профилактики неблагоприятных исходов: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.09 / В.М. Мицура; БГМУ. — Минск, 2015. — 49 с.
6. Генетическое разнообразие вируса гепатита С у детей со злокачественными новообразованиями / Е.Л. Гасич [и др.] // *Здравоохранение.* — 2014. — № 10. — С. 59–64.
7. Генетическая характеристика изолятов вируса гепатита С, циркулирующих на территории Республики Беларусь / Е.П. Счесленок [и др.] // *Здравоохранение.* — 2005. — № 11. — С. 27–29.
8. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans / P. Simmonds [et al.] // *J. Gen. Virol.* — 2001. — Vol. 82, pt. 4. — P. 693–712.
9. Clos, J. pJC20 and pJC40- two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli* / J. Clos, S. Brandau // *J. Protein Exp. Purif.* — 1994. — Vol. 5, № 2. — P. 133–137.

10. 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.

PREPARATION AND EVALUATION OF SPECIFICITY OF HEPATITIS C VIRUS RECOMBINANT POLYPEPTIDES NS5

Semizhon P.A.¹, Scheslenok E.P.¹, Fomina E.G.¹, Rogacheva T.A.², Vladyko A.S.¹

*¹State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus;*

²Health Care Institution “Municipal Clinical Hospital of Infectious Diseases”, Minsk, Republic of Belarus

There were obtained hybrid vector constructions which provide the expression of recombinant polypeptides NS5 HCV genotypes 1b and 3a in prokaryotic system *E. coli*, strain *BL 21 (DE3)*. The highly purified recombinant polypeptides can specifically bind antibodies to HCV, therefore they can be used as antigens in the development of immunodiagnostic products.

Keywords: hepatitis C virus, recombinant plasmid DNA, expression of recombinant polypeptides, affinity chromatography, immune blot.

Поступила 12.09.2016

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ НА ТЕРРИТОРИИ МОГИЛЕВСКОЙ ОБЛАСТИ

Счесленок Е.П.¹, Семизжон П.А.¹, Омелянович О.Г.², Войтенко Н.Т.², Чайка А.В.², Владыко А.С.¹

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

*²Учреждение здравоохранения «Могилевский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного
здоровья», Могилев, Республика Беларусь*

Реферат. С использованием молекулярно-биологических методов исследования впервые на территории Республики Беларусь в пробах полевого биоматериала (легкие грызунов) выявлена РНК вируса Добрава. Показано, что на территории Могилевской области (Горецкий район) циркулирует два возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) — Пуумала и Добрава. Показана возможность использования тест-системы для идентификации возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме «реального времени» «Белар-ГЛПС-ПЦР/РВ» (РВ) для одновременного выявления возбудителей ГЛПС.

Ключевые слова: ГЛПС, заболеваемость ГЛПС, природные хозяева возбудителей ГЛПС, метод ПЦР-диагностики.

Введение. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом относится к природно-очаговым зоонозным инфекциям. Источником инфекции являются мелкие млекопитающие, главным образом дикие грызуны — хронические носители хантавирусов — возбудителей ГЛПС. Возбудитель вместе с аэрозолями, содержащими продукты жизнедеятельности зверьков, через верхние дыхательные пути попадает в легкие человека (где условия для его размножения наиболее благоприятны) с последующей диссеминацией через кровь в другие органы [1].

В Республике Беларусь ежегодно регистрируются случаи заболевания ГЛПС. С 2009 по 2015 гг. зарегистрировано 396 случаев инфекции (отмечались летальные исходы). На сегодняшний день Могилевская область вносит основной вклад в формирование среднереспубликанского показателя заболеваемости ГЛПС, в которой за этот же период было зарегистрировано 274 случая и в 2015 г. наблюдалось превышение республиканского уровня заболеваемости ГЛПС в 4,9 раза (показатели заболеваемости на 100 тыс. населения составили 3,55 для Могилевской области и 0,72 для республики в целом) [2]. В разрезе административных территорий за 2009–2014 гг. наибольшее число случаев

заболеваний зарегистрировано в г. Могилеве и Могилевском районе — 131 (55%), а также в 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% [3].

На территории 19 районов Могилевской области зарегистрировано 90 природных очагов ГЛПС. По данным эпизоотологических обследований, средний по области показатель пораженности грызунов возбудителями ГЛПС составлял: в 2010 г. — 2,4%, в 2011 г. — 4,7%, в 2012 г. — 2,7%, в 2013 г. — 5,6%, в 2014 г. — 3,1% и в 2015 г. — 2,4%. Наиболее высокий уровень носительства (28,6%) возбудителя ГЛПС выявлен в природных очагах Могилевского района, на административных территориях которого за 2009–2014 гг. зарегистрировано наибольшее число случаев заболеваний ГЛПС — 131 (55%). В результате зоологической работы было установлено, что основным носителем вируса ГЛПС является рыжая полевка (до 85%), оставшиеся 15% приходятся примерно в равных долях на мышь домовую, мышь лесную, мышь полевую и мышь желтогорлую [3]. В Республике Беларусь, а также в большинстве стран Европы, где регистрируется ГЛПС, доминирует вирус Пуумала, основным носителем которого является рыжая полевка. Однако присутствие в природных очагах ГЛПС желтогорлой и полевой мышей, являющихся носителями вируса Добрава, который выявляется на территориях Западной части России, Латвии, Польши, со значительной долей уверенности позволяет предполагать на территории Беларуси наличие случаев заболевания ГЛПС, вызванных вирусом Добрава.

Цель работы — молекулярно-биологический анализ возбудителей ГЛПС, циркулирующих в очагах распространения инфекции на территории Могилевской области.

Материалы и методы. В работе использованы вирусы: Пуумала (штаммы CG-1820 и K-27), Хантаан (штамм 4950) и Добрава (штамм Аа 1854/Липецк), которые были получены в Центре Минздрава России по борьбе с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (руководитель — д-р мед. наук, проф. Е.А. Ткаченко).

Подготовку проб полевого материала (суспензия легких грызунов) проводили согласно методике, описанной в Инструкции «Лабораторная диагностика геморрагической лихорадки с почечным синдромом» [4].

Для выделения РНК из вирусосодержащей культуральной жидкости и суспензии легких грызунов использовали коммерческий набор «РИБО-преп» фирмы «АмплиСенс» (РФ). Все манипуляции проводились согласно инструкции, прилагаемой к набору.

Для постановки реакции обратной транскрипции использовали набор «Реверта-Л» (производство ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, РФ). Все манипуляции проводились согласно прилагаемой инструкции.

Диагностическая тест-система для идентификации возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом методом ОТ-ПЦР в режиме «реального времени» «Белар-ГЛПС-ПЦР/РВ» была использована для выявления РНК возбудителей ГЛПС методом ПЦР в режиме «реального времени». Все манипуляции проводились согласно инструкции производителя. Для ПЦР был использован прибор IQ5 (Bio-Rad, США).

Результаты и их обсуждение. Использование в диагностике природно-очаговых инфекционных заболеваний метода ПЦР позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью исследовать практически любой материал: и клинические пробы (испражнения, кровь, моча, смыв из зева и т. д.), и материал из очагов инфекции (органы и помет грызунов).

Тест-система для идентификации возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом методом ОТ-ПЦР в режиме «реального времени» «Белар-ГЛПС-ПЦР/РВ» была использована для анализа проб органов грызунов, отловленных в очагах распространения на административных территориях Могилевской области. Данная тест-система позволяет одновременно выявлять РНК вирусов Пуумала, Добрава и Хантаан, вызывающих ГЛПС, в клинических образцах пациентов с подозрением ГЛПС (плазма крови), а также в органах (легкие) мышевидных грызунов. Для оценки специфичности тест-системы использовали постановку ПЦР на матрицах РНК, выделенных из вирусосодержащей культуральной жидкости референс-штаммов.

Результат постановки ПЦР с использованием ПЦР-смеси-1/PUU/HANT, содержащей праймеры и гибридационные пробы для амплификации и детекции специфических фрагментов вирусов Пуумала (по каналу FAM) и Хантаан (по каналу ROX), представлены на рисунке 1. Из рисунка видно, что в 3 пробах (ПКО/PUU и 2 анализируемые пробы вируса Пуумала, штаммы CG-1820 и K-27)

регистрируется продукт специфической амплификации по каналу FAM (рисунок 1А), а по каналу ROX регистрируется продукт специфической амплификации в 2 пробах (ПКО/НАНТ и 1 анализируемая проба вируса Хантаан, штамм 4950) (рисунок 1Б) соответственно.

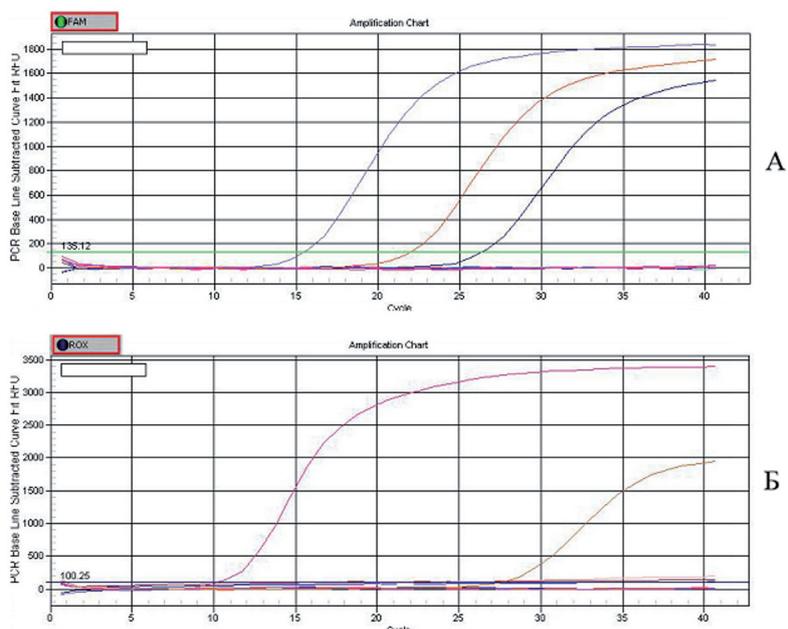


Рисунок 1. — Результат амплификации с использованием ПЦР-смеси-1/PUU/НАНТ

ПЦР-смесь-2/DOV/ВКО использовали для амплификации и гибридационно-флуоресцентной детекции специфических фрагментов вируса Доброва (по каналу ROX) и внутреннего контрольного образца (по каналу FAM). Результаты анализа представлены на рисунке 2 (А и Б). Из рисунка 2Б видно, что по каналу ROX регистрируется продукт специфической амплификации в виде кривых флуоресценции в 2 пробах (ПКО/DOV и 1 пробы вируса Доброва, штамм Аа 1854/Липецк). Наличие флуоресценции во всех анализируемых пробах по каналу FAM свидетельствует об эффективности стадии выделения РНК из анализируемого материала (рисунок 2А).

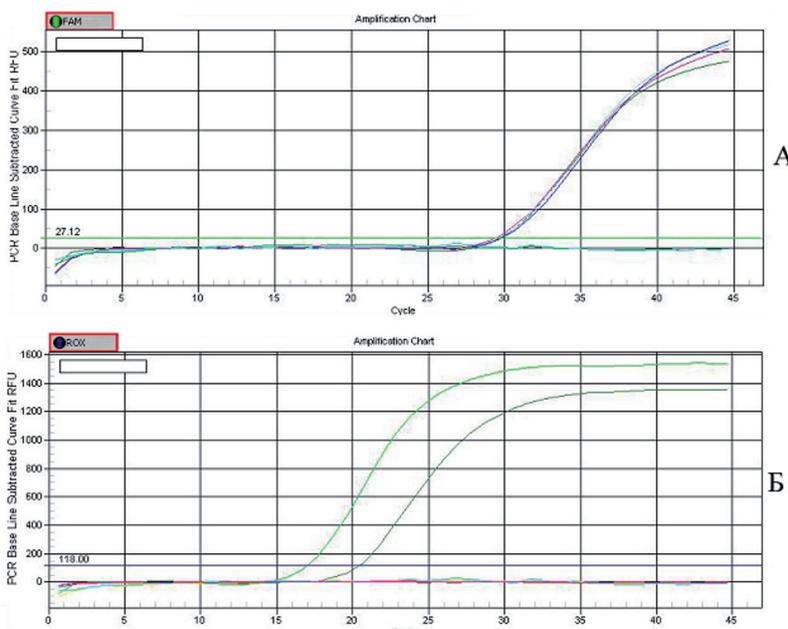


Рисунок 2. — Результат амплификации с использованием ПЦР-смеси-2/DOV/ВКО

В связи с тем, что наибольшее количество регистрируемых случаев ГЛПС и наиболее высокий уровень носительства отмечаются в Могилевском районе, а Горецкий район непосредственно гра-

ничит со Смоленской областью Российской Федерации, в которой регистрируется достаточно высокий уровень заболеваемости ГЛПС (6,3 и 3,59 на 100 тыс. населения в 2013–2014 гг. соответственно) и где выявлена циркуляция вирусов Пуумала и Добrava [5], в первую очередь, в данных очагах был проведен отлов мышевидных грызунов, являющихся природными хозяевами возбудителей ГЛПС.

С использованием тест-системы «Белар-ГЛПС-ПЦР/РВ» методом От-ПЦР в режиме «реального времени» было проанализировано по 25 проб легких грызунов, отловленных в природных очагах Могилевского и Горецкого районов Могилевской области.

В результате из 25 проанализированных проб органов грызунов, отловленных на территории Могилевского района, РНК вируса Пуумала была выявлена в 1 пробе. В результате постановки ПЦР в режиме «реального времени» только в 1 пробе по каналу FAM регистрируется продукт специфической амплификации в виде кривой флуоресценции, что свидетельствует о наличии генетического материала вируса Пуумала (рисунок 3).

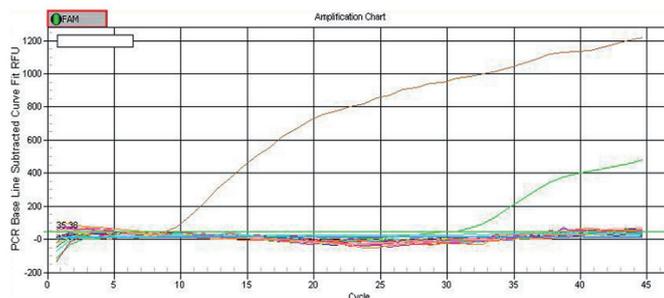


Рисунок 3. — Результат ПЦР-анализа проб легких грызунов, отловленных на территории Могилевского района

В то же время в пробах легких грызунов, отловленных в Горецком районе, в 2 образцах была выявлена РНК вируса Пуумала (регистрация кривых флуоресценции по каналу FAM), и в 3 пробах впервые была выявлена РНК вируса Добrava (регистрация кривых флуоресценции по каналу ROX) (рисунок 4 А и Б).

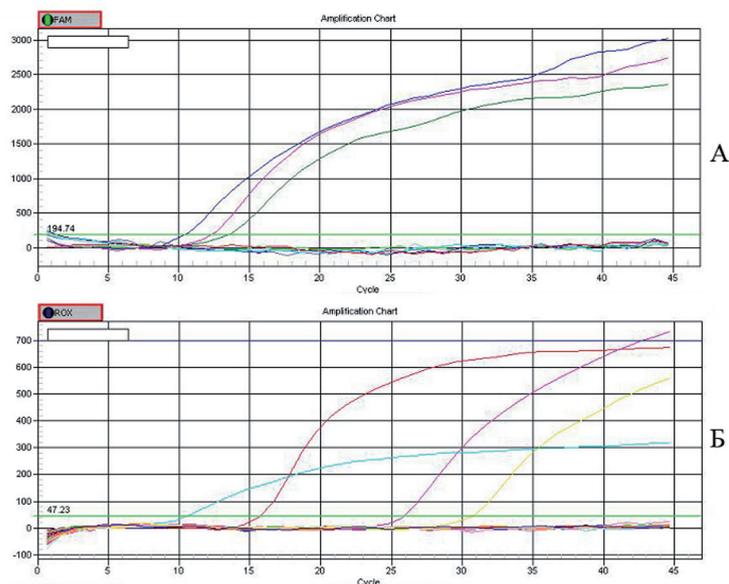


Рисунок 4. — Результат ПЦР-анализа проб легких грызунов, отловленных на территории Горецкого района

Высокий уровень зараженности грызунов возбудителем ГЛПС и наличие циркуляции не только вируса Пуумала, но и вируса Добrava на территории Горецкого района, вероятно, связаны с приграничными территориями Смоленской области.

Заключение. В результате исследований показано, что тест-система для идентификации возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом методом обратной транскрипции-

полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» «Белар-ГЛПС-ПЦР/РВ» позволяет одновременно выявлять возбудителей ГЛПС различных серогрупп хантавирусов в полевом биоматериале (органы грызунов). Молекулярно-биологический анализ проб легких грызунов, отловленных в природных очагах на административных территориях Могилевской области, впервые выявил циркуляцию двух возбудителей ГЛПС — Пуумала и Добрава — на территории Республики Беларусь. Представленные данные свидетельствуют о возможности успешного использования тест-системы «Белар-ГЛПС-ПЦР/РВ» для мониторинговых исследований в природных очагах, позволяя сформировать наиболее полную картину о распространении возбудителей ГЛПС — хантавирусов Пуумала, Добрава, Хантаан.

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. Государственный санитарный надзор в области общей инфекционной и паразитарной заболеваемости // Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Беларусь в 2015 году». — Минск: РЦГЭиОЗ, 2016. — Разд. III. — С. 37.
3. Ежемесячные и годовые отчеты УЗ «Могилевский облЦГЭиОЗ» (форма 6).
4. Лабораторная диагностика геморрагической лихорадки с почечным синдромом: инструкция по применению № 116-1210: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 24.12.2010. — Минск, 2010. — 15 с.
5. Обзорная информация об инфекционной заболеваемости в Брянской области [Электронный ресурс] / Упр. Федерал. службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Брянской обл. — Режим доступа: <http://www.32.rospotrebnadzor.ru/content/category/9/42/99/>. — Дата доступа: 09.09.2016.

MOLECULAR AND BIOLOGICAL METHODS USAGE FOR DETECTION OF CAUSATIVE AGENTS OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME IN NATURAL FOCI OF MOGILEV REGION

Scheslenok E.P.¹, Semizhon P.A.¹, Omelyanovich O.G.², Voitenko N.T.², Chaika A.V.², Vladyko A.S.¹

*¹State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology",
Minsk, Republic of Belarus;*

*²Institution of Health "Mogilev Region Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health",
Mogilev, Republic of Belarus*

Dobrava virus RNA was first detected in probes of biological material (rodent's lungs) in Belarus using the methods of molecular biology. The presence of two HFRS causative agents — Puumala and Dobrava viruses has been shown in Mogilev region (Goretsky district). The possibility of using the reverse transcription real-time PCR kit "Belar-HFRS-PCR/RT" for simultaneous identification of HFRS causative agents has been proved.

Keywords: HFRS, hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS morbidity, natural hosts of HFRS causative agents, PCR diagnostic.

Поступила 09.09.2016

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ НЕПРЯМЫХ МАРКЕРОВ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ В

Терешков Д.В.¹, Мишура В.М.²

¹Учреждение «Гомельская областная инфекционная клиническая больница», Гомель, Республика Беларусь

*²Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»,
Гомель, Республика Беларусь*

Реферат. Обследован 41 пациент с хроническим гепатитом В (ХГВ) с известной стадией фиброза. Учитывались 9 показателей гемограммы и биохимического анализа крови, а также 8 индексов, рассчитанных на их основе. Прогностическая значимость непрямых показателей фиброза оценивалась с помощью ROC анализа. С нарастанием стадии фиброза снижался уровень тромбоци-

тов, холестерина, альбумина, повышались уровни RDW, АСТ, ГГТП. Показатели индексов Forns, S-index, FIB-4, Virahep-C model, APRI, АСТ/АЛТ, RDW/Тр, MPV/Тр значимо различаются у пациентов с минимальным (F0-F1) и выраженным (F2-F4) фиброзом печени ($p < 0,05$). Наиболее значимы для прогноза выраженного фиброза печени индексы Forns, Virahep-C model, FIB-4 и S-индекс.

Ключевые слова: хронический гепатит В, фиброз печени, непрямые маркеры фиброза.

Введение. Фиброз печени при хронических вирусных гепатитах длительное время протекает бессимптомно, часто пациенты обращаются за медицинской помощью только при развитии цирроза и его осложнений. В настоящее время известно, что фиброз печени является обратимым процессом. Терапия хронических гепатитов направлена, в первую очередь, на ослабление действия этиологического фактора или его устранение. Наглядными примерами служат успехи противовирусной терапии хронических вирусных гепатитов, достигнутые в последние годы. Такой подход позволяет прекратить повреждение печени и прогрессирование фиброза и даже добиться обратного развития выраженного фиброза [1, 2].

Одним из важных критериев для принятия решения о начале противовирусной терапии при ХГВ является информация о стадии фиброза печени. Противовирусная терапия рекомендуется, если имеется фиброз печени 2 стадии (F2) и выше [3]. Традиционно для оценки выраженности фиброза печени используется биопсия печени. Несмотря на то, что биопсию печени считают «золотым стандартом» при оценке заболеваний печени, этот метод имеет и существенные недостатки. Биопсия печени является дорогим и инвазивным исследованием с риском потенциально опасных для жизни осложнений (летальность после выполнения процедуры достигает 0,1%). Изменения в печени обычно неоднородны и выражены в различной степени, поэтому оценка фиброза на основании исследования небольшого фрагмента печеночной ткани может быть неточной [2, 4, 5]. Имеет значение и опыт морфолога, что не позволяет исключить наличие субъективного фактора. Данные ограничения не позволяют использовать биопсию для оценки прогрессирования фиброза печени и эффективности терапии, а также для массового скрининга [2, 5].

В связи с этим растет интерес к использованию неинвазивных методов оценки выраженности печеночного фиброза, которые потенциально дают более развернутую оценку поражения печени и могут использоваться вместо биопсии или как дополнение к ней [2, 3, 5]. Кроме того, они являются более безопасными, дешевыми и привлекательными для пациентов, чем биопсия [4, 5]. Все это требует поиска надежных неинвазивных методов диагностики фиброза как при первичном обследовании пациентов, так и при последующем мониторинге.

Неинвазивные методы исследования фиброза печени базируются на двух разных подходах: «биологический» (основан на количественном определении биомаркеров в сыворотке) и «физический», который базируется на измерении плотности ткани печени (эластография). В настоящее время накоплены убедительные данные о возможности использования неинвазивных методов для оценки степени фиброза печени у пациентов с ХГВ. Определение комплекса биомаркеров или комбинация анализа крови с эластографией повышает точность диагностики фиброза и уменьшает необходимость проведения биопсии печени [3, 5].

Оценка фиброза печени может быть проведена с помощью транзитной эластографии (ТЭ), которая выполняется быстро, имеет хорошую воспроизводимость результатов, проста в применении и безопасна. Ограничением для ТЭ является невозможность получения достоверных результатов при наличии у пациента ожирения или асцита. Эластография сдвиговой волны позволяет лучше оценить плотность печени и больше подходит для пациентов с ожирением или асцитом, чем ТЭ. Однако точность результатов исследования также зависит от приема пищи, уровней сывороточных аминотрансфераз и опыта оператора [5].

Биомаркеры фиброза обычно разделяют на прямые и непрямые, они могут быть использованы по отдельности или в комбинации [2, 4, 6]. К прямым маркерам фиброза относят продукты синтеза и распада печеночного матрикса (гиалуроновая кислота, гликопротеины, коллагены, матриксные металлопротеиназы и другие). Однако указанные маркеры не являются строго специфичными для печени, а определение их в периферической крови имеет высокую стоимость [2, 6]. Непрямые сывороточные маркеры — это показатели функции печени, которые не отражают напрямую метаболизм внеклеточного матрикса. В указанную группу входят: аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратаминотрансфераза (АСТ), гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП), билирубин, протромбин, аль-

бумин, холестерин (ХС), аполипопротеин А1, гаптоглобин, а также количество тромбоцитов (Тр) [2, 6]. В настоящее время предложены различные шкалы и индексы, которые можно использовать для оценки стадии фиброза печени на основании определения непрямых сывороточных маркеров. Наиболее известными из них являются: индекс Forns (возраст, Тр, ГГТП, ХС), индекс FIB-4 (АСТ, АЛТ, Тр, возраст), а также индекс APRI (соотношение АСТ/Тр) и коэффициент де Ритиса (соотношение АСТ/АЛТ) [2, 5, 6]. Подсчет таких индексов может быть простым или основанным на сложных запатентованных формулах (например, тесты FibroTest/FibroSure) [5, 6].

В последние годы появился ряд публикаций о зависимости некоторых показателей гемограммы (RDW, MPV) от степени выраженности фиброза печени при ХГВ [7–9]. Red blood cell distribution width (RDW) — это показатель гемограммы, который отражает гетерогенность размеров эритроцитов (анизоцитоз). Mean platelet volume (MPV) позволяет оценить средний размер тромбоцитов и является индикатором тромбоцитопоза. Эти параметры входят в состав полного анализа крови, определяемого с помощью автоматического гемоанализатора, и, как правило, остаются без внимания практикующих врачей. Было установлено, что RDW и MPV, а также индексы RDW/Тр и MPV/Тр значительно выше у пациентов, инфицированных вирусом гепатита В, коррелируют с выраженностью фиброза печени и могут служить предиктором выживаемости пациентов с HBV-ассоциированным циррозом печени [7–9].

В настоящее время в Республике Беларусь применяются методы эластографии сдвиговой волны (недоступен в областных и районных центрах) и FibroTest, имеющие высокую стоимость, поэтому представляют интерес методы неинвазивной диагностики фиброза у пациентов с ХГВ, основанные на показателях, выполняемых в любой клинической лаборатории.

Цель работы — оценка значения непрямых маркеров для определения выраженности фиброза печени у пациентов с ХГВ.

Материалы и методы. На базе Гомельской областной инфекционной клинической больницы был обследован 41 пациент с ХГВ. Характеристика обследованных пациентов: 26 мужчин (63,4%) и 15 женщин (36,6%), средний возраст — $42,2 \pm 2,4$ года. У 34 пациентов оценка степени выраженности фиброза согласно шкале METAVIR от F0 (отсутствие фиброза) до F4 (цирроз печени) проводилась на основании биопсии печени либо непрямых методов (фиброэластометрия, FibroTest). Также дополнительно в исследование включены 7 пациентов с достоверно клинически верифицированным циррозом печени (F4). У всех пациентов определяли показатели гемограммы (Тр, MPV, RDW) и биохимического анализа крови (АЛТ, АСТ, ГГТП, щелочная фосфатаза (ЩФ), ХС, альбумин). Определялись индексы АСТ/АЛТ (коэффициент де Ритиса) и APRI, который рассчитывался по формуле: $APRI = (АСТ / \text{верхняя граница нормы АСТ}) \times 100 / Тр$ [2, 5]. Также были рассчитаны: индекс Forns = $7,811 - 3,131 \times \ln(Тр) + 0,781 \times \ln(ГГТП) + 3,467 \times \ln(\text{возраст, годы}) - 0,014 \times (ХС)$ [2, 5]; индекс FIB-4 = $(\text{возраст, годы} \times АСТ) / (Тр \times \sqrt{АСТ})$ [2, 5]; S-index = $1000 \times ГГТП / (Тр \times \text{альбумин}^2)$ [10]; Virahep-C model = $-5,17 + 0,20 \times \text{раса} + 0,07 \times \text{возраст, годы} + 1,19 \ln(АСТ) - 1,76 \ln(Тр) + 1,38 \ln(ЩФ)$, где раса европеоиды – 1, афроамериканцы – 0 [5]; отношения MPV / Тр и RDW / Тр [9].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета Statistica v.6.1 с использованием непараметрических статистических критериев (тест Манна–Уитни, ранговая корреляция по Спирмену), различия считались значимыми при $p < 0,05$. Для оценки прогностического значения показателей (ROC-анализ) использовалась программа MedCalc v.11.3.

Результаты и их обсуждение. Всего у пациентов исследуемой группы выявлены следующие стадии фиброза: F0 — 11 человек (26,8%), F1 — 11 (26,8%), F2 — 6 (14,7%), F3 — 3 (7,3%) и F4 — 10 (24,4%). Проведен корреляционный анализ по Спирмену некоторых лабораторных показателей со степенью фиброза печени (F0-F4).

С нарастанием стадии фиброза снижался уровень тромбоцитов ($r_s -0,55$; $p = 0,0002$), холестерина ($r_s -0,50$; $p = 0,0009$), альбумина ($r_s -0,47$; $p = 0,003$), повышались уровни RDW ($r_s 0,55$; $p = 0,0002$), АСТ ($r_s 0,47$; $p = 0,002$), ГГТП ($r_s 0,37$; $p = 0,02$). Корреляция стадии фиброза печени с уровнями MPV, АЛТ, ЩФ отсутствовала.

Показатели индексов также указывали на значимую положительную корреляционную связь со степенью фиброза печени: APRI ($r_s 0,62$; $p < 0,0001$), Forns ($r_s 0,72$; $p < 0,0001$), FIB-4 ($r_s 0,66$; $p < 0,0001$), S-index ($r_s 0,64$; $p < 0,0001$), Virahep-C model ($r_s 0,65$; $p < 0,0001$), RDW/Тр ($r_s 0,57$; $p < 0,0001$), MPV/Тр ($r_s 0,46$; $p = 0,003$), АСТ/АЛТ ($r_s 0,34$; $p = 0,03$).

Пациенты были разделены на 2 группы: 1-я — без фиброза и с минимальным фиброзом (F0-F1, n = 22) и 2 — с выраженным и тяжелым фиброзом, включая цирроз печени (F2-F4, n = 19). Сравнивались показатели индексов для оценки фиброза у пациентов этих двух групп с помощью теста Манна–Уитни, результаты представлены в виде: медиана (Me) и интерквартильный размах (25%; 75%) (таблица 1).

Таблица 1. — Сравнение показателей индексов в зависимости от выраженности фиброза печени

Индекс	1-я группа (F0-F1), n = 22	2-я группа (F2-F4), n = 19	p
ACT/АЛТ	0,61 (0,50; 0,88)	0,95 (0,59; 1,28)	0,026
APRI	0,50 (0,37; 0,81)	1,55 (0,59; 2,09)	0,003
Forns	5,94 (4,74; 7,00)	9,15 (7,49; 10,38)	<0,001
FIB-4	0,75 (0,55; 1,24)	2,83 (1,52; 5,25)	<0,001
S-index	0,09 (0,06; 0,12)	0,31 (0,14; 0,42)	0,001
Viraher-C model	-1,58 (-2,50; -0,34)	1,86 (0,06; 3,09)	<0,001
RDW/Тр	0,06 (0,05; 0,08)	0,10 (0,06; 0,18)	0,005
MPV/Тр	0,06 (0,05; 0,07)	0,08 (0,05; 0,13)	0,026

Учитывая, что показатели всех индексов достаточно сильно различались в представленных группах (p<0,05), было решено оценить их значимость для прогноза выраженного фиброза (F2-F4). С помощью ROC-анализа оценивалось прогностическое значение данных показателей на основе сравнения площадей под характеристической кривой (ППК). Оценивались площадь под кривой, 95% доверительный интервал (ДИ) оценки площади, находилась точка разделения, оценивалась чувствительность (Чв) и специфичность (Сп) параметра при использовании найденной точки разделения. Данные в порядке убывания показателя ППК представлены в таблице 2.

Таблица 2. — Прогностическое значение показателей индексов для определения выраженного фиброза (F2-F4) у пациентов с ХГВ

Показатель	ППК	95% ДИ	Точка разделения	Чв, %	Сп, %
Forns	0,886	0,748–0,964	>7,48	79,0	90,9
Viraher-C model	0,856	0,712–0,946	>-0,34	89,5	77,3
FIB-4	0,847	0,700–0,940	>1,87	73,7	95,5
S-index	0,807	0,644–0,918	>0,13	76,5	85,0
APRI	0,773	0,615–0,889	>0,99	68,4	90,9
RDW/Тр	0,756	0,597–0,876	>0,08	57,9	90,9
ACT/АЛТ	0,701	0,538–0,834	>0,75	73,7	68,2
MPV/Тр	0,688	0,524–0,823	>0,09	42,1	100

Для пациентов с ХГВ прогностическую ценность имеют все исследованные показатели не прямых маркеров фиброза печени. Наиболее значимыми (ППК>0,8) оказались индекс Fornс, Viraher-C model, FIB-4 и S-индекс.

Полученные результаты согласуются с данными литературы и позволяют рекомендовать использование не прямых маркеров фиброза, основанных на доступных для любой клинической лаборатории показателях, для выявления выраженного фиброза печени у пациентов с ХГВ. Данное исследование неинвазивно, достаточно информативно и может применяться для динамического мониторинга, а также для отбора пациентов с целью дообследования (фиброэластография, а в спорных или неясных случаях — биопсия печени) и своевременной противовирусной терапии.

Заключение:

1. С возрастанием степени фиброза печени у пациентов с ХГВ снижается уровень тромбоцитов, холестерина и альбумина в периферической крови, нарастает уровень RDW, ACT, ГГТП. Показатели

затели индексов Forns, S-index, FIB-4, Virahep-C model, APRI, RDW/Тр, MPV/Тр, АСТ/АЛТ значительно различаются у пациентов с минимальным (F0-F1) и выраженным (F2-F4) фиброзом печени.

2. Для пациентов с ХГВ наиболее значимы для прогноза выраженного фиброза печени индексы Forns, Virahep-C model, FIB-4 и S-индекс.

3. Определение непрямых маркеров фиброза печени у пациентов с ХГВ легко выполнимо на любом этапе оказания медицинской помощи и может использоваться для динамического мониторинга, а также для своевременной противовирусной терапии.

Литература

1. Hepatic fibrosis: Concept to treatment / С. Trautwein [et al.] // J. Hepatol. — 2015. — Vol. 62, suppl. 1. — P. 15–24.

2. Шептулина, А.Ф. Неинвазивная диагностика фиброза печени: роль сывороточных маркеров / А.Ф. Шептулина, Е.Н. Широкова, В.Т. Ивашкин // Рос. журн. гастроэнтерологии. — 2015. — № 2. — С. 28–40.

3 EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection / J. Hepatol. — 2012. — Vol. 57, № 1. — P. 167–185.

4. Шифф, Ю. Введение в гепатологию / Ю. Шифф, М. Соррел, У. Мэддрей; под ред. В.Т. Ивашкина [и др.]. — М.: ГЭОТАР, 2011. — С. 122–140.

5. EASL-ALEN Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis // J. Hepatol. — 2015. — Vol. 63, № 1. — P. 237–264.

6. Федоров, П.Н. Лабораторные маркеры фиброза печени / П.Н. Федоров, Н.А. Беляков // Мед. акад. журн. — 2014. — Т. 14, № 1. — С. 16–23.

7. Red cell distribution width as a potential index to assess the severity of hepatitis B virus-related liver diseases / R. Huang [et al.] // Hepatol. Res. — 2014. — Vol. 44, № 14. — P. 464 – 470.

8. Evaluation of mean platelet volume in patients with hepatitis B virus infection / Y. Hu [et al.] // Int. J. Clin. Exp. Med. — 2014. — Vol. 7, № 11. — P. 4207–4213.

9. Clinical usefulness of mean platelet volume and red blood cell distribution width to platelet ratio for predicting the severity of hepatic fibrosis in chronic hepatitis B virus patients / E. Karagoz [et al.] // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. — 2014. — Vol. 26, № 12. — P. 1320–1324.

10. Simpler score of routine laboratory tests predicts liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B / K. Zhou [et al.] // J. Gastroenterol. Hepatol. — 2010. — Vol. 25, № 9. — P. 1569–1577.

THE DIAGNOSTIC VALUE OF INDIRECT MARKERS OF LIVER FIBROSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B

Tserashkou D.V.¹, Mitsura V.M.²

¹*Gomel Regional Infectious Clinical Hospital, Gomel, Republic of Belarus;*

²*Educational Establishment “Gomel State Medical University”, Gomel, Republic of Belarus*

Aim: to assess the significance of indirect markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B (CHB).

Methods. We investigate 41 patients with CHB having known liver fibrosis stage based on liver biopsy or indirect methods (fibroelastography, FibroTest). The 9 parameters of complete blood count and biochemical blood analysis along with 8 indices calculated on their base were considered. Their prognostic values were evaluated by means of ROC analysis.

Results. In patients with CHB according to fibrosis stage enhance, the platelet count, cholesterol, albumin reduce and RDW, AST, GGT rise ($p < 0.05$). Forns, S-index, FIB-4, Virahep-C model, APRI, RDW/PLT, MPV/PLT, AST/ALT indices were significantly different ($p < 0.05$) in patients with minimal (F0-F1) and severe (F2-F4) fibrosis. For patients with CHB the most significant predictors of advanced liver fibrosis (F2-F4) were: Forns index, Virahep-C model, FIB-4 and S-index.

Conclusion. The assessment of liver fibrosis in patients with CHB can be easily performed at any stage of care; they are quite informative and can be used for the selection of patients for the purpose of further examination and timely conducting antiviral therapy.

Keywords: chronic hepatitis B, liver fibrosis, indirect markers of liver fibrosis.

Поступила 30.06.2016

ВИРУС ЛИМФОЦИТАРНОГО ХОРИОМЕНИНГИТА: СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА И АКТУАЛЬНОСТЬ ДЛЯ БЕЛАРУСИ

Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е., Владыко А.С.

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

Реферат. В обзоре представлены сведения о строении вируса лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ), особенностях его распространения, описано значение вируса в качестве экспериментальной модели для биологических исследований, отражены проблемы в области трансплантологии, связанные с инфицированием вирусом ЛХМ, приведены данные об особенностях врожденной и приобретенной инфекции, вызываемой вирусом в организме человека.

Ключевые слова: вирус лимфоцитарного хориоменингита, экспериментальная модель, трансплантология, врожденная и приобретенная инфекция.

Введение. Вирус лимфоцитарного хориоменингита был выделен в 1933 г. Чарльзом Армстронгом и коллегами из спинномозговой жидкости пациента во время изучения ими вспышки энцефалита, произошедшей в городе Сент-Луис [1]. Свое название вирус получил в соответствии с наблюдавшимися симптомами: лимфоцитозом и воспалением оболочек головного (включая сосудистое сплетение, выстилающее внутримозговые желудочки) и спинного мозга. Несколькими годами позже было установлено, что вирус ЛХМ вызывает асептический менингит [2], а также идентичен инфекционному агенту, который хронически поражает колонии мышей [3].

К 1960-м гг. были обнаружены несколько других вирусов с общими морфологическими, серологическими и биохимическими свойствами. Эти находки привели к выделению в 1970 г. нового семейства вирусов *Arenaviridae* [4]. Согласно современной таксономии, семейство *Arenaviridae* содержит единственный род *Arenavirus*, который включает 24 вида [5, 6].

В соответствии с серологическими, филогенетическими и географическими данными аренавирусы разделяют на две подгруппы: аренавирусы «старого света», обнаруживаемые в Европе и Африке, и ареновирусы «нового света», эндемичные для Северной и Южной Америки. Все классифицированные в настоящее время аренавирусы переносятся грызунами, за исключением вируса Такарибе, который переносят летучие мыши. По крайней мере десять из этих вирусов могут заражать человека, вызывая различные по степени тяжести инфекции [6].

Заболевания, вызываемые аренавирусами, как правило, локализованы в эндемичных очагах, определяемых присутствием природного хозяина. Вирус ЛХМ является исключением и характеризуется повсеместным распространением через домовых мышей из семейства мышевидных грызунов *Muridae* или хомяков из семейства хомякообразных *Cricetidae*. Вирус распространен в Европе, Северной и Южной Америке [5, 7], Азии [8, 9], в последнее время встречается в странах Африки [10].

Строение вируса ЛХМ. Вирус ЛХМ является РНК-содержащим вирусом с бисегментированным геномом. Вирионы сферические или плеоморфные. Размер варьирует от 40 до 200 нм; в среднем составляет 90–110 нм. Вирионы окружены плотной липидной оболочкой, поверхность покрыта равномерно распределенными характерными булавовидными структурами, образованными вирусными гликопротеинами (GP-1; GP-2), посредством которых инициируется связывание вируса с клеточными рецепторами и его проникновение в клетку. Поверхностные гликопротеины связаны с Z-белком, прилежащим к мембране с внутренней стороны. Вирусные рибонуклеопротеины упакованы в две кольцевидные структуры и связаны с РНК-зависимой РНК-полимеразой (L-полимераза).

Геном вируса ЛХМ сегментированный и представлен однонитевой линейной РНК, состоящей из двух фрагментов: L (от англ. large — большой, приблизительно 7,2 kb) и S (от англ. small — маленький, приблизительно 3,5 kb). РНК S-фрагмента кодирует капсидный вирусный нуклеопротеин (NP, приблизительно 63 kDa) и предшественник гликопротеинов (GPC, приблизительно 75 kDa), тогда как РНК L-фрагмента кодирует вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp, или L-белок, приблизительно 200 kDa) и небольшой Z-белок (приблизительно 11 kDa). Кодировочные области разделены некодирующей межгенной областью (IGR), которая формирует устойчивую шпильчатую структуру. Каждый геномный фрагмент использует «амбисенс» стратегию кодирования. 3'-участок обоих сегментов генома — это минус цепь, в то время как 5'-участок позволяет напрямую транслировать белки и, соответственно, является положительной цепью [7].

Значение вируса ЛХМ для биологических исследований. История вируса лимфоцитарного хориоменингита тесно коррелирует с развитием современной иммунологии и вирусологии. На основании исследований с использованием вируса ЛХМ в качестве патогена был сформулирован ряд ключевых концепций иммунологии: рестрикция по главному комплексу гистосовместимости, иммунологическая толерантность, активность CD 8+ и CD 4+ Т-лимфоцитов и их роль в иммунопатологии, истощение Т-лимфоцитов, иммунологическая память, роль иммунной патологии в развитии заболевания [5, 11]. Ввиду поражения определенных видов Т-лимфоцитов вирус ЛХМ относят к возбудителям инфекции, вызывающей «малый иммунодефицит». В таком организме «банальные» инфекции протекают значительно тяжелее, чем у людей, не пораженных вирусом.

Исследования с использованием в качестве модели вируса ЛХМ позволили раскрыть значительную часть современных представлений о патогенезе вирусных инфекций, в т. ч. персистирующих, а также показали возможность вирусной причастности к заболеваниям с неясной этиологией, возникающим в человеческой популяции. Качественно полезной в научном плане особенностью является существование штаммов вируса ЛХМ, которые тесно связаны генетически, но различаются по своей способности вызывать персистирующую инфекцию *in vivo*, что позволяет в сравнительном аспекте изучать механизмы, лежащие в основе патогенеза самоограничивающейся (при успешном иммунном ответе) и персистирующей инфекции (при неэффективной иммунной защите) [12].

Распространенность вируса ЛХМ в природной среде. Естественным хозяином и основным природным резервуаром для вируса ЛХМ являются различные виды домашних мышей — *Mus musculus* и *Mus domesticus*, которые распространены по всему миру. Вирус также встречается у европейской лесной мыши (*Apodemus sylvaticus*) и желтогорлой мыши (*Apodemus flavicollis*). Хомяки и другие домашние грызуны могут заражаться от мышей и являться важным источником инфицирования человека. Вирус патогенен для приматов (макак, мартышек) и собак [5, 7].

Вирус передается вертикально от одного поколения к другому в пределах популяции мышей посредством внутриутробного инфицирования. У мышей, инфицированных внутриутробно, не активируется иммунный ответ и развивается хроническое, бессимптомное течение инфекции. При жизни мыши выделяют вирус в больших количествах с носовым секретом, слюной, молоком, мочой и фекалиями, заражая при этом окружающие предметы [13].

Инфекция, вызванная вирусом ЛХМ, в природных условиях, как правило, носит очаговый характер. Этот вирус часто распространяется в одной популяции грызунов, не затрагивая другие. Согласно имеющимся литературным данным [5, 8–10, 14, 15], оценки распространенности вируса ЛХМ в популяциях диких мышей находятся в диапазоне от 0 до 30% (таблица 1).

Таблица 1. — Распространенность вируса ЛХМ в различных странах мира

Страна	Степень инфицированности грызунов, %	Доля серопозитивных лиц среди населения, %
США	3,9–14,4	5,0
Канада	–	4,0
Испания	9,0	1,7
Италия	5,6	2,5
Германия	3,6	1,7–9,1
Словакия	–	37,5
Хорватия	–	36,0
Китай	3,8	–
Япония	7,0–25,9	–
Аргентина	12,9	1,0–3,6
Колумбия	0	

Заражение человека происходит алиментарным и аэрогенным путем. Передача вируса ЛХМ от человека к человеку нехарактерна, за исключением вертикальной передачи от матери плоду, а также случаев, связанных с трансплантацией органов.

Обычно регистрируются спорадические случаи инфекций, вызванных вирусом ЛХМ, последний из которых описан в 2016 г. [16], но возможны и ограниченные эпидемические вспышки. Самая крупная вспышка заболеваемости была зарегистрирована в 1973–1974 гг. в США: 181 случай в 12 штатах. Последняя произошла летом 2012 г. в США и была связана, как предполагается, с внесением вируса ЛХМ в популяцию размножающихся в неволе мышей дикими грызунами; 31 сотрудник трех центров по разведению грызунов был заражен вирусом ЛХМ, асептический менингит был диагностирован у 4 человек [13].

Частота встречаемости клинически значимой инфекции среди людей в настоящее время не определена. Согласно данным серологических исследований, в среднем примерно у 4,7–10% населения США и ряда стран Европы выявляются антитела к вирусу ЛХМ [5, 7]. Однако этот процент существенно варьирует в различных странах, а также в отдельных регионах в пределах одного государства (таблица 1).

Особенности инфекции, вызванной вирусом ЛХМ. У иммунокомпетентных лиц инфицирование вирусом ЛХМ часто протекает бессимптомно или приводит к легкой гриппоподобной форме заболевания [7]. Симптомы появляются через 1–3 недели после заражения и включают лихорадку, озноб, тошноту, рвоту, головную и мышечную боль. В большинстве случаев болезнь проходит без лечения в течение нескольких дней. Примерно в 10–15% случаев заболевание прогрессирует до асептического менингита, реже — менингоэнцефалита. Необычные (без неврологических проявлений) формы инфекции включают панкреатит, артрит, паротит и перикардит.

Входными воротами инфекции являются слизистые оболочки верхних дыхательных путей, желудочно-кишечный тракт. Вирус размножается в регионарных лимфатических узлах, затем проникает в кровь и центральную нервную систему. Наибольший тропизм вирус проявляет к мягким мозговым оболочкам и сосудистым сплетениям желудочков мозга. Морфологически отмечается отечность, гиперемия и лимфоцитарная инфильтрация в мягких мозговых оболочках и прилегающих к ним зонах мозгового вещества. Выражены дистрофические и некротические изменения в нервных клетках, явления острого отека и набухания вещества головного мозга с нарушениями ликвородинамики. Патологические изменения обусловлены сочетанием эффектов репликации вируса и последующего иммунного ответа хозяина.

Инкубационный период при менингите продолжается от 5 до 12 дней. Заболевание начинается остро, с подъема температуры тела до 39–40°C, озноба, сильной головной боли, общей слабости, многократной рвоты. У большинства заболевших с первых дней проявляются гиперестезия, нарушение сна, ригидность затылочных мышц. Отмечают также слабые катаральные явления, светобоязнь, боли при движении глазных яблок. Менингеальный синдром может достигать максимальной выраженности уже в первые 1–2 сут, реже — нарастать постепенно, достигая максимума на 3–5-е сут болезни. Температурная кривая имеет двухволновый характер; начало второй волны совпадает с появлением менингеальных симптомов. На пике заболевания возможны скоропреходящие энцефалитические симптомы: парезы лицевого, глазодвигательного, отводящего и других черепных нервов, редко — судорожный синдром или потеря сознания. Характерно значительное уменьшение головных болей и рвоты после люмбальной пункции. В спинномозговой жидкости обнаруживаются выраженный лимфоцитарный цитоз, некоторое повышение содержания белка. В крови изменения малоинформативны. Чаще выявляются небольшая лейкопения, лимфоцитоз, небольшое повышение СОЭ.

Лихорадочный период продолжается от нескольких дней до 2–3 недель. Менингеальные симптомы могут сохраняться длительное время. В большинстве случаев болезнь протекает благоприятно и заканчивается полным выздоровлением. Возможны рецидивы. Общая летальность составляет менее 1%. Могут также встречаться редкие случаи менингоэнцефалита. Диагностика основывается на характерной клинической картине серозного менингита и результатах лабораторных исследований. В остром периоде болезни диагноз можно подтвердить выделением вируса из крови и спинномозговой жидкости [17].

Проблемы, связанные с вирусом ЛХМ, в трансплантологии. В случае передачи вируса ЛХМ при трансплантации органов инфицирование ассоциировано с наиболее тяжелыми формами заболевания. К настоящему времени сообщается о 6 кластерах инфекции, обусловленной передачей вируса ЛХМ при пересадке зараженных внутренних органов (2003–2013 гг.), последний из которых

был зафиксирован в США в 2013 г. Из 20 реципиентов, описанных в этих кластерах, 15 умерли от мультисистемной органной недостаточности, характерной особенностью которой являлся гепатит, ассоциированный с вирусом ЛХМ [18–20].

У пациентов, инфицированных вирусом при пересадке органов, в течение нескольких недель после трансплантации развиваются симптомы мультиорганного поражения — заболевание протекает в тяжелой форме и заканчивается, как правило, смертельным исходом. В случаях, зарегистрированных на сегодняшний день, первыми симптомами являлись: лихорадка, вялость, отсутствие аппетита и лейкопения, затем быстро прогрессировала мультисистемная органная недостаточность, печеночная недостаточность или тяжелый гепатит, дисфункция трансплантированных органов, коагулопатия, гипоксия, бактериемия и шок.

Врожденная инфекция, вызванная вирусом ЛХМ. В отличие от инфекции у взрослых, когда случаи тяжелых форм заболевания относительно редки, внутриутробное инфицирование вирусом ассоциировано с серьезными негативными последствиями для здоровья плода.

Заражение вирусом ЛХМ в течение I триместра беременности связано с повышенным риском спонтанных аборт. Заражение во II и III триместре беременности приводит к развитию врожденной внутриутробной инфекции, при которой наблюдаются гидроцефалия (в 89% случаев), макроцефалия (34–43%) или микроцефалия (13–38%), перивентрикулярные кальцификаты, церебральная дисплазия, гипоплазия мозжечка, нарушения зрения и хориоретинит (88–93%), задержка умственного развития, потеря слуха (7%) [21, 22].

В отличие от многих других врожденных инфекций вирус ЛХМ, как правило, не вызывает системных проявлений (гепатоспленомегалии, поражений сердца). Это отсутствие системных эффектов отражает сильный нейротропизм вируса в организме плода. Нейропатология, наблюдаемая у инфицированных плодов, никогда не наблюдалась у их матерей, что свидетельствует о высокой уязвимости головного мозга плода по сравнению со зрелым головным мозгом.

Первый случай врожденного хориоменингита был описан в Англии в 1955 г. В последующие десятилетия были зафиксированы множественные случаи по всему миру (к настоящему времени более 50). При этом приблизительно в половине случаев у матерей наблюдались клинические симптомы заболевания, контакт матерей с грызунами имел место в одной трети случаев.

Гидроцефалия и хориоретинит относятся к наиболее типичным поражениям при врожденном инфицировании вирусом ЛХМ. По имеющимся сведениям, летальность младенцев от осложнений данной врожденной инфекции составляет приблизительно 35%. Среди выживших детей более половины страдали от хронических неврологических нарушений, в т. ч. умственной отсталости, судорог, нарушений зрения.

Для выяснения механизмов врожденной инфекции, вызванной вирусом ЛХМ, была разработана экспериментальная модель заболевания на лабораторных животных. Она является ценным инструментом для изучения врожденной вирусной инфекции, т. к. позволяет достоверно воспроизвести весь спектр патологических состояний, наблюдаемых у внутриутробно зараженных людей.

Использование модели на животных позволило описать патогенез врожденной инфекции у человека. Вирус ЛХМ проникает в центральную нервную систему через сосудистое сплетение и реплицируется в эндимальных клетках и клетках перивентрикулярной матричной зоны. Репликация вируса приводит к некротическому эндимиту, что вызывает обструкцию ликворопроводящих путей и, как следствие, гидроцефалию. Показано, что вирус ЛХМ обладает выраженным тропизмом к митотически активным нейробластам. Наличие нейробластов в перивентрикулярной области головного мозга плода человека объясняет расположение перивентрикулярных кальцификатов у детей с врожденной инфекцией. Описанными в экспериментальной модели нарушениями миграции нейронов объясняются отражающие дефекты данного процесса аномалии развития извилин.

Установлено, что патогенные изменения, вызванные вирусом лимфоцитарного хориоменингита, опосредуются как влиянием вируса, так и неспецифическим повреждающим действием факторов иммунной защиты, главным образом, цитотоксическими Т-лимфоцитами. Именно иммунопатологические механизмы лежат в основе поражения сетчатки и развития офтальмологических нарушений у детей [23, 24].

В республике на настоящий момент эпидемиологические исследования распространенности вируса ЛХМ у беременных или новорожденных не проводились. Относительно высокая распространенность вируса в естественных популяциях грызунов, а также существенный процент серопо-

зитивных людей свидетельствуют о том, что врожденная инфекция, вызванная вирусом ЛХМ, является в настоящее время гиподиагностируемым заболеванием, а вирус ЛХМ — причиной значительно большего количества случаев врожденных неврологических и зрительных нарушений, чем предполагалось ранее.

Истинная распространенность врожденной инфекции неизвестна отчасти и потому, что симптоматика при данной патологии во многом имитирует врожденный токсоплазмоз и цитомегаловирусную инфекцию (таблица 2).

Таблица 2. — Характерные признаки различных врожденных инфекций [21]

Инфекция	Ретинопатия	Гидроцефалия	Микро- или макроцефалия	Внутричерепные кальцификаты	Глухота	Гепатоспленомегалия
Инфекция, вызванная вирусом ЛХМ	+++	+++	+++	+++	+	+
Токсоплазмоз	+++	+	+	++	+	++
Краснуха	+		+	±	+++	+++
Цитомегаловирусная инфекция	+		+++	+	+++	+++
Сифилис	+	±			+	+++

Частота встречаемости: ± очень редко; + нетипично; ++ относительно часто; +++ наиболее типично

Диагностика вируса ЛХМ. Вирус лимфоцитарного хориоменингита входит в десятку наиболее важных инфекционных агентов, вызывающих поражение центральной нервной системы, наряду с энтеро-, арбовирусами, вирусами герпеса, гриппа и парагриппа [25]. Согласно данным Европейской сети по диагностике завозных вирусных инфекций (European Network for Diagnostics of «Imported» Viral Diseases, ENIVD), диагностика вируса ЛХМ проводится в 15 странах Европы: Австрии, Чехии, Германии, Дании, Испании, Франции, Финляндии, Литве, Нидерландах, Италии, Греции, Болгарии, Португалии, Швеции, Словении. Основными методами диагностики лимфоцитарного хориоменингита являются: иммунофлуоресцентный анализ; иммуноферментный анализ; полимеразная цепная реакция; выделение вируса в культуре клеток и на животных; секвенирование вирусного генома; проточная цитометрия (визуализация внутриклеточного нуклеопротеина).

К сожалению, среди европейских стран, регистрирующих вирус лимфоцитарного хориоменингита, Беларусь отсутствует. В республике разработаны тест-системы как для выявления РНК-генома вируса ЛХМ методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, так и иммунобиологические тесты для обнаружения антител к вирусу ЛХМ у пациентов с подозрением вирусного лимфоцитарного хориоменингита, а также при оценке серопозитивного статуса населения страны.

Таким образом, учитывая высокий уровень серопозитивной прослойки населения в различных странах мира, повсеместный ареал распространения основного переносчика вируса лимфоцитарного хориоменингита и большой процент инфицированности грызунов, проблемы, создаваемые вирусом в быстро развивающейся трансплантологии, большой вклад вируса ЛХМ в инфекционную патологию центральной нервной системы, а также серьезные риски для здоровья детей при врожденном инфицировании вирусом ЛХМ, следует помнить об этом инфекционном агенте. Невидимый — не значит не существующий.

Литература

1. Armstrong, C. Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic / C. Armstrong, R.D. Lillie // Public Health Rep. — 1934. — Vol. 49, № 35. — P. 1019–1027.
2. Rivers, T. Meningitis in man caused by a filterable virus: II. Identification of the etiological agent / T. Rivers, T. Scott // J. Exp. Med. — 1936. — Vol. 63, № 3. — P. 415–432.

3. Traub, E. An epidemic in a mouse colony due to the virus of acute lymphocytic choriomeningitis / E. Traub // *J. Exp. Med.* — 1936. — Vol. 64, № 2. — P. 183–200.
4. Arenoviruses: proposed name for a newly defined virus group / W. Rowe [et al.] // *J. Virol.* — 1970. — Vol. 5, № 3. — P. 651–652.
5. Lapošova, K. Lymphocytic choriomeningitis virus: invisible but not innocent / K. Lapošova, S. Pastorekova, J. Tomašková // *Acta Virologica.* — 2013. — Vol. 57, № 1. — P. 160–170.
6. Zapata, J.C. Arenavirus variations due to host-specific adaptation / J.C. Zapata, M.S. Salvato // *Viruses.* — 2013. — № 5. — P. 241–278.
7. *Encyclopedia of Virology* / Ed.: B. Mahy, M. Van Regenmortel. — 3rd ed. — Oxford: Acad. Press, 2008. — 623 p.
8. Genomic analysis and pathogenic characteristics of lymphocytic choriomeningitis virus strains isolated in Japan / T. Takagi [et al.] // *Comparative Medicine.* — 2012. — Vol. 62, № 3. — P. 185–192.
9. RT-PCR detection and N gene sequence analysis of lymphocytic choriomeningitis virus in rodents / H.U. Qun [et al.] // *Chin. J. Vector Biol. & Control.* — 2013. — Vol. 24, № 6. — P. 483–485.
10. Evidence of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) in domestic mice in Gabon: risk of emergence of LCMV encephalitis in Central Africa / N. Dilimabaka [et al.] // *J. Virol.* — 2015. — Vol. 89, № 2. — P. 1456–1460.
11. Role of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) in understanding viral immunology: past, present and future / Xin Zhou [et al.] // *Viruses.* — 2012. — № 4. — P. 2650–2669.
12. Oldstone, M. Lessons learned and concepts formed from study of the pathogenesis of the two negative-strand viruses lymphocytic choriomeningitis and influenza / M. Oldstone // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2013. — Vol. 110, № 11. — P. 4180–4183.
13. Trace-forward investigation of mice in response to lymphocytic choriomeningitis virus outbreak / L. Edison [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* — 2014. — Vol. 20, № 2. — P. 291–295.
14. Hantavirus and arenavirus antibody prevalence in rodents and humans in Trentino, Northern Italy / H. Kallio-Kokko [et al.] // *Epidemiol. Infect.* — 2006. — Vol. 134, № 8. — P. 830–836.
15. Lymphocytic choriomeningitis virus-associated meningitis, Southern Spain / M. Pérez-Ruiz [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* — 2012. — Vol. 18, № 5. — P. 855–858.
16. Lymphocytic choriomeningitis virus meningoencephalitis from a household rodent infestation — Minnesota / P. Talley [et al.] // *Weekly.* — 2016. — Vol. 65, № 9. — P. 248–249.
17. Кареткина, Г.Н. Вирусные и бактериальные менингиты / Г. Н. Кареткина, Е. П. Деконенко // *Рус. мед. журн.* — 2000. — № 13–14. — С. 548–551.
18. Notes from the field: a cluster of lymphocytic choriomeningitis virus infections transmitted through organ transplantation — Iowa, 2013 / I.J. Schafer [et al.] // *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* — 2014. — Vol. 63, № 11. — P. 249.
19. Solid organ transplant-associated lymphocytic choriomeningitis / A. MacNeil [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* — 2012. — Vol. 18, № 8. — P. 1256–1262.
20. Encephalitis caused by pathogens transmitted through organ transplants, United States, 2002–2013 / S. Basavaraju [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* — 2014. — Vol. 20, № 9. — P. 1443–1451.
21. Barton, L. Congenital Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection: Decade of Rediscovery / L. Barton, M. Mets // *Clin. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 33, № 3. — P. 370–374.
22. Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: spectrum of disease / D. Bonthius [et al.] // *Ann. Neurol.* — 2007. — Vol. 62, № 4. — P. 347–355.
23. Immunopathological basis of lymphocytic choriomeningitis virus-induced chorioretinitis and keratitis / M. Zinkernagel [et al.] // *J. Virol.* — 2009. — Vol. 83, № 1. — P. 159–166.
24. Sun, T. Congenitally acquired persistent lymphocytic choriomeningitis viral infection reduces neuronal progenitor pools in the adult hippocampus and subventricular zone / T. Sun, M. Vasek, R. Klein // *PLoS ONE.* — 2014. — Vol. 9, № 5. — doi:10.1371/journal.pone.0096442.
25. Analysis of the surveillance situation for viral encephalitis and meningitis in Europe / O. Donoso Mantke [et al.] // *Eurosurveillance.* — 2008. — Vol. 13, № 1–3. — P. 1–10.

LYMPHOCYTIC CHORIOMENINGITIS VIRUS: STATE OF THE ISSUE AND ACTUALITY FOR BELARUS

Fomina E.G., Grigorieva E.E., Vladyko A.S.

*State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus*

The review focuses on the basic aspects of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) structure and transmission, its value as an experimental model for biological research, problems in transplantation associated with LCMV, characteristics of congenital and acquired LCMV infection in humans.

Keywords: lymphocytic choriomeningitis virus, experimental model, transplanted, congenital and acquired infection.

Поступила 30.08.2016

ВЫЯВЛЕНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ПОЛЕССКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ РАДИАЦИОННО-ЭКОЛОГИЧЕСКОМ ЗАПОВЕДНИКЕ

Цвирко Л.С.¹, Самойлова Т.И.², Красько А.Г.², Колтунова Ю.Б.², Карпук Л.И.³, Горбунов В.А.²

¹Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, Хойники, Республика Беларусь;

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

³Министерство здравоохранения Республика Беларусь, Минск, Республика Беларусь

Реферат. В статье приведены результаты выявления антигена вируса клещевого энцефалита (КЭ) методом иммуноферментного анализа в клещах, собранных на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника в эпидсезон 2016 г. Показано, что зараженность иксодовых клещей в зоне после аварии на ЧАЭС составляет в целом по заповеднику для *Dermacentor reticulatus* 63,6%, а для *Ixodes ricinus* — 25,0%.

Ключевые слова: иксодовые клещи, *Dermacentor reticulatus*, *Ixodes ricinus*, вирус клещевого энцефалита, зараженность, иммуноферментный анализ, Полесский государственный радиационно-экологический заповедник.

Введение. После образования в 1988 г. Полесского государственного радиационно-экологического заповедника на его территории начались мониторинговые исследования паразитологической ситуации, которые проводились сотрудниками Института зоологии НАН Беларуси под руководством А.Г. Лабеткой. Зоолого-паразитологическими исследованиями установлено значительное возрастание численности иксодовых клещей на территории заповедника [1–5]. В частности, в период весеннего пика численности клещей среднее количество членистоногих в сборах в 1994 г. составила 106,4 экз./учет при максимуме 389,0 экз./учет. Авторы отмечали преобладание на территории заповедника клеща *Dermacentor reticulatus*, в массе заселяющего зарастающие кустарниками открытые биоценозы, особенно осушенные торфяники и выселенные деревни.

Те же исследователи указывали на высокий уровень численности мелких млекопитающих — хранителей и доноров вируса КЭ. Из всех видов микромаммалей была выделена рыжая полевка, доминирующая в лесных биоценозах, и полевка-экономка, резко увеличившая численность за последние годы и встречающаяся не только в типичных для нее припойменных и болотных биоценозах, но и занявшая экологическую нишу обыкновенной полевки на осушенных торфяниках.

Исследованиями, проведенными в БелНИИЭМ Министерства здравоохранения Республики Беларусь Самойловой Т.И. и сотрудниками, начиная с 1986 г., было установлено, что на загрязненных радионуклидами территориях происходит циркуляция вируса КЭ, о чем свидетельствует факт изоляции возбудителя из внутренних органов мышевидных грызунов, отловленных в б.н.п. Бабчин и Красноселье. В дальнейшем при продолжении наблюдения за природными очагами наличие антигенов вируса КЭ выявлялось у клещей и мышевидных грызунов на всей территории зоны радиоактивного загрязнения [6].

В 1995 г. сотрудниками лаборатории эпиднадзора за арбовирусными инфекциями НИИ эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь совместно с сотрудниками Института зоологии НАН Беларуси были проведены сбор и вирусологическое обследование иксодовых клещей и мышевидных грызунов. Сбор материала проводился на территории заповедника (Хойникский, Брагинский и Наровлянский участки). Обследованием охвачены биоценозы, характерные для южной лесорастительной подзоны Беларуси: сосняки, дубравы, ольшаники, пойменные луга, осушенные болотные массивы. Изучалась также паразитологическая ситуация в выселенных деревнях зоны отчуждения ЧАЭС. В результате исследований антиген вируса КЭ зарегистрирован у клещей, обитающих на осушенном болоте (б.н.п. Бабчин) и пойменном лугу (б.н.п. Красноселье). Обследование мелких млекопитающих позволило обнаружить антиген вируса у 4 видов животных: рыжей полевки, полевки-экономки, желтогорлой и лесной мышей. Следует отметить

также, что из 8 обследованных биоценозов циркуляция вируса клещевого энцефалита установлена в 6, что свидетельствовало в пользу существования в заповеднике природного очага КЭ.

Таким образом, ранее проведенными зоолого-паразитологическими и вирусологическими исследованиями выявлена циркуляция вируса КЭ на территории Полесского радиационно-экологического заповедника [6–9]. В качестве переносчиков возбудителя инфекции установлены клещи *Dermacentor reticulatus*, резервуарами — мышевидные грызуны, в первую очередь, рыжая полевка и полевка-экономка. Учитывая тот факт, что инфицированные животные встречались в большинстве обследованных биоценозов, было сделано предположение о циркуляции вируса КЭ на всей территории заповедника.

Цель работы — оценка численности и степени зараженности имаго иксодовых клещей вирусом КЭ в зоне радиационного загрязнения Чернобыльской АЭС.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись иксодовые клещи, представленные в наших сборах двумя видами — *Dermacentor reticulatus* и *Ixodes ricinus*, собранные в марте–июне 2016 г. на территории Полесского радиационно-экологического заповедника. Изучение видового состава и численности иксодовых клещей проводили методом их сбора с растительности на флаг. Всего пройдено около 50 флагов-км. Прижизненное определение вида клещей проводилось визуально с помощью бинокля. Собранных клещей хранили в гигрокамерах — специально смонтированных пробирках, в которых для членистоногих была обеспечена оптимальная влажность.

Исследованию на зараженность возбудителем КЭ подверглись 420 клещей (41,1% от числа собранных), из них *D. reticulatus* — 386 экземпляров, *I. ricinus* — 34 экземпляра.

Для постановки иммуноферментного анализа (ИФА) полевой материал подвергали первичной обработке. Клещей распределяли по биопробам в зависимости от их вида и пола. В одну биопробу брали 8–25 экземпляров голодных самок и от 6 до 18 голодных самцов. Далее членистоногих тщательно отмывали фосфатным буферным раствором (рН = 7,0), растирали в фарфоровой ступке и готовили суспензии, которые затем исследовали методом ИФА на выявление в них антигена вируса КЭ [10]. При этом использовали диагностические иммуноферментные тест-системы Института вирусологии им. Д.И. Ивановского (г. Москва, РФ) согласно инструкции производителя.

Результаты и их обсуждение. Для исследований методом ИФА было взято 420 экземпляров (37 биопроб) иксодовых клещей, из них 386 (33 биопробы) — *D. reticulatus* и 34 (4 биопробы) — *I. ricinus*.

Исследование переносчиков методом ИФА позволило обнаружить антиген вируса КЭ в клещах *D. reticulatus* в 63,6% случаев, а в *I. ricinus* — в 25,0% в целом по заповеднику (таблица).

Таблица — Характеристика зараженности иксодовых клещей антигеном вируса клещевого энцефалита в Полесском радиационно-экологическом заповеднике по ИФА

Биотопы	Иксодовые клещи по видам					
	<i>D. reticulatus</i>			<i>I. ricinus</i>		
	биопробы/ экземпляры	кол-во положи- тельных	% положи- тельных	биопробы/ экземпляры	кол-во положи- тельных	% положи- тельных
Территории бывших населенных пунктов	13/131	11	84,6	2/18	1	50,0
Осушенные болота	8/105	6	75,0	0/0	0	0
Пойменный луг	3/52	1	33,3	0/0	0	0
Дубрава	4/40	1	25,0	2/16	0	0
Ольсы	5/58	2	40,0	0/0	0	0
Всего по заповеднику	33/386	21	63,6	4/34	1	25,0

Как видно из таблицы, наиболее высокие показатели выявления антигена вируса КЭ в клещах *D. reticulatus* были обнаружены на территории бывших населенных пунктов (84,6%) и на осушенных торфяниках (75,0%), где зарегистрирована самая высокая численность членистоногих в сборах 2016 г.

Что касается клещей *I. ricinus*, то зараженность вирусом КЭ обнаружена у клещей, собранных в б.н.п. Бабчин, и составила 50,0%. У клещей, собранных в дубравах в районе зубропитомника, антиген вируса КЭ не обнаружен.

Учеты численности кровососущих членистоногих (иксодовые клещи) с растительности проводились ежемесячно с марта по июнь на территории Хойникского и Наровлянского участков заповедника. Обследованы пойменные луга, дубравы, ольсы, осушенные торфяники и территории бывших населенных пунктов (б.н.п.) Воротец, Бабчин Хойникского участка, Тихин, Рожава, Довляды Наровлянского участка.

Всего собрано 1021 экземпляр иксодовых клещей двух видов: *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus*. Сборы на территории Хойникского участка составили 852 клеща, из них 77 — *I. ricinus* (47 самок, 30 самцов), 775 — *D. reticulatus* (476 самок, 294 самца, 5 нимфы). На территории Наровлянского участка собрано 169 клещей: 14 — *I. ricinus* (6 самцов, 8 самок), 155 — *D. reticulatus* (93 самки, 59 самцов, 3 нимфы) (рисунок 1).

Следует отметить преобладание в сборах на территории заповедника клеща *D. reticulatus*, в массе встречающегося на территории бывших населенных пунктов, зарастающих кустарниками, а из открытых биоценозов — на осушенных болотах (рисунок 1).

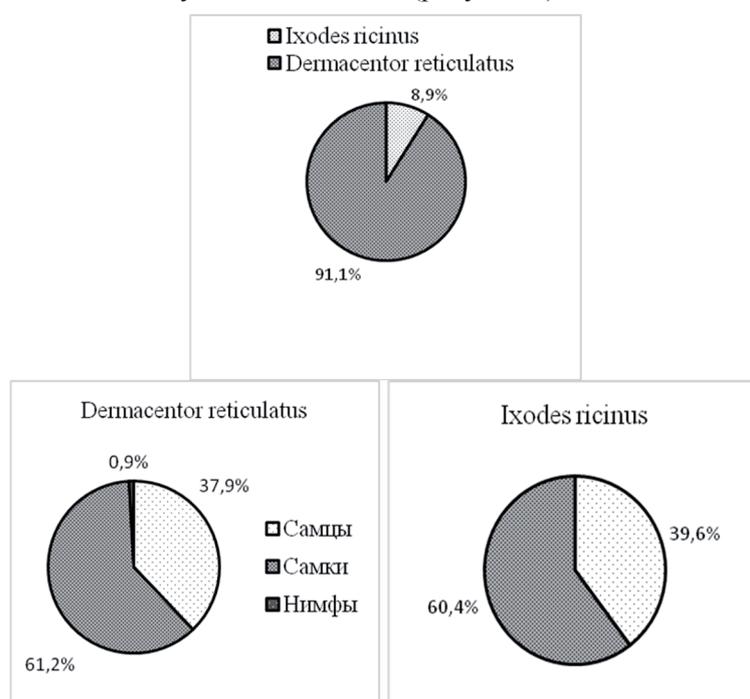


Рисунок 1. — Соотношение иксодовых клещей по видам и полу, собранных на территории Полесского радиационно-экологического заповедника в 2016 г.

Что касается значимости различных биотопов в поддержании численности имаго иксодовых клещей, то здесь основную роль играют территории бывших населенных пунктов и осушенных торфяников, которые характеризуются самыми высокими максимальными показателями относительной численности иксодид. Из обследованных биотопов наибольшая численность клещей (51,3%) зарегистрирована нами на территории б.н.п. Воротец и Бабчин Хойникского участка, Довляды, Рожава и Тихин Наровлянского участка и (17,5%) на осушенных землях заповедника (ур. Майдан) (рисунок 2).

Наибольшая численность клещей зарегистрирована в апреле, наименьшая — в июне. В период весеннего пика численности клещей (апрель–май) среднее количество членистоногих в сборах составило 60,4 экз./учет при максимуме 143,0 экз./учет. Средние показатели численности клещей *D. reticulatus* при рекогносцировочных обследованиях изучаемых биотопов заповедника составили от 0,5 экз. на фл.км (II декада июня 2016 г.) до 43,1 экз. на фл.км (II декада мая 2016 г.) Самые высокие показатели численности отмечались в б.н.п. Воротец во II декаде апреля 2016 г. (74,8 экз. на фл. км). Клещи *I. ricinus* впервые были обнаружены в сборах 19.04 2016. Максимальное их количество (28,0 экз. на фл.км) зарегистрировано в III декаде мая в дубраве (ур. Майдан).



Рисунок 2. — Численность иксодовых клещей в природных биотопах Полесского радиационно-экологического заповедника (сборы 2016 г.)

Заклучение. Таким образом, подводя итоги исследований, можно заключить, что вирус КЭ продолжает широко циркулировать на территории заповедника, о чем свидетельствует выявление антигена вируса в клещах, собранных во всех пяти обследованных природных биотопах территории, подвергшейся загрязнению радионуклидами. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшего мониторинга численности и зараженности иксодовых клещей возбудителями природно-очаговых инфекций, в первую очередь, клещевого энцефалита.

Литература

1. Динамика паразитокомплексов микромаммалий в зоне аварии ЧАЭС / К.М. Киреенко [и др.]. — Деп. В ОНП НПЭЦ «Верас-ЭКО» 18.01.1994. — 14 с.
2. Лабецкая, А.Г. Численность иксодовых клещей в Полесском радиационно-экологическом заповеднике / А.Г. Лабецкая, К.М. Киреенко // Тез. докл. радиобиол. съезда. — Пушино, 1993. — Ч. 2. — С. 569–570.
3. Лабецкая, А.Г. Численность эпидемически опасных видов эктопаразитов микромаммалий в зоне ЧАЭС и на сопредельных территориях / А.Г. Лабецкая, К.М. Киреенко, И.В. Байдакова // Тез. докл. VII зоологической конф. — Минск, 1994. — С. 212–214.
4. Лабецкая, А.Г. Численность и биоразнообразие паразитов микромаммалий в зоне эвакуации Чернобыльской атомной станции / А.Г. Лабецкая [и др.] // Паразитология. — 1997. — Т. 34, № 5. — С. 391–396.
5. Чикилевская, И.В. Оценка паразитологической ситуации в зоне аварии ЧАЭС / И.В. Чикилевская, А.Г. Лабецкая // Тез. докл. VII зоологической конф. — Минск, 1994. — С. 231–232.
6. Изучение распространения вирусов клещевого энцефалита и ГЛПС в зоне аварии Чернобыльской атомной станции / Т.И. Самойлова [и др.] // Зооантропонозные болезни, меры профилактики и борьбы, Гродно, 23–24 окт. 1997 г. — Минск, 1997. — С. 52–53.
7. Животный мир в зоне аварии Чернобыльской АЭС / Под ред. Л.М. Сущени, М.М. Пикулика, А.Е. Пленина. — Минск: Навука і тэхніка, 1995. — С. 233–240.
8. Лабецкая, А.Г. Численность основных переносчиков антроповирусных заболеваний — клещей *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus* в Беларуси / А.Г. Лабецкая, К.М. Киреенко, И.В. Байдакова // Зооантропонозные болезни, меры профилактики и борьбы, Гродно, 23–24 окт. 1997 г. — Минск, 1997. — С. 162–163.
9. Самойлова, Т.И. Арбовирусы в Республике Беларусь (полевые и экспериментальные исследования): автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.06, 14.00.30 / Т.И. Самойлова; НИИ эпидемиологии и микробиологии. — Минск, 2003. — 41 с.
10. Методические рекомендации по выявлению циркуляции арбовирусов // Итоги науки и техники. Сер. вирусология. — М: ВИНТИ, 1991. — Т. 25. — 111 с.

INVESTIGATION OF IXODE TICKS INFECTED WITH TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN POLESYE STATE RADIATION-ECOLOGICAL RESERVE

Tsvirko L.S.¹, Samoilova T.I.², Krasko A.G.², Kaltunova Y.B.², Karpuk L.I.³, Gorbunov V.A.²

¹Polesye State Radiation-Ecological Reserve, Hoiniki, Republic of Belarus;

*²State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology",
Minsk, Republic of Belarus;*

³Ministry of Health of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

The results of antigen detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) by ELISA in ixodes ticks collected in the territory of the Polesye State Radiation and Ecological Reserve for the epidemiological season 2016 are presented. It was shown that the TBEV infestation of ticks in the area after the Chernobyl accident amounting for the whole reserve 63.6% to *Dermacentor reticulatus* and 25.0% to *Ixodes ricinus*.

Keywords: ixodes ticks, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, tick-borne encephalitis virus, ELISA, Polesye State Radiation-Ecological Reserve.

Поступила 18.08.2016

**ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА
НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МАКРОФАГОВ *EX VIVO***

Антоневич Н.Г., Гончаров А.Е.

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

Реферат. Одним из общих свойств мезенхимальных стволовых клеток (МСК) тканевого происхождения является их иммуномодулирующая активность, в то же время влияние МСК обонятельной выстилки (ОВ) на клетки иммунной системы изучены недостаточно. Установлено, что МСК ОВ способны формировать противовоспалительный, толерогенный иммунофенотип макрофагов при сокультивировании *ex vivo*, сходный с таковым при М2-поляризации клеток. Характер влияния МСК на макрофаги и дендритные клетки имеет множество общих черт, что позволяет сделать выводы о схожем действии МСК на все антиген-представляющие клетки миелоидного происхождения.

Ключевые слова: мезенхимальные стволые клетки, макрофаги, иммунная толерантность.

Введение. Мезенхимальные стволовые клетки, благодаря своим регуляторным свойствам, обеспечивают баланс между покоем, самообновлением, дифференцировкой клеточных элементов в тканях, а также координируют специфический ответ на стрессовые воздействия [1, 2]. Одним из общих свойств МСК тканевого происхождения является их иммуномодулирующая активность, проявляемая как *in vivo*, так и *ex vivo*. Благодаря этому, МСК используются в клеточной терапии заболеваний человека, ассоциированных с избыточным иммунным ответом (аутоиммунные заболевания, профилактика отторжения трансплантата) [2].

Имуномодулирующие свойства МСК из обонятельной выстилки изучены в значительно меньшей степени, чем, например, у стволовых клеток костного мозга или жировой ткани. Немногочисленные исследования показали, что МСК ОВ супрессируют индуцированную пролиферацию Т- и В-клеток, натуральных киллеров [1]. Наименее изученным является влияние МСК ОВ на антигенпредставляющие клетки (АПК): дендритные клетки (ДК), В-клетки, макрофаги. Ранее нами было установлено, что МСК ОВ способствуют дифференцировке ДК в толерогенном направлении [2]. Толерогенные ДК (тДК) в организме выполняют регуляторную функцию, подавляют избыточный Т-клеточный ответ и обеспечивают формирование периферической толерантности к антигенам. В перспективе на основе МСК-индуцированных тДК можно получить биомедицинский клеточный продукт для терапии аутоиммунных заболеваний.

В продолжение предыдущих исследований представляет интерес изучение влияния МСК ОВ на функциональные свойства моноцитов и макрофагов.

Цель работы — определение влияния МСК ОВ на иммунофенотип макрофагов *ex vivo*.

Материалы и методы. *Получение МСК.* МСК ОВ получали по ранее разработанной методике [1, 2]. В исследовании использовали ранее полученные культуры, восстановленные из криоконсервации, которые имели типичную для МСК морфологию и иммунофенотип (CD90⁺CD105⁺CD73⁺CD31⁻CD45⁻).

Выделение мононуклеаров периферической крови (МПК) выполняли на градиенте плотности фиколл-пака ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). МПК суспендировали в среде RPMI-1640 в концентрации 1×10^6 /мл.

Сокультивирование МСК ОВ и МПК. В экспериментах использовали 4 культуры МСК ОВ и 5 образцов МПК, полученные от разных доноров в различных комбинациях. В лунки 6-луночного планшета вносили 2 мл свежей полной питательной среды DMEM/F-12 и добавляли 2 мл взвеси МПК в среде RPMI-1640. Сокультивирование проводили в 4-х вариантах:

- 1) вариант 1 (отрицательный контроль — ОК): фосфатный буферный раствор;
- 2) вариант 2 (положительный контроль для М1-макрофагов): липополисахарид (ЛПС) *E. coli* (ЛПС) в конечной концентрации 1 мкг/мл;
- 3) вариант 3 (положительный контроль М2-макрофагов): М-КСФ (5 нг/мл) и ИЛ-4 (20 нг/мл);

4) вариант 4 (контактное сокультивирование МСК и МПК): за 2–3 сут до начала совместного культивирования культуры МСК ОВ высевали в 4 мл ростовой среды DMEM/F-12 (1:1) с 10% FBS (полная ростовая среда) на 6-луночные планшеты в концентрации 15–20 тыс. кл./см². После образования монослоя МСК ОВ с конfluenceностью 70–80% удаляли из лунки 2 мл ростовой среды и вносили туда 2 мл суспензии МПК в полной ростовой среде RPMI-1640 (соотношение МСК и МПК 1:10–1:15). После внесения всех компонентов планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂ и 95% влажность воздуха) в течении 3 сут, затем изучали результаты.

Определение иммунофенотипа. Фенотипирование клеток методом проточной цитометрии проводили по стандартной методике с использованием моноклональных флуоресцентно-меченных антител. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD Biosciences, США). Количество исследуемых молекул на поверхности клеток оценивали по показателю относительной интенсивности флуоресценции (RFI). Величину этого параметра выражали в условных единицах флуоресценции.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 10 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде медианы с интерквартильным размахом в виде 25 и 75-й перцентилей. Для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Определить влияние МСК ОВ на макрофаги возможно по изменениям в экспрессии мембранных маркеров, специфичных для различного уровня и направления дифференцировки. Так, в организме моноциты после выхода в ткани в зависимости от химических сигналов локального микроокружения способны поляризоваться в макрофаги нескольких субпопуляций, различающихся по функциям. Среди макрофагов различают два основных типа: М1-провоспалительные (классические) и М2-противовоспалительные макрофаги (альтернативно активированные) [3–5]. М1-клетки характеризуются высоким уровнем продукции провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода и азота, способны запускать Тх1-иммунный ответ, вовлечены в противобактериальный и противоопухолевый иммунный ответ; М2-макрофаги обеспечивают контроль паразитарных инвазий, выполняют регулируемую функцию при естественном перестроении тканей (ремоделировании), стимулируют ангиогенез, репарацию тканей, способствуют формированию и росту опухолей.

Фенотипически М1- и М2-поляризованные макрофаги существенно отличаются. Так, типичные маркеры М1-макрофагов: костимуляторные молекулы CD80 [3, 4, 8, 9, 14] и CD40 [6, 9], хемокиновый рецептор CCR7 [3, 4], молекула LAMP-семейства CD68 [11, 12], HLA-DR [5, 7, 13], toll-like-рецепторы CD282 и CD284 [6], Fcγ-рецептор CD64 [5, 14]. М2-макрофаги экспрессируют молекулы MMR (CD206) [3, 6–10, 13, 14], DC-SIGN (CD209) [3, 8], CD200R [4, 14], CD163 [8, 9, 11, 12, 14], CD36 [9], CD11b [9], B7-H4 [9], B7-DC (CD273) [9, 10]. Рецепторы CD16 и CD32 чаще описывают как маркеры М1-макрофагов [6–8], хотя могут экспрессироваться клетками, поляризованными и в М2-направлении в зависимости от использованных стимулов (ИЛ-4, ИЛ-10 или другие) [2]. Схожая ситуация с молекулами CD86 и CD274, которые также описываются как маркеры М1- и М2-клеток [1, 2, 5, 8, 9]. Усиление экспрессии популяционного для макрофагов маркера CD14 описано как для М1 [2, 7], так и для М2-макрофагов [6, 8, 9].

В нашем эксперименте моноциты культивировали: 1) в отсутствие иммуотропных веществ (M0); 2) с добавлением в питательную среду ЛПС (1 мкг/мл) для получения М1-поляризованных клеток; 3) с внесением М-КСФ и ИЛ-4 для индукции дифференцировки в М2-направлении; 4) параллельно сокультивировали моноциты, помещенные на монослой МСК.

Культивирование моноцитов в отсутствие стимулов привело к дифференцировке клеток в неполяризованные М0-макрофаги (таблица).

Таблица — Иммунофенотип макрофагов, поляризованных в разных направлениях

Молекула	Отрицательный контроль (К, М0)	Поляризация			P (KvsM1)	P (KvsM2)	P (KvsMCK)
		M1 (ЛПС)	M2 (M-CSF)	MCK			
CD16, %	92,2(85,9–95,0)	95,4 (93,4–96,0)	78,0 (72,6–82,6)	79,0 (75,0–82,0)	0,066	0,028	0,004
CD16, усл. ед.	31,40(29,8–33,9)	30,3 (28,7–32,3)	16,6 (16,3–22,8)	25,5 (22,2–30,1)	0,471	0,014	0,074
CD64, %	92,5(91,0–94,0)	96,5 (95,8–97,8)	11,4 (9,3–15,1)	66,1 (60,2–70,1)	0,008	0,005	0,001
CD64, усл. ед.	30,1 (26,4–30,7)	69,9 (37,2–113,3)	10,0 (9,4–11,6)	14,5 (12,3–17,6)	0,008	0,005	0,001
CD68, %	3,0 (2,3–3,6)	30,5 (20,0–38,0)	2,7 (2,2–3,5)	3,8 (2,5–4,5)	0,005	0,523	0,329
CD68, усл. ед.	5,0 (4,6–6,1)	11,7 (10,5–14,9)	1,6 (1,4–1,7)	5,0 (3,6–6,1)	0,005	0,008	0,786
CD80, %	49,1 (43,0–50,1)	58,6 (49,6–61,6)	23,0 (20,0–24,5)	70,3 (61,1–81,4)	0,109	0,022	0,002
CD80, усл. ед.	6,7 (6,0–9,6)	14,1 (9,4–18,6)	3,9 (1,8–3,9)	10,8 (9,4–14,1)	0,031	0,083	0,011
CD85k, %	94,3 (90,0–96,5)	81,5 (74,5–95,5)	89,6 (85,4–92,6)	87,6 (78,0–93,0)	0,230	0,273	0,159
CD85k, усл. ед.	24,8 (16,1–30,4)	19,9 (17,9–24,2)	22,4 (19,3–27,8)	22,3 (15,3–33,2)	0,936	0,927	0,957
CD86, усл. ед.	36,5 (22,3–42,5)	29,6 (23,0–30,1)	11,9 (11,7–12,6)	28,9 (25,3–32,2)	0,471	0,008	0,551
CD206%	78,3 (74,5–82,0)	42,8 (39,5–51,2)	92,0 (90,0–95,0)	67,9 (57,0–72,4)	0,005	0,008	0,003
CD206, усл. ед.	121,8 (95,8–131,7)	31,3 (22,9–35,0)	160,7 (154,2–170,5)	137,5 (113,5–160,0)	0,005	0,008	0,143
CD273, %	4,9 (3,9–5,3)	2,9 (2,0–3,5)	10,5 (9,1–14,2)	8,9 (7,6–10,1)	0,423	0,008	0,002
CD273, усл. ед.	4,6 (3,5–6,1)	2,2 (2,1–3,3)	11,6 (9,8–12,8)	8,4 (7,1–10,9)	0,037	0,008	0,006
CD274, %	6,7 (6,4–7,5)	9,0 (8,1–9,6)	3,4 (3,4–3,8)	5,3 (3,8–6,2)	0,010	0,008	0,074
CD274, усл. ед.	8,3 (7,4–9,5)	7,6 (6,9–8,2)	7,6 (6,8–8,1)	8,2 (7,6–9,4)	0,378	0,315	1,000
CD284, %	78,0 (75,6–80,5)	74,3 (70,6–79,1)	42,1 (35,6–55,1)	49,1 (42,6–53,1)	0,298	0,008	0,001
CD284, усл. ед.	10,2 (9,5–11,3)	8,9 (7,9–9,5)	6,6 (4,5–6,8)	6,7 (6,3–7,3)	0,109	0,008	0,001
HLA-DR, усл. ед.	465,2 (400,0–575,6)	530,0 (470,0–554,0)	210,6 (200,1–235,4)	245,6 (205,0–300,1)	0,378	0,008	0,006

М0-клетки характеризовались высокой экспрессией Fc-рецепторов CD16 и CD64, паттерн-распознающих молекул CD206 и CD284. Все клетки экспрессировали маркеры АПК: CD86 и HLA-DR. Коингибиторные молекулы CD273 и CD274 были слабо представлены на мембране клеток (не выше 10% при минимальной интенсивности экспрессии).

ЛПС как классический M1-поляризатор усиливал интенсивность экспрессии молекул CD64, CD68, CD80 в сравнении с M0-макрофагами. В то же время количество CD206+ клеток снизилось вдвое, а интенсивность экспрессии уменьшилась в 4 раза. Помимо этого, выявлено 2-кратное сниже-

ние экспрессии клетками молекулы CD273, которая описана как M2-маркер. Интенсивность HLA-DR и CD86 M1-клетками не отличалась от значений M0-поляризованных макрофагов, достигая в обоих случаях высоких величин.

Положительный контроль M2 – M-КСФ и интерлейкин-4 индуцировал у моноцитов антигенный профиль, характерный для M2-макрофагов. Так, выявлено достоверное снижение экспрессии всех исследованных M1-маркеров: CD16, CD64, CD68, CD80, CD86, CD274, CD284 и HLA-DR, а экспрессия молекул CD206 и CD273 возрастала.

Установлено, что после сокультивирования с МСК статистически достоверно снижается экспрессия Fc-рецептора CD16 ($p = 0,004$), при этом количество CD16+ макрофагов не отличается от такового при воздействии M2-стимулов ($p > 0,05$). Выявлено также достоверное снижение как числа клеток, экспрессирующих CD64, так и интенсивности экспрессии этой молекулы. Значительное снижение экспрессии TLR4 было сравнимо с действием ИЛ-4 и М-КСФ.

Влияние МСК на костимуляторные молекулы было двояким. С одной стороны, МСК эффективно подавляли экспрессию CD86 ($p = 0,003$), с другой — стимулировали экспрессию CD80. Интересно, что количество CD80+ макрофагов, культивированных в присутствии МСК, было достоверно выше такового при росте в среде с ЛПС ($p = 0,03$). Экспрессия M1-маркерных молекул CD68 и CD274 достоверно не изменилась ($p > 0,05$), а CD273 — увеличилась в 1,8 раза ($p = 0,002$). Количество CD206-позитивных клеток было ниже, чем на неполяризованных макрофагах ($p = 0,003$), а интенсивность сравнима с M0-клетками. Интенсивность HLA-DR — основного M2-маркера — снизилась в 2 раза.

Ни один из способов стимуляции макрофагов не индуцировал изменений экспрессии CD85k — молекулы, опосредующей коингибирование взаимодействия между клетками иммунной системы.

Таким образом, можно утверждать, что МСК индуцируют дифференцировку моноцитов в сторону M2-подобных макрофагов. Следует отметить, что иммунофенотип полученных МСК-индуцированных макрофагов не совсем типичен для M2-клеток касаясь экспрессии CD80, CD86, CD206 и некоторых других молекул. В то же время, на наш взгляд, невозможно ожидать от макрофагов, сокультивированных как с мезенхимальными, так и с гемопоэтическими клетками, степени дифференцировки, сходной с действием иммунотропных веществ в высокой, совершенно нефизиологической концентрации. Типичные M1- и M2-макрофаги, описанные в литературе, это скорее крайние варианты функциональной активности клеток, достижимые только в условиях *ex vivo*. В реальности же в разных органах и тканях под действием факторов микроокружения формируются своего рода промежуточные варианты, отличающиеся между собой экспрессией генов и в конечном счете поверхностных и внутриклеточных рецепторов и спектром продуцируемых цитокинов/ хемокинов.

По данным литературы, МСК, полученные из костного мозга, жировой ткани и тканей десны, преимущественно индуцируют поляризацию моноцитов в M2-регуляторную субпопуляцию [13–18]. Таким образом, полученные нами данные подтверждают предположения о сходстве иммунорегуляторных свойств всех стволовых клеток мезенхимального происхождения.

В предыдущих экспериментах, в которых исследовали влияние МСК ОВ на ДК, было установлено достоверное увеличение числа CD80-позитивных клеток, увеличение экспрессии коингибиторной молекулы CD273 и снижение HLA-DR [2]. Полученные данные о влиянии МСК на макрофаги подтверждают и дополняют результаты предыдущих исследований и позволяют сделать выводы о схожем характере влияния МСК на все АПК миелоидного происхождения.

Заключение. Исследования показывают, что МСК ОВ способны формировать противовоспалительный, толерогенный иммунофенотип макрофагов при сокультивировании *ex vivo*, сходный с таковым при M2-поляризации клеток.

Литература

1. Антоневиц, Н.Г. Иммуносупрессивные свойства культивируемых эктомезенхимальных стволовых клеток обонятельного эпителия человека / Н.Г. Антоневиц, А.Е. Гончаров, В.Л. Чекан // Здравоохранение. — 2014. — № 10. — С. 14–19.
2. Гончаров, А.Е. Влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки на антигенный профиль дендритных клеток / А.Е. Гончаров, Н.Г. Антоневиц, В.Л. Чекан // Новости мед.-биол. наук. — 2015. — Т. 10, № 3. — С. 102–106.
3. Comparison of Polarization Properties of Human Adult Microglia and Blood-Derived Macrophages / B.A. Durafourt [et al.] // GLIA. — 2012. — Vol. 60, № 5. — P. 717–727.

4. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin / M. Jaguin [et al.] // *Cell. Immunol.* — 2013. — Vol. 281, № 1. — P. 51–61.
5. Martinez, F.O. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment [Electronic resource] / F.O. Martinez, S. Gordon // *F1000 Prime Rep.* — 2014. — Vol. 6, № 13. — Mode of access: <http://f1000.com/prime/reports/pubmed/24669294>. — Date of access: 24.08.2016.
6. Targeting the Shift from M1 to M2 Macrophages in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice Treated with Fasudil [Electronic resource] / C. Liu [et al.] // *PLOS ONE.* — 2013. — Vol. 8, № 2. — Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0054841>. — Date of access: 24.08.2016.
7. Replication of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Human Monocyte-Derived Macrophages / S.K. Lathrop [et al.] // *Infect. Immun.* — 2015. — Vol. 83, № 7. — P. 2661–2671.
8. Increasing the Inflammatory Competence of Macrophages with IL-6 or with Combination of IL-4 and LPS Restrains the Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells / A.N. Salmiheimo [et al.] // *J. Cancer.* — 2016. — Vol. 7, № 1. — P. 42–49.
9. Human Placental Mesenchymal Stem Cells (pMSCs) Play a Role as Immune Suppressive Cells by Shifting Macrophage Differentiation from Inflammatory M1 to Anti-inflammatory M2 Macrophages / M.H. Abumaree [et al.] // *Stem. Cell. Rev. Rep.* — 2013. — Vol. 9, № 5. — P. 620–641.
10. Rovida, E. Colony-stimulating factor-1 receptor in the polarization of macrophages: a target for turning bad to good ones? [Electronic resource] / E. Rovida, P. De. Sbarba // *J. Clin. Cell. Immunol.* — 2015. — Vol. 6, № 6. — Mode of access: <http://www.omicsonline.org/open-access/colony-stimulating-factor1-receptor-in-the-polarization-of-macrophages-a-target-for-turning-bad-to-good-ones-2155-9899-1000379.pdf>. — Date of access: 24.08.2016.
11. Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages [Electronic resource] / M. Henrique [et al.] // *PLoS One.* — 2013. — Vol. 8, № 11. — Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3829941/pdf/pone.0080908.pdf>. — Date of access: 24.08.2016.
12. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status [Electronic resource] / S. Sousa [et al.] // *Breast. Cancer. Res.* — 2015. — Vol. 17. — Mode of access: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-015-0621-0>. — Date of access: 24.08.2016.
13. An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype / S. Mia [et al.] // *Scand. J. Immunol.* — 2014. — Vol. 79, № 5. — P. 305–314.
14. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages / C.A. Ambarus [et al.] // *J. Immunol. Meth.* — 2012. — Vol. 375, № 1–2. — P. 196–206.
15. Kim, J. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages / J. Kim, P. Hematti // *Exp. Hematol.* — 2009. — Vol. 37, № 12. — P. 1445–1453.
16. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages [Electronic resource] / D. Cho [et al.] // *Exp. Molec. Med.* — 2014. — Vol. 46. — Mode of access: <http://www.nature.com/emm/journal/v46/n1/full/emm2013135a.html>. — Date of access: 24.08.2016.
17. Human mesenchymal stem cells alter macrophage phenotype and promote regeneration via homing to the kidney following ischemia/reperfusion injury [Electronic resource] / A.F. Wise [et al.] // *Am. J. Physiol.* — 2014. — Mode of access: <http://ajprenal.physiology.org/content/early/2014/03/06/ajprenal.00675.2013.full.pdf+html>. — Date of access: 24.08.2016.
18. Eggenhofer, E. Mesenchymal stem cell-educated macrophages [Electronic resource] / E. Eggenhofer, M.J. Hoogduijn // *Transpl. Res.* — 2012. — Vol. 1, № 12. — Mode of access: <http://transplantationresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/2047-1440-1-12#CR21>. — Date of access: 24.08.2016.
19. Anton, K. Macrophage-associated mesenchymal stem cells assume an activated, migratory, pro-inflammatory phenotype with increased IL-6 and CXCL10 secretion [Electronic resource] // K. Anton, D. Banerjee, J. Glod // *PLoS ONE.* — 2012. — Vol. 7, № 4. — Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035036>. — Date of access: 24.08.2016.
20. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of M2 macrophages and enhance cutaneous wound healing / Q. Zhang [et al.] // *Stem cells.* — 2010. — Vol. 28, № 10. — P. 1856–1868.

THE INFLUENCE OF THE OLFACTORY EPITHELIUM-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE MACROPHAGE DIFFERENTIATION *EX VIVO*

Antonevich N.H., Hancharou A.Y.

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

One of the most common properties of the mesenchymal stem cells (MSC) derived from different tissues is an immunomodulatory activity. The immunomodulatory effects of the olfactory epithelium

derived MSC (hOE-MSC) on the macrophage differentiation ex vivo were studied. It was established that hOE-MSC induce anti-inflammatory, tolerogenic immunophenotype in macrophages co-cultured ex vivo, resembling M2-polarized cells. The effects of MSC on macrophages and dendritic cells possessed much similarity, indicative of comparable influence of MSC on all myeloid-derived antigen-presenting cells.

Keywords: mesenchymal stem cells, macrophage, immune tolerance.

Поступила 12.09.2016

ИММУНОФЕНОТИП СИНОВИОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТЕОАРТРИТОМ КРУПНЫХ СУСТАВОВ

Гончаров А.Е.¹, Дегтерева О.В.², Романова И.В.¹, Дуж Е.В.¹

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

²Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Показано, что у большинства (92,3±7,4%) их обследованных пациентов с остеоартритом в синовиальной жидкости отсутствуют CD90+CD45– синовиоциты фибробластного происхождения, что, вероятно, указывает на относительную сохранность структуры синовиальной мембраны. Установлено, что иммунофенотип макрофагальных синовиоцитов типичен для M1-макрофагов и характеризуется высокой экспрессией молекул CD16, CD86, CD273, CD284 и HLA-DR, в то же время низкой — молекулы CD206. Подобный профиль экспрессии молекул предполагает изначальную поляризованность синовиоцитов в сторону клеток с провоспалительной функцией и последующую реализацию воспалительной реакции при остеоартрите.

Ключевые слова: остеоартрит, синовиальная жидкость, синовиоциты.

Введение. Остеоартрит (ОА) — хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся медленной деградацией суставного хряща, деструктивными изменениями субхондральной кости с развитием краевых остеофитов, синовиальным воспалением, болевым синдромом и нарушением функции суставов. Заболевание занимает 1-е место по частоте среди других ревматических болезней. Наиболее часто поражаются коленные суставы, при этом у 25% страдающих гонартрозом развивается со временем выраженная инвалидизация. ОА длительное время считался заболеванием, к которому приводит постепенный износ хряща. В последнее десятилетие наблюдается существенный рост заболеваемости ОА среди молодого населения. Так, по данным Белорусской медицинской академии последипломного образования, зачастую диагноз ОА устанавливают призывникам в возрасте 18–25 лет.

К настоящему времени установлено, что ОА развивается вследствие иммунного ответа, направленного на составные компоненты сустава [1]. Локальный воспалительный процесс типичен для ОА и характеризуется инфильтрацией иммунными клетками и продукцией цитокинов. Характер воспалительного процесса отличается количественно и качественно от такого при ревматоидном артрите [2]. Также показана роль врожденного иммунитета в патогенезе ОА, включая роль макрофагов, системы комплемента, экспрессии toll-like рецепторов [3, 4]. Выявлено уменьшение числа Т-регуляторных клеток в периферической крови, увеличение содержания Т-клеток, ассоциированных с воспалением (CD4+CD45RB+CD45RA+CD62L–), причем содержание последних коррелировало с длительностью болезни [5]. Таким образом, имеются все основания считать, что в этиопатогенезе ОА значительная роль принадлежит (ауто)иммунному воспалению, однако детали этого процесса в настоящее время изучены крайне недостаточно. Для решения этой научно-практической задачи поставлена цель исследовать иммунофенотип и функциональные свойства иммунокомпетентных клеток, входящих в состав синовиальной жидкости пациентов, страдающих ОА.

Синовиальная жидкость представляет собой транссудат крови, отличается от плазмы содержанием белков, наличием гиалуроновой кислоты [6]. Клеточный состав синовиальной жидкости включает фибробласто- и макрофагоподобные синовиоциты (до 50%), лимфоциты (30–40%), моноциты, нейтрофилы, тучные клетки и другие клетки гемопоэтического и мезенхимального происхождения.

Несмотря на то, что выполненные ранее исследования установили некоторые особенности субпопуляционного состава синовиальной жидкости у пациентов с ОА, в работах не было проведено всесторонней оценки иммунофенотипа клеток [7–10].

Материалы и методы. Объектами для *in vitro* исследований служили 13 образцов синовиальной жидкости пациентов с ОА крупных и суставов (диагнозы по МКБ-10: M15 — полиартроз, M16 — коксартроз, M17 — гонартроз). Медианный возраст пациентов составил 68,0 (64,0–76,0) лет.

Выполнена диагностическая пункция пораженного сустава под УЗ-контролем с забором синовиальной жидкости в пробирку объемом 50 мл, содержащую 100 мкл раствора гепарина. Пробирки доставляли в лабораторию в течение 2–3 ч с момента забора образцов. Синовиальную жидкость фильтровали через 70–100 мкм фильтры, затем подвергали центрифугированию для осаждения клеток. Часть клеток использовали для определения иммунофенотипа, а часть — для дальнейшего культивирования.

Исследуемый образец клеток синовиальной жидкости в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами на протяжении 15 мин при температуре 4°C. Затем осаждали клетки центрифугированием, удаляли супернатант и суспендировали клетки в DPBS. Учет проводили на проточных цитофлюориметрах FACSCalibur и FACSCanto II.

Клетки синовиальной жидкости в количестве $5\text{--}10 \times 10^5$ высевали на лунку 6-луночного планшета и культивировали в 3 мл питательной среды DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки и свежего L-глутамин на протяжении 1 сут для адгезии к пластику. Неприкрепившиеся клетки удаляли, в лунки вносили свежую среду и культивировали клетки дополнительно 3–4 сут. По истечении времени культивирования определяли субпопуляционный состав клеток.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 12 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде медианы с интерквартильным размахом.

Результаты и их обсуждение. Медианное количество синовиальной жидкости в образцах, доставленных в лабораторию, составило 4,0 (3,0–15,0) мл, медианное содержание клеток в образцах — $0,98 (0,15\text{--}1,32) \times 10^6$ клеток/мл.

Фибробластоподобные и макрофагоподобные синовиоциты.

Фибробластоподобные синовиоциты не экспрессируют общий маркер клеток гемопоэтического происхождения CD45, в то же время отличаются высокой экспрессией молекулы CD90 [9, 10]. Для идентификации фибробластоподобных синовиоцитов была составлена панель антител, включающая антитела к маркерам CD45, CD90 и CD105.

Показано, что на цитограмме прямого и бокового светорассеяния образцов синовиальной жидкости визуализируются 2 основных региона: 1) клетки с невысокими размерами и низкой гранулярностью и 2) регион клеток с большими размерами относительно первого региона и более высокой гранулярностью. У 1 из 13 пациентов выявлены CD45⁻CD90⁺ клетки, составляющие 9,45% от числа всех ядросодержащих клеток. У остальных 12 пациентов CD90⁺ клетки выявлены не были (не более десятых долей процента), при этом клетки не были сгруппированы в кластеры.

Показано, что 35,0 (24,0–60,0)% CD45⁺ клеток экспрессируют молекулу CD105, которая, тем не менее не является специфичной для клеток мезенхимального происхождения, а экспрессируется также различными миелоидными клетками (моноциты, макрофаги, ДК и др.). Следует отметить, что образцы синовиальной жидкости существенно отличались по наличию CD45⁻ клеток, содержание которых варьировало от 4 до 50%. Не выявлено наличия CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток и стволовых клеток ни в одном из исследованных образцов синовиальной жидкости (рисунок 1).

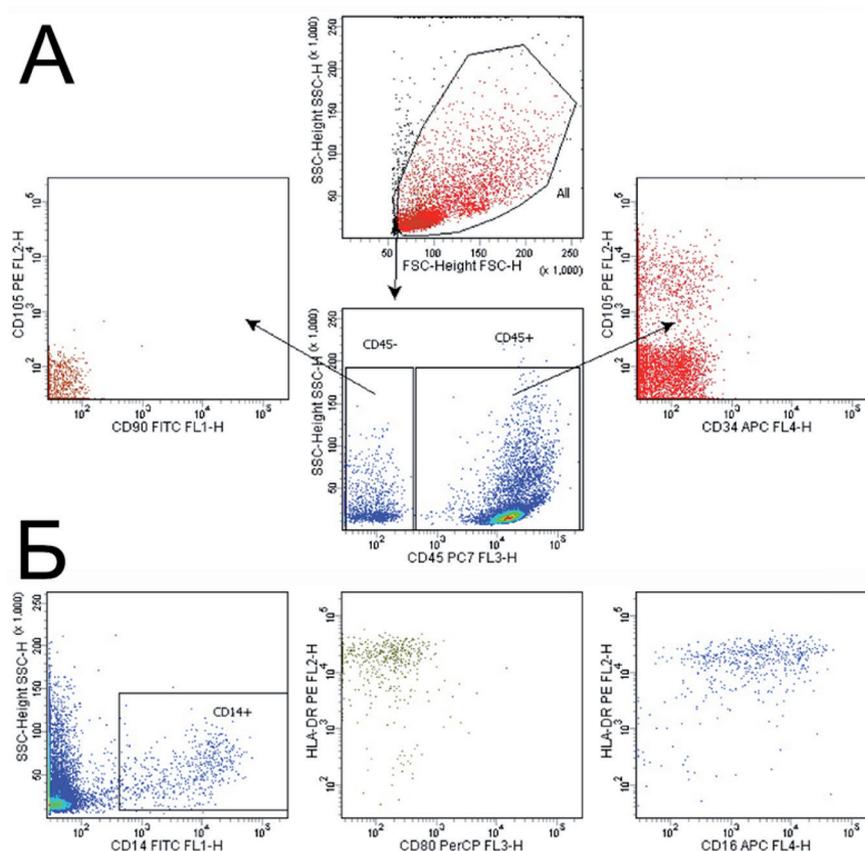
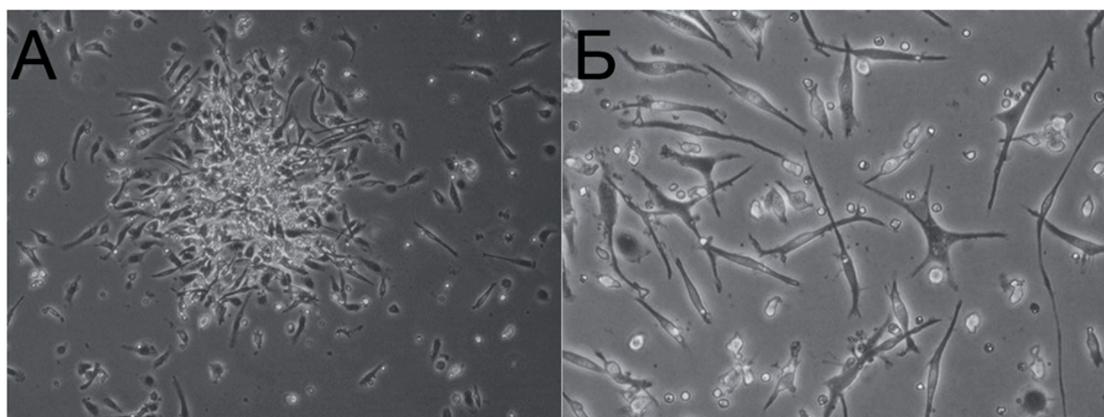


Рисунок 1. — Иммунофенотип клеток синовиальной жидкости

CD14-позитивные моноциты, макрофаги и макрофагоподобные синовиоциты составляют 26,3 (15,4–45,2)% всех клеток синовиальной жидкости у пациентов с ОА. Показано, что более 98% CD14⁺ клеток экспрессируют молекулу HLA-DR, более 80% — молекулу CD16. Экспрессия костимуляторной молекулы CD80 — одного из маркеров активации макрофагов — ни в одном из исследованных образцов не превышала 2%.

Субпопуляционный состав культивированных клеток синовиальной жидкости

Клетки синовиальной жидкости на первые сутки после посева приобретали преимущественно веретенообразную форму, были сгруппированы в микроколонии (рисунок 3). В целом клетки имели морфологию, подобную фиброцитам крови. Длина клеток с отростками составила 78,5 (62,8–103,1) мкм.



А — ×100; Б — ×200

Рисунок 2. — Морфология культивированных клеток синовиальной жидкости (5-е сут)

Имунофенотипирование культивированных клеток синовиальной жидкости позволяет идентифицировать клетки макрофагального и фибробластного происхождения [10].

Показана экспрессия молекулы CD45 всеми клетками в образцах. Часть клеток (от 30 до 65%) экспрессировала эндоглин (CD105). Экспрессия молекул CD90 и CD34 полностью отсутствовала во всех образцах.

Более 95% клеток экспрессировали типичные маркеры АПК — молекулы CD14, HLA-DR, CD54, CD86, CD284, что подтверждает их макрофагальное происхождение (рисунок 3).

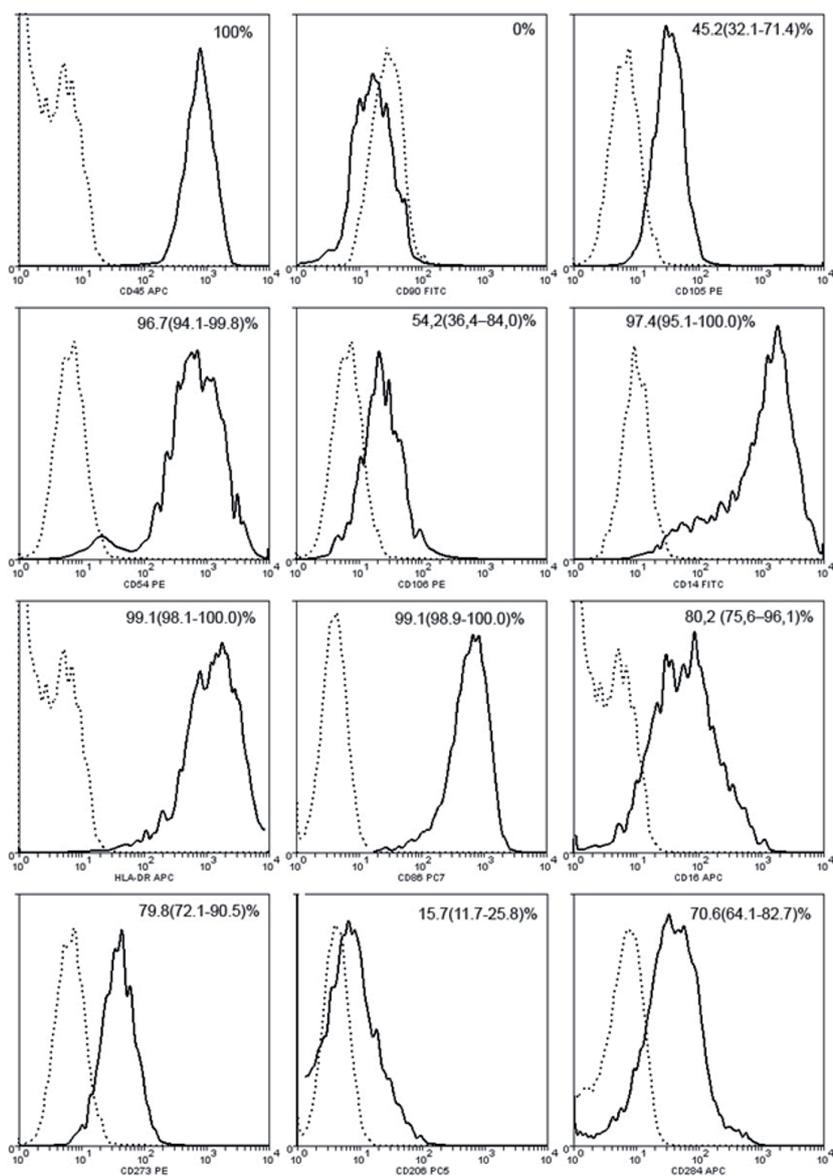


Рисунок 3. — Имунофенотип культивированных клеток синовиальной жидкости

Экспрессия CD16, CD106 была более вариабельна, с медианными значениями 80,2 (75,6–96,1) и 54,2 (36,4–84,0)% соответственно. Более 70% клеток экспрессировали молекулу CD273, что указывает на потенциальные иммуносупрессивные свойства клеток.

Заключение. Показано, что у большинства (92,3±7,4%) пациентов с ОА в синовиальной жидкости отсутствуют CD90⁺CD45⁻ синовиоциты фибробластного происхождения. Учитывая, что фибробластоподобные синовиоциты мезенхимального происхождения локализуются во внутренних слоях синовиальной оболочки, их отсутствие в синовиальной жидкости обследованных пациентов, вероятно, указывает на относительную сохранность структуры синовиальной мембраны.

Известно, что в зависимости от выполняемой функции выделяют классические («провоспалительные») М1-макрофаги и «противовоспалительные» М2-макрофаги альтернативного пути активации, в т. ч. участвующие в процессах репарации ткани. Иммунофенотип макрофагальных синовиоцитов, полученных нами *ex vivo* без использования каких-либо иммунотропных веществ (т. е. без стимуляции), типичен для М1-макрофагов и характеризуется высокой экспрессией молекул CD16, CD86, CD273, CD284 и HLA-DR, в то же время низкой — молекулы CD206, одного из маркеров М2-клеток. Экспрессия вышеперечисленных молекул наряду с молекулами адгезии (ICAM-1, VCAM-1) предполагает изначальную поляризованность синовиоцитов в сторону клеток с провоспалительной функцией и последующую реализацию воспалительной реакции при остеоартрите.

Степень экспрессии молекул макрофагальными синовиоцитами может являться диагностическим критерием степени активности остеоартрита. Данное предположение требует дальнейших исследований.

Литература

1. Recognition of immune response for the early diagnosis and treatment of osteoarthritis [Electronic resource] / A.M. Kandahari [et al.] // *J. Immunol. Res.* — 2015. — Mode of access: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2015/192415>. — Date of access: 22.05.2016.
2. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review / B.J. de Lange-Brokaar [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* — 2012. — Vol. 20, № 12. — P. 1484–1499.
3. The role of innate immunity in osteoarthritis: when our first line of defense goes on the offensive [Electronic resource] / E.W. Orlowsky [et al.] // *J. Rheumatol.* — 2015. — Vol. 42, № 3. — Mode of access: <http://www.jrheum.org/content/early/2015/01/07/jrheum.140382>. — Date of access: 22.05.2016.
4. Role of innate immune sensors, TLRs, and NALP3 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis / Y. Takakubo [et al.] // *J. Long. Term. Eff. Med. Implants.* — 2014. — Vol. 24, № 4. — P. 243–251.
5. Changes in peripheral blood immune cell composition in osteoarthritis / F. Ponchel [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* — 2015. — Vol. 23, № 11. — P. 1870–1878.
6. Чернякова, Ю.М. Синовиальная жидкость: состав, свойства, лабораторные методы исследования / Ю.М. Чернякова, Е.А. Сементовская // *Мед. новости.* — 2005. — № 2. — С. 9–14.
7. Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls / R. Rollin [et al.] // *Rheumatol. Int.* — 2008. — Vol. 28, № 8. — P. 757–764.
8. Preferential accumulation of activated Th1 cells not only in rheumatoid arthritis but also in osteoarthritis joints / H. Yamada [et al.] // *J. Rheumatol.* — 2011. — Vol. 38, № 8. — P. 1569–1575.
9. Synovial fluid CD34⁺ CD44⁺ CD90⁺ mesenchymal stem cell levels are associated with the severity of primary knee osteoarthritis / D.H. Lee [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* — 2012. — Vol. 20, № 2. — P. 106–109.
10. Иммунофенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки носовой полости человека / Н.Г. Антоневиц [и др.] // *Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук.* — 2015. — № 1. — С. 42–49.

IMMUNOPHENOTYPE OF THE SYNOVIOCYTES IN THE PATIENTS WITH THE LARGE JOINT OSTEOARTHRITIS

Hancharou A.Y.¹, Degtereva O.V.², Ramanava I.U.¹, Duzh A.U.²

*¹State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus;*

*²State Educational Institution “The Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education”,
Minsk, Republic of Belarus*

The absence of fibroblast-like synoviocytes in the synovial fluid in the majority (92.3%) of patients with osteoarthritis was shown, indicative of the integrity of the synovial membrane. The immunophenotype of the macrophage-like synoviocytes was typical for the M1-macrophages, with high expression of CD16, CD86, CD273, CD284 and HLA-DR molecules, and low expression of CD206. The expression profile suggests primordial polarization of the macrophage-like synoviocytes into the cells with proinflammatory function, able to support the inflammatory reaction in the osteoarthritis.

Keywords: osteoarthritis, synovial fluid, synoviocytes.

Поступила 20.09.2016

МОЛЕКУЛЫ CD35, CD88, CD282, CD284 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭТИОЛОГИИ ОСТРЫХ ИНФЕКЦИЙ

Гончаров А.Е.

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

Реферат. Исследована экспрессия маркеров активации: рецепторов к компонентам комплемента — CD35, CD88 и TLR-рецепторов — CD282 и CD284 на поверхности нейтрофилов и моноцитов под действием культуры *E. coli* и полученных из нее бактериальных «теней». Установлено, что даже в невысокой концентрации *E. coli* и бактериальные «тени» оказывали выраженное влияние на экспрессию молекул CD35, CD88, CD282 и CD284 на поверхности нейтрофилов и моноцитов периферической крови, что обосновывает их использование для дальнейшей разработки метода дифференциальной диагностики инфекций бактериальной и вирусной этиологии.

Ключевые слова: дифференциальная диагностика инфекций, toll-like рецепторы, рецепторы к компонентам комплемента.

Введение. Проблема дифференциальной диагностики бактериальной и вирусной этиологии острых инфекций является чрезвычайно актуальной для здравоохранения. В клинической практике необходимость антибактериальной терапии чаще всего определяется эмпирически, исходя из состояния пациента и результатов рутинных лабораторных исследований. Используемые в настоящее время экспресс-методы выявления этиологии инфекционных заболеваний, отличаются низкой чувствительностью и/или специфичностью, невозможностью получения результатов в приемлемые сроки. В связи с этим требуется дальнейший научный поиск для разработки и внедрения экспресс-тестов нового поколения, которые позволят в первые часы после поступления пациента в стационар осуществлять дифференциальную диагностику между бактериальной и вирусной этиологией инфекционного заболевания [1, 2].

Известно, что компоненты бактерий активируют нейтрофилы и моноциты посредством взаимодействия с внутриклеточными и поверхностными паттерн-распознающими рецепторами. Помимо паттерн-распознающих рецепторов активация нейтрофилов и моноцитов бактериями сопровождается значительным усилением экспрессии Fc-рецепторов и рецепторов к компонентам системы комплемента. В то же время молекулы, распознающие компоненты вирусов, представлены на нейтрофилах крайне слабо. Свойство нейтрофилов и моноцитов активироваться под действием компонентов бактерий и не отвечать значимой активацией в ответ на стимуляцию вирусами можно использовать на практике в диагностических целях. Так, известен способ ранней диагностики бактериальных осложнений после оперативного вмешательства на основе определения молекулы CD64 на поверхности нейтрофилов [3, 4].

Цель работы — изучение *in vitro* экспрессии рецепторов к компонентам комплемента и toll-like (TLR)-рецепторов нейтрофилами и моноцитами под действием убитой культуры *E. coli* и бактериальный «теней» *E. coli* с целью определения молекул, экспрессия которых существенно отличается на клетках в нативном и активированном состоянии.

Материалы и методы. Объектами для *in vitro* исследований служили 15 образцов крови доноров. Исследование маркеров активации нейтрофилов и моноцитов выполняли методом проточной цитометрии. К крови в количестве 500 мкл добавляли: 1) отрицательный контроль (ОК) — фосфатный буферный раствор; 2) положительный контроль (ПК) — 0,1 мкг/мл LPS *E. coli*; 3) убитые нагреванием клетки *E. coli* штамм M17 (коллекция научно-инновационной лаборатории РНПЦ эпидемиологии и микробиологии) в концентрации 10^6 /мл; 4) бактериальные «тени» *E. coli* (препарат предоставлен сотрудниками Института онкологии Вильнюсского университета) — 0,1 мкг/мл. Доводили объем взвеси до 1 мл питательной средой RPMI-1640 и инкубировали взвесь на протяжении 45 мин в термостате при температуре +37°C. После инкубации образцы крови в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами к маркерам активации нейтрофилов и моноцитов, лизировали эритроциты раствором хлорида аммония и учитывали клетки на проточной цитометре [5].

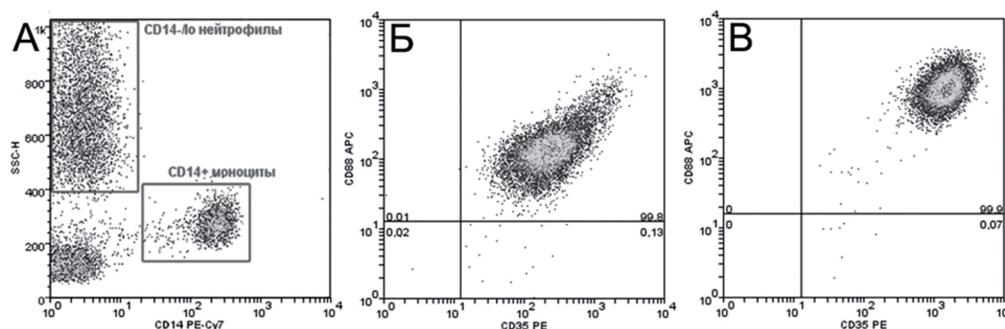
Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 12 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде медианы с 25 и 75-й перцентиллями. Для сравнения нескольких групп независимых данных был использован метод рангово-

го анализа вариаций Краскела–Уоллиса. В случае если уровень значимости составлял меньше 0,05, проводили парное сравнение данных между группами, используя метод Манна–Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На поверхности моноцитов и нейтрофилов исследована экспрессия следующих молекул: CD32, CD88, CD282 и CD284. Молекула CD35 (CR1) связывается с C1q, C3b/C4b компонентами системы комплемента, а молекула CD88 (C5AR1) является рецептором к анафилотоксину C5a. TLR2 (CD282) распознает компоненты бактерий, в т. ч. гликолипиды, липопротеины, пептидогликаны, липотейхоевую кислоту, также зимозан дрожжей, белки теплового шока и др. TLR4 (CD284) является рецептором к ЛПС клеточной стенки Грам(–) бактерий, других полисахаридов, липопротеинов низкой плотности, фибриногена, фрагментов гиалуроновой кислоты, бета-дефензинов, белков теплового шока.

Экспрессия рецепторов компонентов системы комплемента CD35 и CD88

Нейтрофилы и моноциты характеризовались практически 100%-й (конститутивной) экспрессией обеих молекул CD35 и CD88 как в неактивированном состоянии, так и при активации бактериальными компонентами (рисунок).



А — гейтирование нейтрофилов и моноцитов; Б — нейтрофилы; В — моноциты

Рисунок — Экспрессия молекул CD35 и CD88 моноцитами и нейтрофилами

В то же время интенсивность экспрессии этих молекул существенно возростала после инкубации крови как с убитыми бактериями, так и с бактериальными «теньями» (таблица).

Интенсивность экспрессии молекулы CD35 моноцитами существенно усиливалась после инкубации с микроорганизмами ($p < 0,001$ во всех образцах). Выявлены также различия в активирующей способности бактерий и бактериальных «теней». Так, наиболее сильным влиянием на экспрессию CD35 моноцитами оказывали бактериальные «тени» ($p = 0,01$). Интенсивность экспрессии молекулы CD35 нейтрофилами имела схожие тенденции: все апробированные компоненты микробного происхождения активировали клетки без существенных различий в интенсивности экспрессии ($p > 0,05$).

Интенсивность экспрессии CD88 моноцитами достоверно усиливалась при инкубации со всеми микробными препаратами, однако степень изменения экспрессии была разной. Наибольшую стимулирующую активность в отношении экспрессии CD88 моноцитами проявили бактериальные «тени» *E. Coli*, а наименьшую — ЛПС. Интенсивность экспрессии CD88 нейтрофилами усиливалась при инкубации с ЛПС и исследуемыми компонентами микроорганизмов, в то же время достоверных различий в интенсивности экспрессии под действием различных препаратом выявлено не было ($p = 0,051$).

Таблица — Экспрессия молекул CD32, CD88, CD282 и CD284 нейтрофилами и моноцитами крови под действием бактерий и их компонентов

Молекула/клетки	Активаторы			
	ОК (фосф. буфер)	ПК (ЛПС)	Убитые <i>E. coli</i>	«Тени» <i>E. coli</i>
CD35 (нейтрофилы), усл. ед	83,0 (70,0–88,0)	415,5 (400,0–442,8)	368,0 (350,0–389,0)	500,0 (482,4–510,0)
CD35 (моноциты), усл. ед.	178,5 (155,0–199,0)	494,0 (472,0–508,0)	538,5 (536,0–589,0)	532,0 (510,0–555,0)
CD88 (нейтрофилы), усл. ед	46,0 (41,0–61,0)	375,0 (350,0–385,0)	406,0 (375,0–430,0)	405,0 (395,0–420,0)
CD88 (моноциты), усл. ед.	51,0 (46,0–55,0)	254,5 (242,0–301,0)	303,0 (288,0–340,0)	357,5 (310,0–390,0)
CD282 (нейтрофилы), %	17,5 (16,4–20,6)	21,9 (21,1–25,6)	24,5 (22,3–27,9)	25,2 (22,3–30,3)
CD282 (нейтрофилы), усл. ед	2,5 (2,3–3,1)	2,7 (2,6–3,2)	2,9 (2,6–3,6)	2,4 (1,9–3,1)
CD282 (моноциты), усл. ед.	22,6 (20,5–25,2)	33,8 (32,5–34,5)	27,6 (24,5–30,2)	35,1 (32,3–37,5)
CD284 (нейтрофилы), %	8,2 (7,6–9,6)	14,0 (12,2–16,6)	14,9 (14,2–16,1)	16,1 (14,3–17,6)
CD284 (нейтрофилы), усл. ед	2,5 (2,4–2,9)	2,8 (2,4–2,9)	2,8 (2,4–3,3)	2,7 (2,5–2,9)
CD284 (моноциты), %	8,0 (6,5–8,7)	17,1 (15,6–18,9)	24,1 (22,3–25,6)	20,6 (17,6–23,2)
CD284 (моноциты), усл. ед.	3,1 (3,0–4,2)	4,1 (3,5–4,3)	4,4 (3,8–5,0)	4,9 (3,1–5,1)

Экспрессия TLR-рецепторов CD282 и CD284

Относительное содержание CD282+ нейтрофилов ($p = 0,06$) и интенсивность экспрессии этой молекулы ($p = 0,097$) статистически достоверно не различались в ОК, ПК и при воздействии микробными препаратами. Медианные значения процентного содержания CD282+ нейтрофилов колебались от 17,5 до 25,2%, а интенсивность экспрессии — от 2,5 до 2,9%. Экспрессия молекулы CD282 моноцитами составляла от 94,6 до 96,0%, статистически достоверных изменений под влиянием микробных препаратов не выявлено. Интенсивность экспрессии CD282 моноцитами в ОК и при стимуляции микробными компонентами достоверно отличалась ($p < 0,002$).

Интенсивность экспрессии молекулы CD284 как нейтрофилами ($p = 0,418$), так и моноцитами ($p = 0,173$) достоверно не изменилась после инкубации с микробными препаратами. В то же время количество CD284+ клеток достоверно увеличивалось в 2–3 раза в зависимости от микробного стимула.

Заключение. Исследована экспрессия маркеров активации: рецепторов к компонентам комплекса — CD35, CD88 и TLR-рецепторов — CD282 и CD284 на поверхности нейтрофилов и моноцитов под действием убитой культуры Грам(–) бактерии *E. coli* и бактериальных «теней» *E. coli*.

Выявлены особенности экспрессии этих молекул, важные для учета результатов методом проточной цитометрии при практическом применении. Так, показано, что экспрессия молекул CD282 и CD284 значимо усиливалась только на моноцитах крови, при этом усиливалась как интенсивность экспрессии, так и число CD284-позитивных клеток. К молекулам, экспрессия которых существенно усиливалась в процессе активации как нейтрофилами, так и моноцитами, относятся CD35 и CD88. Учитывая высокий процент экспрессии клетками этих молекул, анализ результатов активации возможен только по изменению интенсивности экспрессии молекулы клетками.

Таким образом, установлено, что даже в невысокой концентрации исследованные микроорганизмы и их компоненты оказывали выраженное влияние на экспрессию паттерн-ассоциированных и схожих по функции рецепторов на поверхности нейтрофилов и моноцитов периферической крови, что служит обоснованием их использования для дальнейшей разработки метода дифференциальной диагностики инфекций бактериальной и вирусной этиологии.

Литература

1. Rapid point of care diagnostic tests for viral and bacterial respiratory tract infections—needs, advances, and future prospects / A. Zumla [et al.] // *Lancet Inf. Dis.* — 2014. — Vol. 14, № 11. — P. 1123–1135.
2. Procalcitonin testing for diagnosis and short-term prognosis in bacterial infection complicated by congestive heart failure: a multicenter analysis of 4,698 cases [Electronic resource] / W. Wang [et al.] // *Critical Care.* — 2014. — Vol. 18. — Mode of access: <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc13181>. — Date of access: 24.08.2016.
3. Neutrophil CD64 (FcγRI) expression is a specific marker of bacterial infection: A study on the kinetics and the impact of major surgery / G. Fjaertoft [et al.] // *Scand. J. Inf. Dis.* — 2007. — Vol. 39, № 6–7. — P. 525–535.
4. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis / J. Cid [et al.] // *J. Infect.* — 2010. — Vol. 60, № 5. — P. 313–319.
5. Взаимодействие лактобацилл и их компонентов с нейтрофилами, моноцитами и лимфоцитами периферической крови человека / Л.П. Титов [и др.] // *Вестні НАН Беларусі. Сер. мед. навук.* — 2013. — № 3. — С. 19–27.

CD35, CD88, CD282 AND CD284 AS POTENTIAL BIOMARKERS FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF ETHIOLOGY OF ACUTE INFECTIONS

Hancharou A.Y.

*State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus*

The expression of toll-like receptors CD282 and CD284 as well as complement receptors CD35 and CD88 on the surface of neutrophils and monocytes stimulated with *E. coli* and bacterial ghosts was assayed. It was established that *E. coli* and bacterial ghosts increased the expression of CD35, CD88, CD282 и CD284 by neutrophils and monocytes even in very low concentrations, suggesting its' use as potential biomarkers in the differential diagnostics of etiology of acute infections.

Keywords: differential diagnostics of infections, toll like receptors, complement receptors.

Поступила 31.08.2016

ПОКАЗАТЕЛИ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С ОПОЯСЫВАЮЩИМ ЛИШАЕМ И ВЕТРЯНОЙ ОСПОЙ

Гончаров А.Е.¹, Давидович Г.М.^{2,3}, Романова И.В.¹, Дуж Е.В.¹

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

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

³Учреждение здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Исследованы основные и минорные субпопуляции Т-клеток у пациентов, страдающих ветряной оспой и опоясывающим лишаем. У пациентов с ветряной оспой выявлено увеличение содержания цитотоксических Т-клеток и активированных Т-клеток и одновременно снижение количества регуляторных клеток, а также перераспределение Т-клеток памяти в сторону эффекторных ТЕМ- и ТЕМРА-субпопуляций, что указывает на выраженную реакцию иммунной системы. При ОЛ установлено лишь увеличение содержания ТЕМ-1 клеток периферической крови, при этом количество ТЕМ-2 лимфоцитов, представляющих собой в основном CD8⁺ лимфоциты, уменьшается. Такие изменения свидетельствуют о недостаточной реакции иммунитета при ОЛ, предполагая наличие анергии иммунной системы и подтверждая частое развитие болезни у пациентов со вторичными иммунодефицитами.

Ключевые слова: ветряная оспа, опоясывающий лишай, Т-клетки, иммунный статус.

Введение. Возбудителем как ветряной оспы (ВО), так и опоясывающего лишая (ОЛ) является вирус *Varicella Zoster*, при этом клиническая картина заболеваний существенно отличается [1–3]. Важнейшую роль в выздоровлении от ВО и предотвращении активации вируса при ОЛ играет состояние Т-клеточного иммунитета. Вместе с тем отсутствуют достоверные данные об особенностях

дифференцировки Т-клеток памяти у пациентов с этими заболеваниями и о содержании в периферической крови «истощенных» Т-лимфоцитов.

Цель работы — изучение особенностей показателей Т-клеточного иммунитета у пациентов с ВО и ОЛ.

Материалы и методы. Объектами для *in vitro* исследований служили образцы периферической крови 13 пациентов с ветряной оспой (В01.9 по МКБ-10) и 12 пациентов с опоясывающим лишаем (В02.9 по МКБ-10), сравнимых по возрасту (18–36 лет). У пациентов отсутствовали в анамнезе ВИЧ, онкозаболевания, прием иммуносупрессивных препаратов. Для получения контрольных значений ряда показателей использовали 22 образца крови доноров (контрольная группа, К), сопоставимых по возрасту и полу с пациентами.

Имунофенотип лейкоцитов определяли методом проточной цитометрии с использованием 3–8 цветовых меток. У пациентов в периферической крови определяли относительное и абсолютное содержание Т-клеток с разным типом Т-клеточного рецептора, Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток, субпопуляций Т-клеток памяти, Т-регуляторных клеток, активированных Т-клеток, «истощенных» Т-лимфоцитов. Определяли содержание следующих субпопуляций Т-клеток: наивные (Naïve) (CD3⁺CCR7⁺CD45RA⁺), центральные Т-клетки памяти (TCM) (CD3⁺CCR7⁺CD45RA⁻), эффекторные Т-клетки памяти (TEM) (CD3⁺CCR7⁻CD45RA⁻), TEM-1 (CD3⁺CCR7⁻CD45RA⁻CD28⁺), TEM-2 (CD3⁺CCR7⁻CD45RA⁻CD28⁻) и терминально дифференцированные Т-клетки памяти (TEMRA) (CD3⁺CCR7⁻CD45RA⁺). На лимфоцитах определяли 3 маркера «истощенных» Т-клеток: Tim-3, CD223 (Lag-3) и CD279 (PD-1). Учет проводили на проточных цитофлюориметрах «FACSCalibur» и «FACSCanto II». Данные анализировали при помощи программного обеспечения Weasel версии 3.0.2 и FACSDiva версии 7.

Определение иммунофенотипа клеток крови. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Statistica 10 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде медианы с интерквартильным размахом в виде 25 и 75-й перцентилей. Для сравнения групп данных использовали непараметрические методы. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. *Основные субпопуляции Т-лимфоцитов.* Не было выявлено статистически достоверных отличий в абсолютном и относительном содержании CD3⁺ Т-клеток, CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов и CD3⁺CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов в периферической крови у пациентов с ОЛ по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p < 0,05$) (таблица). В то же время установлено, что у пациентов с ВО абсолютное и относительное число CD3⁺CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов увеличивается ($p < 0,04$), а относительное содержание CD4⁺ Т-хелперов снижается ($p = 0,012$).

Таблица — Субпопуляции Т-клеток у пациентов с инфекцией, вызванной ВГЧ-4

Субпопуляция лимфоцитов	Здоровые добровольцы (К)	Пациенты с ВО	Пациенты с ОЛ	Уровень значимости (p)		
				ВО vs К ^А	ОЛ vs К ^А	ВО vs ОЛ*
Т-клетки, %	73,5 (69,8–79,1)	76,2 (70,5–81,5)	69,5 (67,5–79,5)	0,637	0,417	0,480
Т-клетки, ×10 ⁶ /мл	1,57 (1,26–2,11)	1,744 (1,436–2,760)	1,537 (0,914–2,416)	0,462	0,836	0,377
Т-хелперы, %	45,1 (40,9–51,7)	37,6 (25,6–40,2)	38,2 (34,0–49,9)	0,012	0,234	0,480
Т-хелперы, ×10 ⁶ /мл	0,97 (0,75–1,22)	0,972 (0,286–1,339)	1,147 (0,364–1,193)	0,836	0,925	0,659
Т-цитотокс. %	25,6 (22,2–29,7)	36,7 (31,8–41,7)	28,9 (16,1–33,8)	0,006	0,940	0,077
Т-цитотокс, ×10 ⁶ /мл	0,59 (0,42–0,74)	1,113 (0,546–1,201)	0,461 (0,431–0,644)	0,043	0,559	0,052

Окончание таблицы

Субпопуляция лимфоцитов	Здоровые добровольцы (К)	Пациенты с ВО	Пациенты с ОЛ	Уровень значимости (p)		
				ВО vs К ^Δ	ОЛ vs К ^Δ	ВО vs ОЛ*
T-регуляторные клетки, %	3,74 (2,77–4,83)	1,93 (0,97–3,00)	3,64 (2,74–3,87)	0,003	0,823	0,042
T-регуляторные клетки, 10 ⁶ /мл	0,062 (0,042–0,108)	0,057 (0,025–0,065)	0,082 (0,028–0,117)	0,446	0,581	0,158
CD39 ⁺ T-регуляторные клетки, %	0,72 (0,48–0,90)	0,53 (0,29–0,76)	0,93 (0,52–1,46)	0,020	0,596	0,158
CD39 ⁺ T-регуляторные клетки, 10 ⁶ /мл	0,013 (0,009–0,017)	0,010 (0,007–0,025)	0,017 (0,015–0,028)	0,713	0,967	0,427
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	5,4 (3,8–6,5)	20,6 (14,1–31,5)	5,6 (3,3–8,5)	0,001	0,977	0,008
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , ×10 ⁶ /мл	0,11 (0,07–0,18)	0,541 (0,321–0,729)	0,106 (0,064–0,156)	0,001	0,954	0,010
TCM, %	18,4 (15,8–20,1)	6,7 (5,9–9,0)	19,7 (15,7–27,0)	0,0003	0,556	0,017
TCM, ×10 ⁶ /мл	0,32 (0,27–0,41)	0,20 (0,15–0,32)	0,56 (0,23–0,77)	0,045	0,525	0,112
Naïve, %	20,7 (17,2–24,8)	9,3(7,6–11,0)	13,9 (7,0–26,4)	0,0005	0,212	0,427
Naïve, ×10 ⁶ /мл	0,41 (0,27–0,54)	0,26 (0,14–0,33)	0,32 (0,07–0,87)	0,077	0,654	0,791
TEM-1, %	12,5 (10,1–13,4)	19,2 (16,6–24,6)	20,7 (14,3–20,8)	0,003	0,0004	0,724
TEM-1, ×10 ⁶ /мл	0,19 (0,14–0,28)	0,55 (0,32–0,68)	0,39 (0,30–0,59)	0,004	0,002	0,377
TEM-2, %	7,8 (5,7–9,0)	14,4 (12,9–19,6)	3,5 (1,8–4,0)	0,012	0,003	0,003
TEM-2, ×10 ⁶ /мл	0,12 (0,08–0,19)	0,38 (0,21–0,46)	0,06 (0,05–0,07)	0,005	0,006	0,001
TEMRA, %	10,8 (4,9–19,1)	18,5 (10,2–25,8)	4,6 (2,9–11,1)	0,179	0,248	0,077
TEMRA, ×10 ⁶ /мл	0,19 (0,11–0,35)	0,34 (0,21–0,53)	0,12 (0,07–0,28)	0,126	0,334	0,034
CD3 ⁺ Lag-3 ⁺ , %	0,17 (0,12–0,21)	1,43 (1,15–1,75)	0,97 (0,82–1,34)	0,0003	0,0003	0,145
CD3 ⁺ Lag-3 ⁺ , ×10 ⁶ /мл	0,003 (0,002–0,006)	0,044 (0,023–0,056)	0,024 (0,013–0,031)	0,0003	0,0007	0,251
CD3 ⁺ PD-1 ⁺ , %	0,6 (0,4–1,0)	7,3 (5,6–10,2)	3,6 (2,3–7,9)	0,0003	0,002	0,251
CD3 ⁺ PD-1 ⁺ , ×10 ⁶ /мл	0,02 (0,01–0,02)	0,199 (0,114–0,260)	0,067 (0,056–0,112)	0,0003	0,001	0,077
CD3 ⁺ Tim-3 ⁺ , %	0,53 (0,35–0,91)	1,1 (0,52–4,42)	0,63 (0,49–0,84)	0,08	0,540	0,133
CD3 ⁺ Tim-3 ⁺ , ×10 ⁶ /мл	0,009 (0,005–0,026)	0,028 (0,020–0,076)	0,013 (0,010–0,014)	0,05	0,540	0,093

Содержание регуляторных Т-клеток, в т. ч. CD39⁺ субпопуляции, не различалось между группами пациентов с ОЛ и здоровыми добровольцами ($p > 0,5$), относительное же содержание регуляторных клеток у пациентов с ВО было снижено ($p < 0,020$).

У пациентов с ВО значительно (в 3–6 раз) увеличивалось содержание активированных HLA-DR⁺ Т-клеток ($p = 0,001$), в то время как аналогичный показатель у пациентов с ОЛ был в пределах значений, типичных для здоровых добровольцев.

Характер изменений в содержании Т-клеток указывает на то, что у пациентов с ВО выявляется активация Т-лимфоцитов с увеличением числа цитотоксических Т-клеток, важных для противовирусного иммунитета, в то же время снижено количество регуляторных клеток, что отражает нормальное течение инфекционного процесса. Для пациентов с ОЛ типичным является отсутствие существенных изменений в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов и экспрессии маркеров активации, что предполагает наличие анергии иммунной системы.

Т-клетки памяти. Известно, что в процессе жизненного цикла Т-клетки проходят путь от наивных Т-клеток к терминально-дифференцированным клеткам памяти. Данный процесс ассоциирован со сменой ряда маркеров дифференцировки на поверхности клеток: наивные Т-клетки (CCR7⁺/CD62L⁺ CD45RA⁺CD45R0⁻), центральные Т-клетки памяти TCM (CCR7⁺/CD62L⁺ CD45RA⁻CD45R0⁺), эффекторные Т-клетки памяти – TEM (претерминально-дифференцированные: CCR7⁻/CD62L⁻ CD45RA⁻CD45R0⁺), терминально-дифференцированные Т-клетки – TEMRA (CCR7⁻/CD62L⁻ CD45RA⁺CD45R0⁻) [4]. Нормальное протекание инфекционного процесса предполагает уменьшение содержания наивных Т-клеток и увеличение числа TCM-клеток и особенно эффекторных Т-клеток памяти.

Достоверное уменьшение относительного содержания наивных Т-клеток было выявлено только у пациентов с ВО ($p = 0,0005$). Изменений в содержании наивных Т-клеток у пациентов с ОЛ не установлено. Содержание TCM было существенно снижено у пациентов с ВО по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p = 0,0003$) и группой пациентов с ОЛ. Увеличение числа TEM-1 клеток установлено как в группе пациентов с ВО ($p = 0,003$), так и с ОЛ ($p = 0,0004$). В то же время относительное и абсолютное содержание TEM-2 клеток было увеличено только у пациентов с ВО ($p = 0,012$), а у пациентов с ОЛ было снижено ($p = 0,003$). Статистически значимых различий в содержании TEMRA субпопуляции у пациентов с ОЛ и ВО не установлено, что, вероятно, обусловлено высокой вариабельностью значений этого показателя. Графически данные представлены на рисунке.

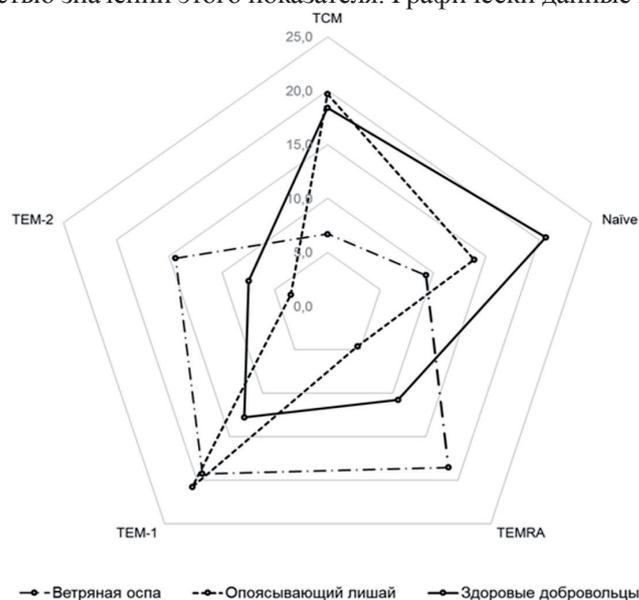


Рисунок — Лепестковая диаграмма, отражающая содержание субпопуляций Т-клеток памяти у пациентов с ВО и ОЛ

Таким образом, полученные результаты указывают на перераспределение Т-клеток памяти у пациентов с ВО в сторону эффекторных TEM- и TEMRA-субпопуляций за счет уменьшения содер-

жания наивных и ТСМ-лимфоцитов, что доказывает выраженную активацию иммунного ответа. В то же время у пациентов с ОЛ изменения в содержании Т-клеток памяти были не столь значительны и ограничены лишь ТЕМ-субпопуляцией. Вышеописанное свидетельствует об анергии Т-клеточного звена иммунитета.

Истощенные Т-клетки. Истощенные Т-клетки развиваются в условиях постоянного воздействия антигена — опухолевых клеток или микроорганизмов. Известно, что длительная стимуляция Т-клеточного рецептора антигенами меняет профиль экспрессии генов, в результате усиливается экспрессия коингибиторных рецепторов. Название «коингибиторные» получены потому, что их активация при получении Т-клеткой антигенного сигнала приводит к подавлению пролиферации клеток, снижению их функциональной активности и устойчивости к апоптозу [5].

Установлено, что содержание «истощенных» Т-клеток с фенотипом CD223 (Lag-3)⁺ и CD279 (PD-1)^{hi} увеличено многократно у пациентов как с ВО, так и с ОЛ, в то время как количество Tim-3⁺ Т-клеток было увеличено только у пациентов с ВО.

Заключение. Характер изменений в содержании Т-клеток у пациентов с ВО указывает на выраженную реакцию иммунной системы в ответ на возбудителя болезни, что проявляется в увеличении содержания цитотоксических Т-клеток, активированных Т-клеток и одновременном снижении количества регуляторных клеток, а также в перераспределении Т-клеток памяти в сторону эффекторных ТЕМ- и ТЕМРА-субпопуляций за счет уменьшения содержания наивных и ТСМ-лимфоцитов.

В то же время у пациентов с ОЛ отсутствуют существенные изменения в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов и экспрессии маркеров активации. При ОЛ наблюдается лишь увеличение содержания ТЕМ-1 клеток периферической крови, при этом количество ТЕМ-2 лимфоцитов, представляющих собой в основном CD8⁺ лимфоциты, уменьшается. Такие изменения свидетельствуют о недостаточной реакции иммунитета при ОЛ, предполагая наличие анергии иммунной системы и подтверждая частое развитие болезни у пациентов со вторичными иммунодефицитами.

Литература

1. Association between vaccination for herpes zoster and risk of herpes zoster infection among older patients with selected immune-mediated diseases / J. Zhang [et al.] // JAMA. — 2012. — Vol. 308, № 1. — P. 43–49.
2. Analysis of T cell responses during active varicella-zoster virus reactivation in human ganglia / M. Steain [et al.] // J. Virol. — 2014. — Vol. 88, № 5. — P. 2704–2716.
3. Altered phenotype and functionality of varicella zoster virus-specific cellular immunity in individuals with active infection / D. Schub [et al.] // J. Infect. Dis. — 2015. — Vol. 211, № 4. — P. 600–612.
4. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study / M. Streitz [et al.] // Transplant. Res. — 2013. — Vol. 2, № 1. — P. 17.
5. Freeman, G.J. A new therapeutic strategy for malaria: targeting T cell exhaustion / G.J. Freeman, A.H. Sharpe // Nat. Immunol. — 2012. — Vol. 13, № 2. — P. 113–115.

PARAMETERS OF T-CELL IMMUNITY IN ADULT PATIENTS WITH HERPES ZOSTER AND VARICELLA

Hancharou A.E.¹, Davidovich G.M.^{2,3}, Ramanava I.U.¹, Duzh A.V.¹

¹State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”, Minsk, Republic of Belarus;

²Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus;

³Health Care Institution “Municipal Clinical Infection Hospital”, Minsk, Republic of Belarus

Basic and minor T-cell subsets in the patients with varicella and herpes zoster were assayed. In the patients with varicella the increase of cytotoxic T-cells and activated T-cells was established, together with the decrease of regulatory T-cells and redistribution of effector/memory T-cells towards ТЕМ and ТЕМРА subsets, indicative of normal immunity activation. Herpes zoster was characterized by the absence of significant changes in the T-cell subsets, except of the increase of ТЕМ-1 cells and decrease in ТЕМ-2. Such changes indicate insufficient immune system reaction in herpes zoster, suggesting immune anergy.

Keywords: herpes zoster, varicella, T-cells, immunity.

Поступила 30.08.2016

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИВИДОВЫХ АНТИТЕЛ К СН2 И СН3 ДОМЕНАМ IGG ЧЕЛОВЕКА У МЫШЕЙ

Маханько О.В., Фомина Е.Г., Счесленок Е.П., Семижон П.А., Школина Т.В., Дубков Н.А.,
Князева О.Р., Владыко А.С.

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

Реферат. Получен мышинный поликлональный препарат антивидовых иммуноглобулинов, специфичных к Fc-фрагменту IgG человека. В качестве иммуногена использован рекомбинантный полипептид, включающий СН2 и СН3 домены Fc-региона IgG1 человека, что позволяет говорить о моноспецифичности (МС) препарата. Конъюгированные с пероксидазой данные антитела (МСАТ) не уступали в ТИФА по специфичности аналогичным коммерческим моноклональным и превосходили их по специфической активности. В сравнении с коммерческими козыми поликлональными конъюгатами, полученными с использованием нативного Fc-фрагмента IgG человека, моноспецифические антитела характеризовались меньшей перекрестной специфичностью к IgM человека, но уступали в специфической активности. При конъюгации МСАТ с ФИТЦ и визуализации *Borrelia* (возбудителей болезни Лайма) методом непрямой иммунофлуоресценции отмечен пониженный уровень неспецифического окрашивания по сравнению с коммерческим козым поликлональным антивидовым конъюгатом.

Ключевые слова: антивидовые иммуноглобулины, рекомбинантный полипептид, иммунизация, поликлональный моноспецифический антивидовой конъюгат.

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 и иммунофлуоресцентных диагностических тест-систем, предназначенных для выявления специфических антител, являются соответствующие антивидовые конъюгаты. Для получения препаратов антивидовых антител применяют иммунизацию средних и крупных животных, где в качестве иммуногенов выступают иммуноглобулины сыворотки крови [2]. Чтобы получить моноклональные антитела (МАТ, как правило, мышинные), используют метод гибридомной технологии.

Несомненным преимуществом МАТ является их высокая специфичность, поскольку они связываются только с одним эпитопом антигена (В-сайтом Ig). Вместе с тем даже незначительное изменение этого эпитопа (например, в иммуноблоттинге) может привести к утрате специфичности [1]. Антивидовые МАТ значительно уступают по специфической активности поликлональным антивидовым иммуноглобулинам (ПАИ), полученным от иммунизированных кроликов или коз. Рабочее разведение для МАТ составляет от 1/100 до 1/2000, тогда как для поликлональных АТ 1/1000–1/20000 и выше. К тому же способ получения антивидовых МАТ трудоемок и занимает несколько месяцев, а то и годы, тогда как ПАИ происходят от разных популяций клеток и вариабельны по своей специфичности (т. к. соответствуют разным эпитопам одного антигена), аффинности, классам и подклассам (различные изотипы). Это обеспечивает надежность и пластичность связывания поликлональных антител с антигеном. Получение поликлональных антител занимает меньше времени и менее трудо- и материалозатратно. Недостатком их является невысокая воспроизводимость. Количество и качество их варьирует от животного к животному и зависит от времени получения.

Таким образом, приведенный выше анализ показал, что как для антивидовых МАТ, так и для ПАИ имеются присущие только им преимущества. Задача состояла в том, чтобы объединить эти диагностически важные качества и получить препарат антивидовых антител с новыми свойствами. С этой целью для иммунизации были использованы мыши, а в качестве антигена — рекомбинантные полипептиды высокоиммуногенных участков Fc фрагмента антител вместо полноразмерных иммуноглобулинов, что к тому же позволило максимально исключить примеси посторонних белков и неспецифические реакции. Полученные таким способом поликлональные антитела являются моноспецифическими.

Цель работы — получение поликлональных моноспецифических антивидовых антител у мышей с использованием в качестве иммуногена рекомбинантного полипептида Fc фрагмента (участки СН2 и СН3 доменов) IgG человека и сравнение их с коммерческими поли- и моноклональными антивидовыми иммуноглобулинами.

Материалы и методы. Топологическая карта аминокислотных последовательностей Fc фрагментов тяжелых цепей IgG человека была составлена с использованием авторской компьютерной программы wxGeneBee. За основу в программе взяты шкалы гидрофобности и гидрофильности, предложенные Hopp and Woods и Kyte and Doolittle.

Комплементарную ДНК тяжелых цепей IgG человека получали с помощью реакции обратной транскрипции на матрице РНК, выделенной из клеточной линии лимфомы IM9 (предоставлена Республиканским научно-практическим центром детской онкологии и гематологии).

РНК выделяли с использованием коммерческого препарата TRI Reagent BD T3809 (SIGMA-ALDRICH), реакцию обратной транскрипции с последующей ПЦР на матрице кДНК (ОТ-ПЦР) осуществляли со специфическими праймерами с использованием набора реагентов QIAGEN OneStep RT-PCR Kit в соответствии с рекомендациями производителей.

Ампликоны тяжелых цепей IgG лигировали в полилинкер экспрессирующего вектора рJC40. В состав вектора включена последовательность нуклеотидов, с которой экспрессируется поли-His последовательность на N-конце полипептида. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli*, штамм BL21 (DE3). Лигирование, подготовку компетентной клеточной культуры, трансформацию бактериальных клеток проводили по описанным ранее методикам [3, 4].

Корректную плазмиду отбирали по размеру и анализировали рестрикционным картированием с помощью рестриктирующей эндонуклеазы StyI (Fermentas, Литва). В результате селекции отбирали и накапливали в питательной среде по 2 одиночные колонии для каждой трансформированной плазмиды. Отобранные клоны рассеивали штрихом и выделяли из них плазмидную ДНК коммерческим набором QIAprep Miniprep Kit (Qiagen).

Специфичность рекомбинантной ДНК подтверждали секвенированием. Положительные продукты ПЦР, выполненной с праймерами к плазмиде, очищали от агарозного геля с помощью набора для экстракции ДНК из геля Gel Extraction kit (Qiagen, USA). Секвенирующую реакцию проводили с помощью Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, UK) согласно инструкции. Электрофорез и анализ продуктов реакции выполняли на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы MEGA 4.0. Поиск последовательностей, гомологичных выявленным фрагментам ДНК, осуществляли в программе BLAST (NCBI).

Рекомбинантную плазмиду экспрессировали по методике, описанной ранее [3]. Для индукции экспрессии в среду для культивирования добавляли ИПТГ в концентрации 0,4 mM и инкубировали в течение 3–5 ч.

Очистку рекомбинантных полипептидов осуществляли с помощью металлохелатной хроматографии на автоматическом жидкостном хроматографе FPLC АКТА Explorer 100 (GE Healthcare) на колонке HisTrap Chelating HP (GE Healthcare) объемом 1 мл с иммобилизованными катионами Ni²⁺, в денатурирующих условиях в буферах, содержащих 6 M мочевины [5].

Фракции элюции и все остальные фракции хроматографии анализировали электрофорезом в 15% ПААГ в денатурирующих условиях. Количество белка рассчитывали относительно маркера молекулярного веса.

Оценку специфичности связывания очищенного полипептида проводили методом ТИФА с козьими поликлональными антивидовыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma, Kat. # 8419). Для этого делали двукратные разведения рекомбинантного полипептида на растворе ФСБ. В лунки полистерольной иммунологической панели фирмы Greiner (Германия) вносили по 0,1 мл раствора полипептида с разведениями, содержащими от 0,5 до 0,004 мкг. В качестве контроля для сравнения на панель сорбировали нормальную сыворотку человека в разведениях от 1/10 до 1/100000000.

Сорбцию антигена, связывание рекомбинантного полипептида с коммерческим конъюгатом и реакцию визуализации результатов выполняли по стандартной методике. Учет результатов реакции производили спектрофотометрически на иммуноферментном анализаторе Тесап при длине волны 450 нм.

Для получения антивидовых иммуноглобулинов иммунизировали беспородных лабораторных мышей. Титры ИАЖ оценивали методом ТИФА [6].

Иммуноглобулины G из мышинных ИАЖ выделяли и очищали в две стадии: преципитацией сульфатом аммония с последующей гель-фильтрацией [7]. Проводилась дополнительная очистка иммуноглобулинов с помощью металлохелатной хроматографии на HisBind колонке (Sigma) объемом 1 мл с иммобилизованными катионами Ni²⁺, в нативных условиях без денатурирующих реагентов [8].

Специфические мышинные иммуноглобулины конъюгировали с пероксидазой хрена (Sigma) согласно методике Hermanson [8]. Очистку конъюгата от несвязавшейся пероксидазы проводили с помощью гель-фильтрации на автоматическом жидкостном хроматографе FPLC АКТА Explorer 100 (GE Healthcare), на колонке Superdex 200 10/300 GL. В качестве антигена при тестировании конъюгата в ТИФА-скрининге сывороток человека на гепатит С использовали рекомбинантный полипептид к полноразмерному капсидному белку вируса гепатита С (Core).

Для конъюгации мышинных иммуноглобулинов с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) использовали коммерческий набор Pierce NHS-Fluorescein Antibody Labeling Kit (Thermo-Scientific). Конъюгат (концентрацией 2 мг/мл) тестировали в сравнении с козьими поликлональными антителами производства Института им. Н.Ф. Гамалеи согласно прилагаемой инструкции.

Результаты и их обсуждение. Рекомбинантный полипептид, 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).

Для выбора наиболее иммуногенного участка проанализирована аминокислотная и нуклеотидная последовательности Fc фрагмента тяжелой цепи IgG человека по профилю гидрофобности. С использованием коммерческой компьютерной программы wxGenebee и базы данных GeneBank, исходя из структуры молекулы иммуноглобулина G, был рассчитан оптимальный локус: последовательность размером 339 п.о., включающая CH2 домен [9].

Подобран фрагмент для клонирования, соответствующий положению 331–669 п.о. последовательности IgG1 человека, синтезированы праймеры (прямой и обратный) для его амплификации:

IGG1 (прямой) 5'-CGCGAAGCTTCCGTGCCCAGCACCT-3';

IGG2 (обратный) 5'-GCGCCTCGAGTTTGGCTTTGGAGAT-3'.

Дополнительно клонирован фрагмент большего размера, соответствующий CH2+CH3 доменам Fc фрагмента иммуноглобулина G1 331–990 п.о. (660 п.о.):

IGG1 (прямой) 5'-CGCGAAGCTTCCGTGCCCAGCACCT-3';

IGG4 (обратный) 5'-GCGCCTCGAGTTTACCCGGAGACAG-3'.

Нуклеотидная последовательность праймеров включает дополнительно сайты для гидролиза ферментами рестрикции с целью клонирования фрагментов в экспрессирующий вектор (Hind III и XhoI).

Рестрикционный анализ и секвенирование подтвердили искомую специфичность клонированного фрагмента. Рекомбинантные полипептиды иммуноглобулина G человека (размером 330 и 660 п.о.) в составе плазмиды pJC40 экспрессированы в бактериальном штамме *E. coli* BL21(DE3).

Аминокислотная структура полипептидов представлена на рисунке 1.

```
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVVL
DSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

последовательность, обозначенная заливкой серого цвета — CH2 домен,
последовательность без заливки — CH3 домен

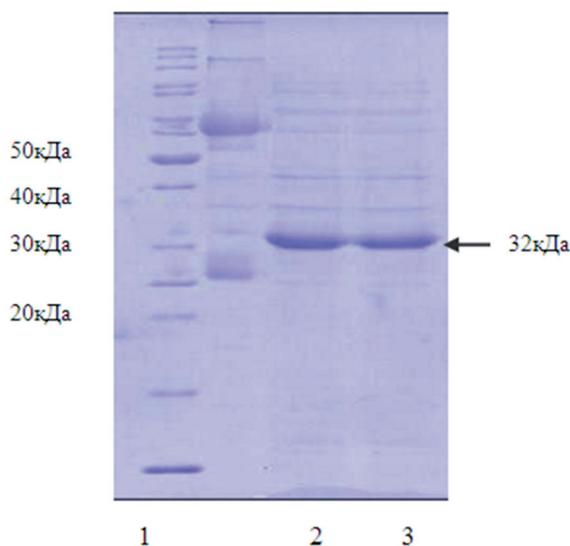
Рисунок 1. — Аминокислотная структура рекомбинантного полипептида, включающего CH2 и CH3 домена IgG1 человека

Полипептид меньшего размера (молекулярной массой около 15 кДа), включающий только CH2 домен иммуноглобулина G, экспрессировался в виде телец включения и был нерастворим при очистке в денатурирующих условиях в буферном растворе, содержащем 6 М мочевины. Полипептид, соответствующий CH2+CH3 доменам (около 32 кДа), был растворим в денатурирующих условиях

на 50%, однако экспрессия в бактериальной культуре растворимой его формы проходила нерегулярно и зависела от условий текущего эксперимента.

В связи с этим иммунизация животных для получения специфических антител проведена полипептидом массой 32 кДа в виде взвеси тельца включения, которые 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 6000g по методике S.M. Singh и A.K. Panda с модификациями [10]. В результате был получен антиген, практически свободный от бактериальных белков со степенью очистки более 95% (рисунок 2).

Специфичность антигена подтверждена в ТИФА — тесте с использованием козьего поликлонального антивидового конъюгата к IgG человека.



Дорожка 1 — маркеры молекулярных масс; дорожки 2 и 3 — очищенные тельца включения рекомбинантного полипептида

Рисунок 2. — Электрофоретический анализ очищенных тельца включения рекомбинантного полипептида, включающего СН2 и СН3 домены Fc-фрагмента IgG человека

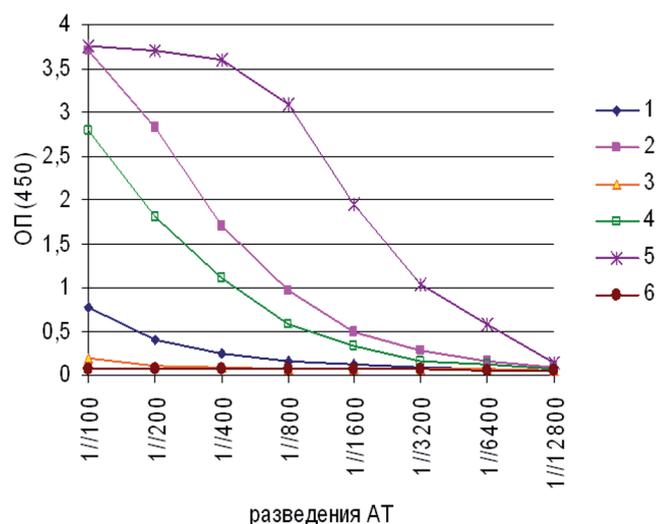
Иммунизация лабораторных животных рекомбинантным полипептидом проведена на самках беспородных лабораторных мышей и описана ранее [6]. Титры отобранных иммуноасцитических жидкостей, оцененные в ТИФА по специфичности к препарату человеческого IgG, находились в диапазоне от 1/5000 до 1/65000.

Для выделения иммуноглобулиновой фракции иммуноасцитические жидкости очищались в три стадии. С помощью преципитации сульфатом аммония и гель-фильтрации выделен препарат специфичных мышинных иммуноглобулинов «грубой» очистки [7]. С помощью дополнительной стадии аффинной хроматографии на Ni-активированных колонках получен препарат высокой степени очистки.

Очищенные мышинные иммуноглобулины конъюгированы с пероксидазой хрена и ФИТЦ. После проведения химической реакции пероксидазные препараты подвергались разделению гель-фильтрацией на автоматическом жидкостном хроматографе с целью удаления несвязавшегося фермента. Для ТИФА использовались фракции, соответствующие иммуноглобулинам, ковалентно связанным с 1–2 молекулами пероксидазы.

Оценка специфичности и специфической активности полученных антивидовых мышинных антител проводилась в ТИФА для иммуноферментного конъюгата и на препаратах *Borrelia* (возбудителей болезни Лайма) методом непрямой иммунофлуоресценции для конъюгата с ФИТЦ.

Мышинные антитела, меченные пероксидазой, были специфичны к препарату человеческого IgG, в то же время их перекрестная реактивность на человеческие IgM была значительно ниже, чем у аналогичного коммерческого козьего препарата производства Sigma. Неспецифическое связывание с бычьим сывороточным альбумином (БСА) практически отсутствовало (рисунок 3).



2 и 5 — специфичность полученных мышинных антител и коммерческих антител к препарату человеческого IgG соответственно; 1 и 4 — перекрестная реактивность к человеческим IgM соответственно; 3 и 6 — неспецифическое связывание с БСА соответственно

Рисунок 3. — Специфичность и специфическая активность мышинных поликлональных антител, моноспецифических к человеческому IgG1, по сравнению с коммерческим козьим поликлональным анти-IgG человека препаратом (производство Sigma) в ТИФА

Концентрация мышинных антител в первом разведении равнялась 5×10^{-3} мкг/мкл, коммерческих козьих — 5×10^{-4} мкг/мкл. Коммерческий препарат в первой лунке разведен в 30000 раз, соответственно мышинный — в 3000 раз при равных концентрациях исходных препаратов.

Проведено предварительное исследование полученного нами мышинного моноспецифического конъюгата с пероксидазой в сравнении с моноклональным конъюгатом фирмы «Фармлэнд» при определении антител к вирусу гепатита С в сыворотках крови пациентов. Соотношение оптической плотности положительных и отрицательных образцов при использовании исследуемого конъюгата было выше, чем при использовании коммерческого моноклонального. Результаты приведены в таблице.

Таблица — Скрининг сывороток пациентов на антитела к вирусу гепатита С методом ТИФА с использованием моноклонального антивидового конъюгата производства Фармлэнд и мышинного поликлонального моноспецифического антивидового конъюгата

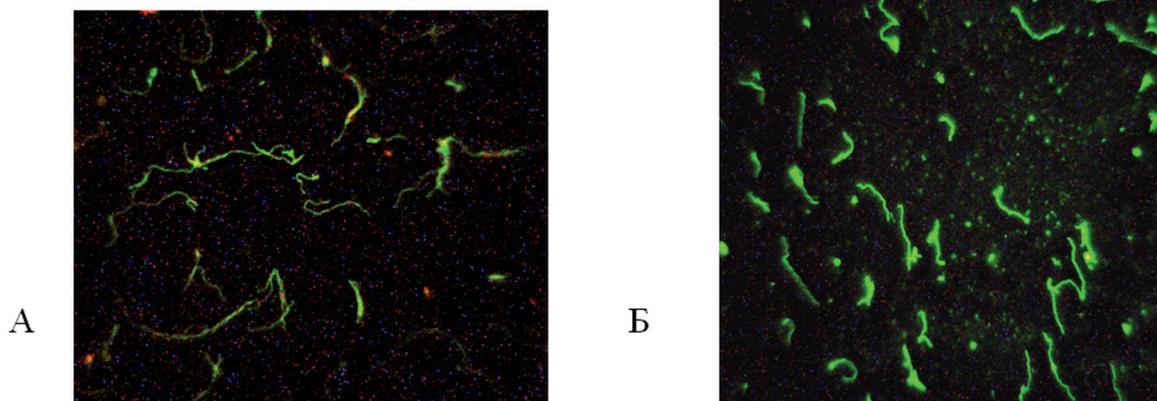
Шифр сыворотки	Оптическая плотность ОП (450нм)		Результат
	антивидовой конъюгат		
	моноклональный Фармлэнд	мышинный поликлональный моноспецифический	
15	0,126	0,174	Отрицательный
18	0,107	0,185	Отрицательный
20	0,118	0,162	Отрицательный
17	0,386	0,901	Положительный
10	2,338	3,233	Положительный
7	0,934	1,711	Положительный
4	1,134	1,918	Положительный
1	2,514	3,063	Положительный

По данным литературы и фирм-производителей коммерческих препаратов, козьи поликлональные антивидовые конъюгаты, меченые пероксидазой, используются в ТИФА, как правило, при

разведении 1:5000–1:10000, мышинные поликлональные разводятся в диапазоне 1:500–1:5000, моноклональные — 1:100–1:1000.

Таким образом, полученный в результате исследований мышинный моноспецифический поликлональный антивидовой конъюгат сочетает в себе преимущества моноклонального мышинного, не уступая ему в специфичности, превосходя его по специфической активности, и поликлонального козьего, уступая ему в специфической активности лишь в 3–4 раза.

Сравнительный анализ полученного в результате исследований и коммерческого конъюгатов с ФИТЦ в реакции непрямой иммунофлуоресценции на положительных к боррелиозным антигенам сыворотках пациентов показал, что качество визуализации возбудителя при использовании антивидового конъюгата РНПЦ ЭМ не уступало качеству козьего поликлонального конъюгата производства Института им. Н.Ф. Гамалеи (рисунок 4).



А — поликлональный моноспецифический мышинный конъюгат (РНПЦ ЭМ, г. Минск), разведение 1: 2; Б — поликлональный козий конъюгат производства Института им. Н.Ф. Гамалеи, разведение 1:16

Рисунок 4. — Сравнительный анализ антивидовых конъюгатов, меченых ФИТЦ, при исследовании боррелий, возбудителей болезни Лайма, методом непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ)

Заключение. Получены поликлональные моноспецифические антивидовые антитела у мышей с использованием в качестве иммуногена рекомбинантного полипептида Fc фрагмента (участки CH2 и CH3 доменов) IgG человека, иммуноферментные и иммунофлуоресцентные конъюгаты которых не уступали коммерческим моно- и поликлональным антивидовым конъюгатам при использовании в ТИФА и РНИФ.

Литература

1. Рабсон, А. Основы медицинской иммунологии / А. Рабсон, А. Ройт. — М.: Мир, 2006. — 320 с.
2. Способ получения флуоресцирующего антивидового конъюгата против IgG человека или животного для реакции непрямой иммунофлуоресценции: пат. 2240823: Рос. Федерации МПК А61К39/395, G01N33/531 / О.А. Тимашева, С.А. Басалгина; дата публ. 27.11.2004.
3. Антигенные свойства рекомбинантного полипептида, содержащего повторы антигенной детерминанты нуклеокапсидного белка вируса гепатита С / П.А. Семижон [и др.] // Здоровоохранение. — 2006. — № 11. — С. 35–37.
4. Sambrook, J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual: in 3 vol. / J. Sambrook, D.W. Russell. — 3rd ed. — New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. — Vol. 1. — 749 p.
5. Получение и характеристика рекомбинантного полипептида нуклеокапсидного белка вируса Марбург / П.А. Семижон [и др.] // Здоровоохранение. — 2014. — № 10. — С. 31–35.
6. Получение мышинных поликлональных моноспецифических антител к рекомбинантному белку, включающему CH2 и CH3 домены Fc-фрагмента IgG человека / О.В. Маханько [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2015. — Вып. 8. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

7. Применение эксклюзионной хроматографии для получения очищенных иммуноглобулинов G из мышиной иммуноасцитической жидкости / Н.А. Дубков [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2015. — Вып. 8. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

8. Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques / G.T. Hermanson. — Elsevier, 2008. — 1233 p.

9. Получение и характеристика ампликонов, кодирующих CH2 домен иммуноглобулина человека класса G и CH3 домен иммуноглобулина класса M / Е.В. Устинович [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2014. — Вып. 7. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

10. 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 AND CHARACTERIZATION OF MURINE ANTI- HUMAN ANTIBODIES AGAINST CH2 AND CH3 DOMAINS OF IGG

*Makhanko O.V., Fomina E.G., Scheslenok E.P., Semizhon P.A., Shkolina T.V., Dubkov N.A., Vladyko A.S.
State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus*

Polyclonal anti-human immunoglobulins, specific to Fc-fragment of IgG, were obtained in mice. Recombinant protein containing CH2 and CH3 domains of human IgG was used as an immunogene, so the product can be considered monospecific (MS). Having been conjugated to horseradish peroxidase, the antibodies were comparable to commercial monoclonal antibodies in specificity and were superior to them in specific activity. Monospecific antibodies (MS) had less non-specific reactivity to human IgM than commercial goat polyclonal secondary antibodies, but were inferior to them in specific activity. FITC-conjugated MS immunoglobulins demonstrated low non-specific staining level in comparison to goat polyclonal ones, produced in Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Russia).

Keywords: antispecies immunoglobulins, recombinant protein, immunization, polyclonal monospecific secondary antibodies conjugate.

Поступила 15.09.2016

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБОВ ГЕЙТИРОВАНИЯ БАЗОФИЛОВ НА ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРЕ

Романова И.В., Гончаров А.Е.

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

Реферат. Проведены сравнительные исследования способов гейтирования с помощью восьмицветного анализа на проточном цитофлюориметре. Рассчитан индекс разделения популяций в зависимости от используемого флуорохрома для каждого способа гейтирования. Показано, что наиболее четкое выделение кластера базофилов от других клеточных популяций и наиболее высокий индекс разделения популяций наблюдается при использовании двух способов гейтирования IgE^{hi} и CD123⁺HLA-DR⁻.

Ключевые слова: базофилы, гейтирование, проточная цитометрия, индекс разделения популяций.

Введение. Базофилы — минорная популяция клеток периферической крови, составляющая до 1% от всех лейкоцитов. Немногочисленный состав, нестабильность клеток при манипуляции с образцом крови, а также ранее ошибочное мнение, что базофилы являются лишь предшественниками тканевых тучных клеток, не позволяло полноценно изучить функции базофилов. На сегодняшний день базофилам придают важное значение в патогенезе многих иммунологических реакций, начиная от реакций гиперчувствительности и заканчивая участием в инфекционном иммунитете [1].

В настоящее время исследование функционального состояния базофилов с помощью проточной цитометрии лежит в основе метода диагностики гиперчувствительности теста активации базо-

филов [2]. Однако важным вопросом является стандартизация данной методики, в частности выбор молекул для идентификации базофилов на проточном цитометре. Учитывая, что базофилы располагаются среди мононуклеаров в координатах бокового и прямого светорассеяния, необходимо подобрать такие маркеры, которые позволяли бы отделить базофилы от Т-, В-лимфоцитов, моноцитов, дендритных клеток.

С целью идентификации базофилов в настоящее время используются семь основных способов гейтирования: 1) CD123^{hi}/HLA-DR^{neg}; 2) CD3⁻CD193⁺; 3) CD193⁺; 4) CD45^{dim}IgE^{bright}; 5) IgE^{hi}; 6) CD3⁻CD294⁺; 7) CD203c⁺. Данные стратегии гейтирования позволяют выделить базофилы с разной степенью эффективности, что может отразиться на конечном результате диагностики.

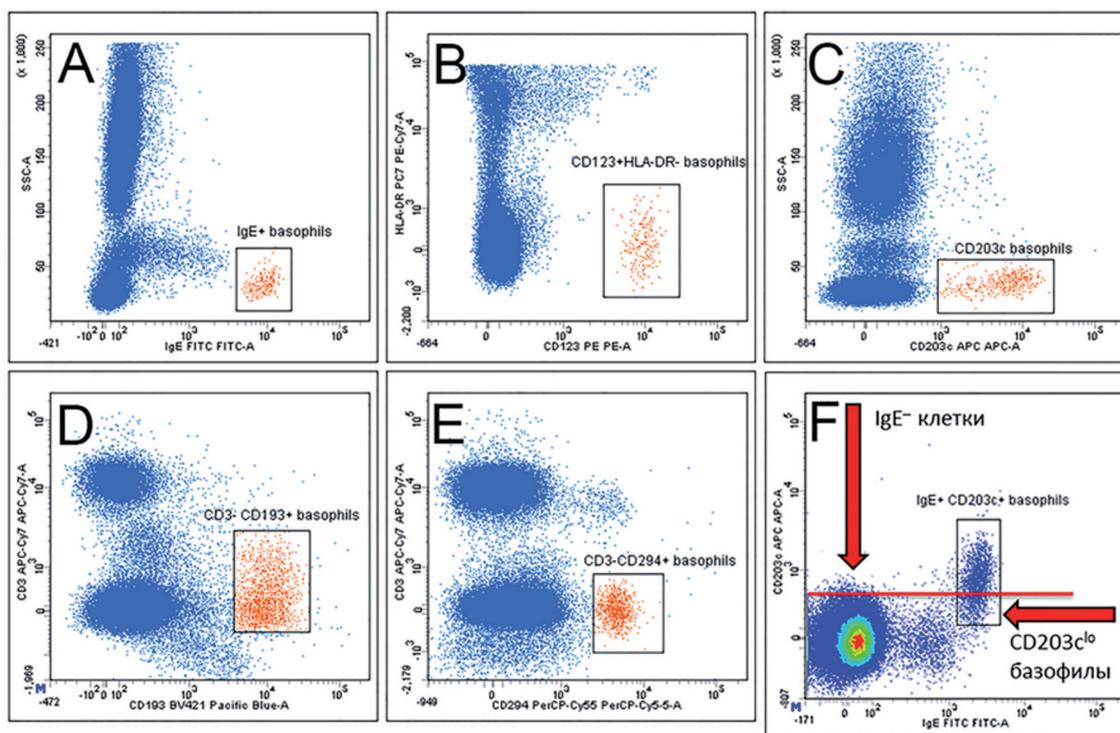
Цель работы — сравнение способов гейтирования и определение той комбинации молекул, которая бы позволяла максимально эффективно выделить базофилов на проточном цитометре.

Материалы и методы. В качестве *объектов исследования* использовали 10 образцов периферической крови здоровых добровольцев. Кровь забирали натошак из кубитальной вены в количестве 5–6 мл. *Проточная цитометрия.* Кровь в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами на протяжении 15 мин при температуре +4°C. Для идентификации базофилов на проточном цитометре была использована следующая панель антител: CD193 – BV421, клон 5E8 (BD, США); HLA-DR – V500, клон G46-6 (BD, США); IgE – FITC, клон 4H10 (ExBio, Чехия); CD123 – PE, клон SSDCLY107D2 (Beckman Coulter, США); CD294 – PerCP-Cy 5.5, клон BM16 (BD, США); CD45 – PE-Cy7, клон HI30 (BD, США); CD203c – APC, клон NP4D6 (ExBio, Чехия); CD3 – APC-Cy7. После чего лизировали эритроциты раствором хлорида аммония, осаждали клетки центрифугированием 5 мин при 250g, удаляли супернатант и суспендировали клетки в фосфатном буфере. Учет проводили на проточном цитометре BD FACSCanto II. Данные анализировали при помощи программного обеспечения FACSDiva версии 7 [3, 4]. *Статистический анализ.* Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Statistica 10 (StatSoft, США) [5, 6]. Значения показателей представлены в виде Me (25–75), где Me — медиана, а 25 и 75 — интерквартильный размах в виде 25 и 75-й перцентилей. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро–Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна–Уитни. Для сравнения трех групп независимых данных был использован метод рангового анализа вариаций Краскела–Уоллиса. В случае если уровень значимости составлял меньше 0,05, проводили парное сравнение данных между группами, используя метод Манна–Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Учитывая небольшое количество базофилов в периферической крови, их анализ на проточном цитометре требует учета большого количества событий, как правило, не менее 200 тыс. на опыт. Поставленная задача выбрать оптимальный способ гейтирования предполагает использовать максимально возможное количество моноклональных антител в одной пробирке, следовательно, учет результатов проводился с помощью восьмицветного анализа на проточном цитометре FACSCanto II.

Оценку способов гейтирования проводили в каждой пробе при помощи программного обеспечения FACSDiva. Учитывая возможности цитофлуориметра FACSCanto II, анализ базофилов сопровождался исключением на цитограмме в координатах FSC-Area/FSC-Height конгломератов (doublets) из учета. После чего выделяли регион мононуклеаров и путем логического гейтирования оценивали эффективность разных молекул для идентификации базофилов. Оценивали эффективность ручного гейтирования базофилов, четкое разграничение кластера базофилов от других клеток.

Базофилы — единственные клетки периферической крови, несущие на своей поверхности полную тетрамерную форму высокоаффинного рецептора к IgE. Учитывая, что неполную форму рецептора к IgE также в небольшом количестве экспрессируют другие популяции (моноциты, В-клетки, мДК), на цитограмме SSC/IgE наблюдается две фракции IgE-позитивных клеток (рисунок 1А). Следовательно, для корректного выделения базофилов с использованием IgE необходимо захватывать в регион исключительно IgE^{hi}-клетки. Как показано на рисунке 1, В регион CD123⁺HLA-DR⁻ четко выделяется в пределах одной декады на шкале флуоресценции. Кластер CD123⁺HLA-DR⁻ расположен отдельно от других клеток, что позволяет без труда выделить регион.



А — способ гейтирования SSC^{low}/IgE^{hi} ; В — способ гейтирования $CD123^{+}HLA-DR^{-}$;
 С — способ гейтирования $CD203c^{+}$; D — способ гейтирования $CD3-CD193^{+}$;
 E — способ гейтирования $CD3-CD294^{+}$; F — Выделение региона $IgE^{+}CD203c^{+}$.
 Стрелкой указана фракция $CD203c^{lo}$, не захватываемая при гейтировании по одному маркеру

Рисунок 1. — Способы гейтирования базофилов

В периферической крови $CD203c$ экспрессируется исключительно на базофилах, следовательно, эта молекула может быть использована в качестве альтернативного способа идентификации базофилов [7] (рисунок 1C). Однако довольно низкая интенсивность экспрессии $CD203c$ (несмотря на достаточно яркий флуорохром в данном примере — APC) на нативных базофилах приводит к смешиванию региона базофилов с другими клетками. Ввиду слабого разделения популяций не захватывается фракция базофилов $CD203c^{low}$, что приводит к выделению значительно меньшего количества базофилов в регионе. С другой стороны, построение региона $CD203c^{+}$ без дополнительных маркеров может приводить к захвату $CD203c^{lo}IgE^{-}$ клеток, судя по всему не являющихся базофилами (рисунок 1F).

Молекула $CCR3$ ($CD193$) не является специфическим маркером и экспрессируется на поверхности многих клеток, ассоциированных с воспалением, включая базофилы, тучные клетки, $Th2$ -лимфоциты. Использование $CD193$ для выделения базофилов оправдано только с использованием моноклонального антитела к $CD3$ для исключения из учета Т-клеток (рисунок 1D).

Способ гейтирования $CD3-CD294^{+}$ оправдан только в случае добавления антитела к $CD3$ для исключения Т-лимфоцитов из учета. Однако и в данном случае низкая интенсивность свечения $CD294$ не позволяет корректно выделить регион базофилов, что может сказываться на результатах при постановке ТАБ (рисунок 1E).

Несмотря на то, что $CD203c$ является линейным маркером для базофилов, он активно используется также и в качестве маркера активации при проведении ТАБ [8]. Экспрессия $CD203c$ на базофилах резко увеличивается в процессе каких-либо манипуляций с периферической кровью, а также под воздействием стимулирующих для базофилов веществ [9, 10]. При этом экспрессия $CD203c$ характеризуется значительными индивидуальными различиями, на интенсивность влияют как манипуляции с образцом крови до учета на проточном цитометре, так и аутокринная секреция ИЛ-3 [7].

С целью выявления маркеров, наиболее подходящих для идентификации базофилов, рассчитывали *индекс окрашивания*, который представляет собой соотношение между интенсивностью свечения позитивного (окрашенные клетки) и негативного (неокрашенные клетки) пиков. Расчет проводили по формуле, которая представляет соотношение между разницей средней интенсивности флуоресценции позитивного и негативного пиков и стандартного отклонения негативного пика, умноженного на 2 [11]:

$$\text{индекс окрашивания [1]} = \frac{MFI (pos.) - MFI (neg.)}{2 \times SD (neg.)},$$

где MFI — средняя интенсивность флуоресценции;
SD — стандартное отклонение.

Полученные значения индекса окрашивания для разных маркеров невозможно сравнивать между собой, поскольку интенсивность свечения различных флуорохромов сильно отличается [12]. Так, как правило, флуорохромы разделяют по яркости на 5 групп: наиболее яркие (PE, Brilliant Violet 421), яркие (APC, PE-Cy7), умеренной яркости (FITC, PerCP-Cy5.5), тусклые (APC-Cy7) и очень тусклые (Pacific Blue).

В связи с этим с учетом разной яркости флуорохромов, конъюгированных с моноклональными антителами, для каждого маркера был рассчитан т. н. *индекс разделения популяций*, который представлял собой индекс окрашивания, разделенный на относительные значения яркости флуорохромов.

Расчет индекса разделения популяций показал, что наиболее высокое значение наблюдается при использовании IgE^{hi} способа — 9,1 (4,6–14,9) усл. ед. (рисунок 2). Несколько меньшее значение наблюдается при гейтировании способом CD123⁺HLA-DR⁻ — 5,9 (5,1–13,0) усл. ед. При этом достоверные различия в значении индекса разделения популяций между этими двумя способами гейтирования отсутствуют ($p = 0,975$).

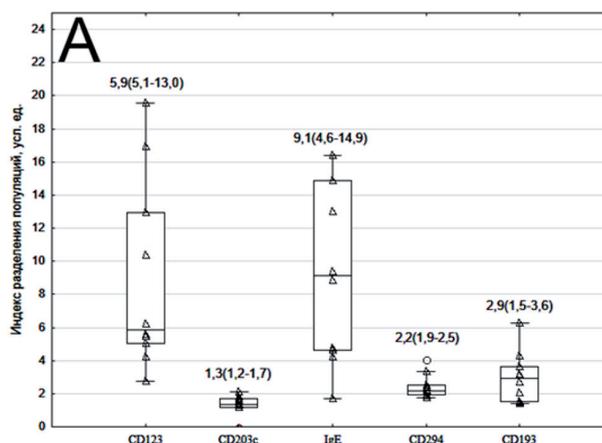


Рисунок 2. — Значения индекса разделения популяций базофилов при гейтировании разными способами

Остальные способы гейтирования обладают гораздо более низкими показателями индекса разделения популяций. Выявлены достоверные различия между значениями индекса при гейтировании CD123⁺HLA-DR⁻ и IgE^{hi} с другими способами ($p < 0,01$), что говорит о том, что идентификация базофилов по данным молекулам приемлема с целью последующего проведения ТАБ.

Заключение. Проведены эксперименты по гейтированию базофилов с использованием 7 различных способов. Установлено, что способы гейтирования базофилов IgE^{hi} и CD123^{hi}/HLA-DR^{neg} характеризуются наибольшим индексом разделения популяций. Идентификация базофилов по другим

способам гейтирования (CD3⁻CD193⁺/CD193⁺, CD3⁻CD294⁺, CD203c⁺) мало приемлема с целью последующего проведения теста активации базофилов ввиду невысокой интенсивности экспрессии маркеров.

Таким образом, нами показано, что наиболее эффективными способами гейтирования базофилов являются IgE^{hi} и CD123^{hi}/HLA-DR^{neg}. Результаты рекомендуются использовать при разработке лабораторных методов диагностики IgE-опосредованных аллергических реакций.

Литература

1. Basophils: historical reflections and perspectives / G. Marone [et al] // Chem. Immunol. Allergy. — 2014. — Vol. 100. — P. 172–192.
2. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease / H.J. Hoffmann [et al] // Allergy. — 2015. — Vol. 70, № 11. — P. 1393–1405.
3. WEASEL for flow cytometry [Electronic resource] / The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research. — Mode of access: <http://www.frankbattye.com.au/Weasel/index.html>. — Date of access: 19.06.2016.
4. BD FACSDiva™ Software [Electronic resource]. — Mode of access: <http://www.bdbiosciences.com/instruments/software/facsdiva/index.jsp>. — Date of access: 19.06.2016.
5. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. — М., 2008. — 312 с.
6. A guide to modern statistical analysis of immunological data [Electronic resource] / B. Genser [et al.] // BMC Immunol. — 2007. — Vol. 8, № 27. — Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/8/27>. — Date of access: 19.06.2016.
7. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: Characteristics and differences to CD63 upregulation / E.M. Sturm [et al.] // Cytometry Part B (Clinical Cytometry). — 2010. — Vol. 78B. — P. 308–318.
8. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals / A.W. Hauswirth [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. — 2002. — Vol. 110, № 1. — P. 102–109.
9. Macglashan D. Jr. Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes individuals / D. Jr. Macglashan // Clin. Exp. Allergy. — 2010. — Vol. 40, № 9. — P. 1365–1377.
10. Bühring H.J. The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis / H.J. Bühring, A. Streble, P. Valent // Int. Arch. Allergy Immunol. — 2004. — Vol. 133, № 4. — P. 317–329.
11. Selecting Reagents for Multicolor Flow Cytometry [Electronic resource] / H. Maecker, J. Trotter // BD Biosciences Application Note. — 2012. — Vol. 6. — Mode of access: http://web.mit.edu/flowcytometry/www/Becton%20Dickinson%20Multicolor_AppNote.pdf. — Date of access: 19.06.2016.
12. The evolution of guidelines for the validation of flow cytometric methods / L. Du [et al.] // Int. Jnl. Lab. Hem. — 2015. — Vol. 37, suppl. 1. — P. 3–10.

COMPARATIVE ANALYSIS OF BASOPHIL GATING STRATEGIES USING FLOW CYTOMETRY

Ramanava I.U., Hancharou A.Y.

*State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus*

A comparative analysis of basophil gating strategies using eight-color flow cytometry was performed. The index of cell separation was calculated depending on the fluorochrome for each molecule. It was shown that the IgE^{hi} and CD123⁺HLA-DR⁻ gating strategies were the most effective for basophil identification due to clear separation of basophil region and the highest index of cell separation.

Keywords: basophils, gating strategy, flow cytometry.

Поступила 23.08.2016

СТРОЕНИЕ ОЛИГОМЕРОВ ПЕПТИДА SF23

Хрусталева В.В.¹, Колодкина В.Л.², Кохановская Е.Ю.¹, Хрусталева Т.А.³

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

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

³*Государственное научное учреждение «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь*

Реферат. В статье приведены результаты компьютерного моделирования строения мономера пептида SF23 — кандидата на включение в состав синтетической вакцины против дифтерии — с помощью методов, не основанных на поиске структуры гомологичных полипептидных последовательностей. Методом нативного электрофореза установлен факт образования пептидом олигомеров, разрушающихся при добавлении денатурирующих агентов. Наиболее вероятная структура олигомера пептида получена с помощью молекулярного докинга. Образование пептидом SF23 олигомера должно положительно сказываться на его иммуногенных свойствах.

Ключевые слова: дифтерийный токсин; синтетическая вакцина; вторичная структура; олигомеризация; нативный электрофорез.

Введение. Синтетические вакцины основаны на использовании относительно коротких пептидов, соответствующих иммуногенным эпитопам полноразмерного белка возбудителя. Однако даже если пептид сохраняет строение сходное с фрагментом полноразмерного белка, синтетические вакцины не всегда в достаточной мере иммуногены по причине малых размеров и быстрого протеолиза антигенов. Для повышения иммуногенности и устойчивости синтетических пептидов их можно ковалентно связать с крупным белком-носителем. В таком случае иммунитет будет вырабатываться в основном к белку-носителю, в т. ч. к эпитопам синтетического пептида. К минусам такого способа иммунизации можно отнести факт несомненного влияния белка-носителя на структуру связанных с ним коротких пептидов. Достаточно эффективная иммунизация без использования белков-носителей возможна в том случае, если синтетический пептид образует крупные олигомеры.

Пептид SF23 представляет собой консенсусную последовательность фрагмента дифтерийного токсина, непосредственно связывающегося с рецептором на поверхности клеток [1]. Антитела к дифтерийному токсину специфически связываются с пептидом SF23, что говорит о сохранении в этом пептиде определенных эпитопов полноразмерного белка. По данным анализа спектра кругового дихроизма, 34,9% аминокислотных остатков в пептиде должны образовывать бета-структуру при температуре 24°C [1]. Термический анализ под контролем спектрофлуориметрии позволил определить, что при температуре от 39 до 42°C квантовый выход флуоресценции остатка тирозина в пептиде увеличивается [2]. Расчет теплового эффекта структурного перехода, приводящего к «возгоранию» флуоресценции остатка тирозина в пептиде, по уравнению Вант-Гоффа дает весьма высокое значение — 1071 кДж/моль [2]. Объяснить этот факт можно с помощью гипотезы о диссоциации олигомеров пептида при повышении температуры. Альтернативная причина поглощения большого количества тепла — значительное изменение третичной и вторичной структуры пептида при нагревании. Ответ на вопрос о существовании олигомеров пептида и об их строении может дать электрофорез без применения денатурирующих агентов (нативный электрофорез) [3]. Возможность структурного перехода целесообразно оценивать с помощью методов предсказания вторичной и третичной структуры белка, основанных исключительно на вероятностных шкалах, а не на поиске гомологичных фрагментов в базе данных белков с установленным трехмерным строением.

Цель работы — определение строения олигомеров пептида SF23.

Материалы и методы. Объект исследования — пептид SF23, полученный методом твердофазного химического синтеза (Peptide 2.0, США). Молекулярная масса мономера этого пептида равна 2,535 кДа. Теоретически рассчитанная молекулярная масса (полученная путем сложения молекулярных масс аминокислотных остатков, входящих в состав пептида) равна экспериментально установленной (с помощью масс-спектрометрии) [1]. Изоэлектрическая точка, рассчитанная сервером Isoelectric Point Calculator для пептидов, находится при pH = 10,05. Для электрофореза этого пептида не подходят буферы с pH в диапазоне от 9 до 11. По этой причине электрофорез проводился в системе с буфером, состоящим из бета-аланина и уксусной кислоты при pH = 4,4 [3]. При таком

значении pH пептид SF23 должен иметь положительный заряд. В качестве маркеров молекулярной массы (Serva Feinbiochemica Dalton Standards kit 39064) вместе с пептидом SF23 использовали миоглобин лошади (изоэлектрическая точка при pH = 7,1, молекулярная масса — 17,8 кДа), а также цитохром С (изоэлектрическая точка при pH = 10,2, молекулярная масса — 12,4 кДа). На лунку наносили 5–20 мкг белка. Как агарозный гель, так и красящий (amido black) и обесцвечивающий растворы взяты из набора Cormay gel protein 100 kit (cat. no. 6-048). Фиксацию, окраску и обесцвечивание белков в геле проводили согласно инструкции к набору. Электрофорез проводили при силе тока 11 мА (источник тока Sebia M500) в течение 15 мин. В дополнительном эксперименте денатурацию проводили обработкой 8 М мочевиной.

Для биоинформатических экспериментов использовали аминокислотную последовательность пептида — SIGVLGYQKTV DHTKVN SKLSLF. Для предсказания вторичной структуры использовали оригинальный алгоритм «PentaFOLD», который основан на вероятностных шкалах, полученных при анализе обширной выборки бактериальных белков, не являющихся гомологами друг другу. Этот алгоритм дает предсказания по двум паттернам: для преимущественно альфа-спиральных и преимущественно бета-структурных белков. В первом случае в качестве бета-структурных фрагментов предсказываются только те, вероятность образования бета-тяжей которыми наиболее высока.

Для создания трехмерной модели пептида SF23 применили два алгоритма: PepFOLD 2.0 [4] и QUARK [5]. Оба алгоритма генерируют более ста моделей трехмерной структуры пептида, а затем сортируют их по принципу минимума свободной энергии: наиболее вероятной является модель, отличающаяся наибольшим количеством контактов между аминокислотными остатками (в особенности водородных связей).

С целью получения модели олигомера пептида использовали программу Hex 8.0.0 [6] и модель строения пептида SF23, полученную с помощью алгоритма PepFOLD 2.0. Алгоритм Hex 8.0.0 предназначен для белок-белкового докинга. Так же, как и вышеописанные алгоритмы, он генерирует более сотни возможных ассоциатов между двумя белками и выбирает в качестве результата тот, который является наиболее энергетически выгодным.

Результаты и их обсуждение. Фрагмент дифтерийного токсина, соответствующий пептиду SF23, представляет собой бета-шпильку. В различных трехмерных структурах одного и того же белка эта шпилька может быть более или менее структурированной, на вершине ее петли может присутствовать или отсутствовать спираль 3/10 [1].

Алгоритм PentaFOLD предсказывает высокое содержание бета-структуры в пептиде SF23 как по бета-структурному (15 аминокислотных остатков), так и по альфа-спиральному паттерну (11 аминокислотных остатков). Это говорит о том, что вероятность перехода от бета-шпильки к альфа-спирали для данного пептида должна быть достаточно низкой.

Согласно алгоритму PepFOLD 2.0 наиболее вероятным структурным состоянием для пептида SF23 действительно является бета-шпилька. При этом бета-тяжи в ней расположены на N- и C-концах пептида, средняя часть представляет собой петлю (рисунок 1). Другие варианты третичной структуры пептида, сгенерированные этим алгоритмом, весьма разнообразны. Однако варианты, содержащие в себе альфа-спираль, не являются настолько же энергетически выгодными, как бета-шпилька, соответствующая строению этого фрагмента в полном размере белке.

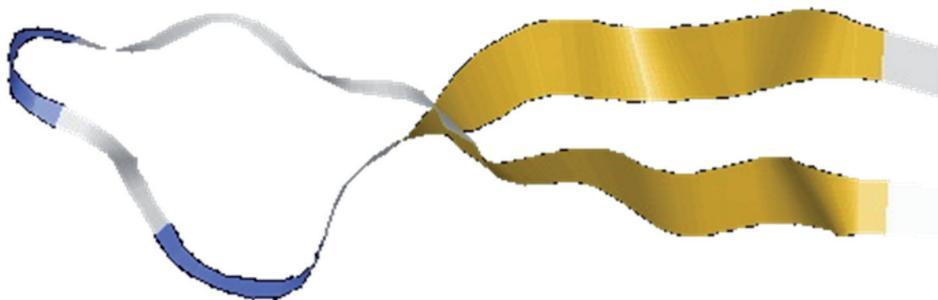


Рисунок 1. — Наиболее вероятная структура пептида SF23 согласно алгоритму PepFOLD 2.0. Бета-тяжи обозначены желтым цветом

Алгоритм QUARK предсказывает преимущественно бета-структурное строение пептида SF23 в десяти наиболее вероятных моделях. Однако, как свойственно этому алгоритму, в двух наиболее вероятных моделях количество бета-тяжей равно не двум, а четырем (цепь складывается в своеобразную «гармошку»). В таком случае пептид обретает более глобулярную форму. Формирование именно такой структуры противоречит результатам аффинной хроматографии: эпитоп пептида SF23, демонстрирующий перекрестную реакцию с ботулотоксином и столбнячным токсином, должен быть линейным — в составе одного, а не двух бета-тяжей [1]. Третий по вероятности вариант структуры пептида по алгоритму QUARK представляет собой бета-шпильку.

Согласно результатам нативного электрофореза пептид SF23 дает только одну полосу на электрофореграмме (рисунок 2), что говорит о существовании при комнатной температуре только одного типа ассоциатов, а не смеси олигомеров разного порядка. С уверенностью можно говорить о том, что молекулярная масса олигомера пептида SF23 превышает 17,8 кДа: миоглобин лошади, имеющий именно такую молекулярную массу, мигрировал в геле дальше, чем олигомер пептида SF23. Разница в дистанции между SF23 и миоглобином практически равна таковой между миоглобином и цитохромом С. Поскольку молекулярная масса цитохрома С равна 12,4 кДа, молекулярная масса олигомера пептида должна быть близка к 23,20 кДа.

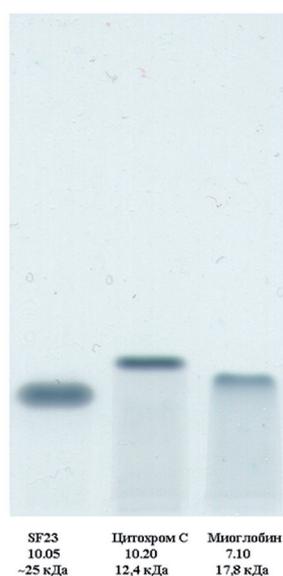


Рисунок 2. — Электрофореграмма для пептида SF23 совместно с цитохромом С и миоглобином лошади

Молекулярная масса мономера SF23 равна 2,535 кДа, масса его нонамера — 22,82 кДа, а декамера — 25,54 кДа. В нашем случае речь идет скорее о формировании декамера, чем нонамера. Дело в том, что дистанция между цитохромом С и миоглобином длиннее, чем она могла бы быть в том случае, если они оба имели бы одинаковое значение изоэлектрических точек. При рН = 4,4 цитохром С был более положительно заряжен, чем миоглобин, а следовательно, проделал более длинный путь в агарозном геле.

Повторение эксперимента с добавлением к исходному раствору 8М мочевины привело к исчезновению полосы, соответствующей олигомеру пептида SF23, на электрофореграмме. Это говорит о диссоциации олигомеров в присутствии денатурирующего агента.

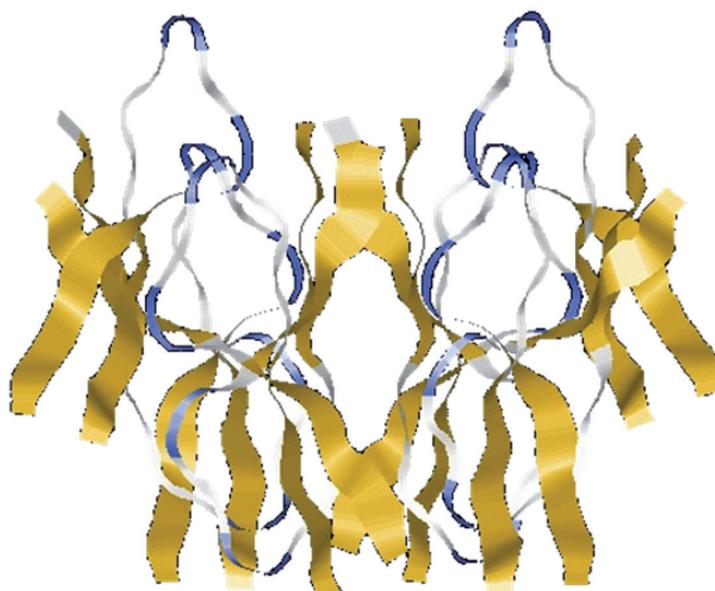


Рисунок 3. — Наиболее вероятное строение олигомера (декамера) пептида SF23

Алгоритм Hex 8.0.0 показал, что мономеры в димере пептида SF23 расположены в положении «голова к хвосту» [2]. Именно так должны располагаться мономеры и в более крупных ассоциатах, таких как декамер (рисунок 3). В таком положении флуоресценция остатка тирозина оттушивается расположенным в непосредственной близости остатком аспарагиновой кислоты из соседнего мономера. При диссоциации остатки тирозина становятся свободными от этого «тушителя» флуоресценции.

Факт образования олигомеров пептидом SF23 важен для дальнейших экспериментов по иммунизации этим антигеном лабораторных животных. Обычно короткие пептиды ковалентно «пришивают» к крупным белкам типа бычьего сывороточного альбумина для усиления эффекта от иммунизации. В случае с пептидом SF23 этот этап можно исключить, т. к. олигомеры должны обеспечивать относительную стабильность антигена и продолжительность времени его контакта с клетками иммунной системы.

Заключение:

1. Согласно методам предсказания вторичной и третичной структуры переход от преимущественно бета-структурного в преимущественно альфа-спиральное состояние крайне маловероятен для пептида SF23;
2. Согласно результатам нативного электрофореза пептид SF23 образует декамеры при комнатной температуре, что должно усиливать его иммуногенные свойства.

Литература

1. Structural and antigenic features of the synthetic SF23 peptide corresponding to the receptor binding fragment of diphtheria toxin / T.A. Khrustaleva [et al.] // *Molec. Immunol.* — 2015. — Vol. 63, № 2. — P. 235–244.
2. Хрусталева, В.В. Термический анализ пептида SF23 — потенциального компонента вакцины против дифтерии / В.В. Хрусталева, Т.А. Хрусталева, Ю.А. Рудниченко // *Инновации в медицине и фармации – 2015: материалы дистанц. науч.-практ. конф. молодых ученых.* — Минск: БГМУ, 2015. — С. 627–632.
3. Garfin, D.E. Gel electrophoresis of proteins / D.E. Garfin // *Essent. Cell Biol.* — 2003. — Vol. 1. — P. 197–268.
4. Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction / Y. Shen [et al.] // *J. Chem. Theor. Comput.* — 2014. — Vol. 10, № 10. — P. 4745–4758.
5. Xu, D. Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field / D. Xu, Y. Zhang // *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics.* — 2012. — Vol. 80, № 7. — P. 1715–1735.
6. Protein docking using case-based reasoning / A.W. Ghoorah [et al.] // *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics.* — 2013. — Vol. 81, № 12. — P. 2150–2158.

THE STRUCTURE OF SF23 PEPTIDE OLIGOMERS

Khrustalev V.V.¹, Kolodkina V.L.², Kahanouskaya E.Y.¹, Khrustaleva T.A.³

¹Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus;

*²State Institution “Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology”,
Minsk, Republic of Belarus;*

³Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

In this article we described the results of the computer modeling of the SF23 peptide monomer structure with the help of the methods which are not based on the search of homological polypeptide chains. The SF23 peptide is a candidate for the development of synthetic vaccine against diphtheria. With the help of native gel electrophoresis we approved the fact of oligomer formation by the SF23 peptide and their dissociation in the presence of denaturizing agents. The most probable structure of the oligomer of the SF23 peptide has been obtained with the help of molecular docking. Oligomer formation should increase immunogenic properties of the peptide.

Keywords: diphtheria toxin; synthetic vaccine; secondary structure; oligomerization; native gel electrophoresis.

Поступила 18.08.2016

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Аблова Т.А.30
 Акуленок О.М.69
 Амвросьева Т.В.3, 9, 21, 109, 140
 Анисько Л.А.59
 Антонец Н.Г.185
 Асташонок А.Н.55

Б

Бискина Н.М.9, 26
 Богуш З.Ф.9, 21
 Бореко Е.И.112
 Ботян А.А.84

В

Владыко А.С.3, 63, 159, 165, 174, 203
 Войтенко Н.Т.165

Г

Гасич Е.Л.118
 Гиндюк Н.Т.15
 Гойлова А.В.94
 Гончаров А.Е.3, 185, 190, 195, 198, 209
 Горбунов В.А.3, 30, 84, 180
 Грибкова Н.В.41, 99, 136
 Григорьева Е.Е.174
 Гудков В.Г.3, 79
 Гузов С.А.103

Д

Давидович Г.М.198
 Дегтерева О.Ф.190
 Дедюля К.Л.21
 Дорошко М.В.103
 Дракина С.А.59
 Дубков Н.А.203
 Дуж Е.В.190, 198

Е

Еремин В.Ф.3, 118
 Ермолович М.А.44

З

Земко В.Ю.73

И

Илькевич Н.Г.94

К

Казинец О.И.21, 109
 Карамышева Ю.С.79
 Каранкевич М.В.49
 Карпук Л.И.180
 Касницкая Т.Н.63
 Кицаева О.Ф.94
 Князева О.Р.59, 203
 Колодкина В.Л.214
 Коломиец Н.Д.49, 94
 Колтунова Ю.Б.153, 158, 180
 Корзан А.И.15
 Кохановская Е.Ю.214
 Красавцев Е.Л.132
 Красько А.Г.3, 30, 49, 59,
 63, 153, 158, 180
 Кубраков К.М.69

Л

Лапо Т.П.41, 136
 Левшина Н.Н.94
 Лозюк С.К.9, 21, 109, 140

М

Мамась А.Н.73
 Маханько О.В.203
 Мельникова Е.И.3
 Мицура В.М.169
 Мохаммади Т.55
 Мурзич А.Э.55

О

Окулич В.К.73
 Омелянович О.Г.165

П

Пашкевич Л.А.55
 Петкевич А.С.30
 Подушкина Е.А.15
 Поклонская Н.В.9, 21, 109, 140
 Полецук Н.Н.55, 90
 Полякова Н.В.26

Пронько Н.В.76
Прядко А.К.140
Пугач В.В.79, 84

Р

Рогачева Т.А.159
Романова О.Н.49
Романова И.В.190, 198, 209
Рубаник Л.В.3, 55, 90
Рудаков Н.В.146
Рудакова С.А.146
Рустамова Л.М.30, 153
Рыбак Т.Г.76

С

Садовникова Г.В.15
Самойлова Т.И.30, 59, 153, 158, 180
Самойлович Е.О.3, 26, 44
Свентицкая А.Л.132
Свирчевская Е.Ю.44
Сеньковец Т.А.158
Семейко Г.В.26
Семенов В.М.69
Семижон П.А.63, 159, 165, 203
Сивец Н.В.41, 99, 136
Соловьева Е.В.153, 158
Сосинович С.В.118
Счесленок Е.П.63, 159, 165, 203

Т

Терешков Д.В.169
Титов Л.П.3, 103
Тонко О.В.49, 94

У

Ухова И.Ф.44

Ф

Федорович Е.В.63
Фомина Е.Г.159, 174, 203

Х

Ханенко О.Н.49, 94
Хрусталева В.В.214
Хрусталева Т.А.214

Ц

Цвирко Л.С.153, 180

Ч

Чайка А.В.165
Чулков А.А.69

Ш

Шиманович В.П.3, 30
Шипоренок Ю.А.84
Школина Т.В.159, 203
Шмелева Н.П.3, 41, 99, 136

Щ

Щерба В.В.59

Э

Эйсмонт О.Л.55

Я

Якубович А.Е.79
Якшевич А.И.90
Янович О.О.103
Ярец Л.Н.15
Ясинская Л.А.44
Ястребов В.К.146
Яшкова С.Е.153, 158

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 выравниванием по центру без точек в конце и включает:

1) **НАЗВАНИЕ СТАТЬИ — ПЕЧАТАЕТСЯ ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ БЕЗ СОКРАЩЕНИЙ ЖИРНЫМ ШРИФТОМ;**

2) *фамилии и инициалы авторов* указываются ниже строчными буквами 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: введение, содержащее краткий обзор литературы по данной проблеме с указанием нерешенных ранее вопросов, сформулированную и обоснованную цель работы; основная часть: материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение или выводы; библиографический список (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 (подрисовочный 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: grsem@belriem.by или belriem@gmail.com
<http://www.belriem.by>

ОГЛАВЛЕНИЕ

ИТОГИ ВЫПОЛНЕНИЯ ПОДПРОГРАММЫ «ИНФЕКЦИИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ» ГОСУДАРСТВЕННОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ПРОГРАММЫ «НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ» ЗА 2011–2015 ГОДЫ <i>Горбунов В.А., Шиманович В.П., Мельникова Е.И., Амвросьева Т.В., Владыко А.С., Гончаров А.Е., Гудков В.Г., Еремин В.Ф., Красько А.Г., Титов Л.П., Рубаник Л.В., Самойлович Е.О., Шмелева Н.П.</i>	3
ЭПИДЕМИОЛОГИЯ	9
АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Амвросьева Т.В., Бозуш З.Ф., Бискина Н.М., Поклонская Н.В., Лозюк С.К.</i>	9
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО МАЛЯРИИ НА ТЕРРИТОРИИ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ВРЕМЕНИ, ФАКТОРЫ РИСКА ВОССТАНОВЛЕНИЯ МЕСТНОЙ ПЕРЕДАЧИ ТРЕХДНЕВНОЙ МАЛЯРИИ <i>Корзан А.И., Ярец Л.Н., Гиндюк Н.Т., Садовникова Г.В., Подушикина Е.А.</i>	15
ГЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ НОРОВИРУСОВ <i>Лозюк С.К., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В., Казинец О.Н., Дедюля К.Л., Бозуш З.Ф.</i>	21
РАЗЛИЧИЯ В ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В г. МИНСКЕ И ОБЛАСТЯХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ <i>Полякова Н.В., Семейко Г.В., Самойлович Е.О., Бискина Н.М.</i>	26
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ЛИХОРАДКЕ ЗИКА В МИРЕ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ <i>Самойлова Т.И., Горбунов В.А., Шиманович В.П., Красько А.Г., Рустамова Л.М., Петкевич А.С., Аблова Т.А.</i>	30
РОЛЬ БОКАВИРУСА ЧЕЛОВЕКА В РАЗВИТИИ ТЯЖЕЛЫХ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА <i>Сивец Н.В., Шмелева Н.П., Грибкова Н.В., Лапо Т.П.</i>	41
КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ДЕТЕЙ С СИНДРОМОМ ОСТРОГО ВЯЛОГО ПАРАЛИЧА В БЕЛАРУСИ В 2015 г. <i>Ухова И.Ф., Самойлович Е.О., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю., Ясинская Л.А.</i>	44
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ СЛЕЖЕНИЕ ЗА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ <i>Ханенко О.Н., Коломиец Н.Д., Тонко О.В., Романова О.Н., Каранкевич М.В., Красько А.Г.</i>	49
МИКРОБИОЛОГИЯ	55
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БИОПТАТОВ СИНОВИАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКИ И СУСТАВНОГО ХРЯЩА, СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АВАСКУЛЯРНЫМ НЕКРОЗОМ ГОЛОВКИ БЕДРА <i>Асташонок А.Н., Рубаник Л.В., Мурзич А.Э., Эйсмонт О.Л., Пашикевич Л.А., Мохаммади Т., Полецук Н.Н.</i>	55
ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С КЛЕЩЕВЫМ ЭНЦЕФАЛИТОМ, БОЛЕЗНЬЮ ЛАЙМА И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ДЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ <i>Дракина С.А., Князева О.Р., Щерба В.В., Анисько Л.А., Самойлова Т.И., Красько А.Г.</i>	59
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ <i>YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS</i> <i>Касницкая Т.Н., Счесленок Е.П., Семижон П.А., Федорович Е.В., Красько А.Г., Владыко А.С.</i>	63
ДИАГНОСТИКА ГНОЙНЫХ МЕНИНГОЭНЦЕФАЛИТОВ ТЕСТ-СИСТЕМОЙ «D-ЛАКТАМ» <i>Кубраков К.М., Семенов В.М., Чулков А.А., Акуленок О.М.</i>	69

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВЕНТИЛЯТОР-АССОЦИИРОВАННОЙ ПНЕВМОНИИ <i>Окулич В.К., Мамась А.Н., Земко В.Ю.</i>	73
КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ АСПЕКТЫ КЛЕБСИЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ <i>Пронько Н.В., Рыбак Т.Г.</i>	76
АНАЛИЗ ПОРАЖЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ КИШЕЧНЫХ ПРОТОЗОЙНЫХ ИНВАЗИЙ ПАЦИЕНТОВ, ОБСЛЕДОВАННЫХ В РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ <i>Пугач В.В., Карамышева Ю.С., Якубович А.Е., Гудков В.Г.</i>	79
ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗИСТЕНТНЫХ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Пугач В.В., Шишпоренок Ю.А., Ботян А.А., Горбунов В.А.</i>	84
ПРОФИЛЬ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У ШТАММОВ <i>UREAPLASMA UREALYTICUM/ PARVUM</i> И <i>Mycoplasma hominis</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА <i>Рубаник Л.В., Якшевич А.И., Полещук Н.Н.</i>	90
ХАРАКТЕРИСТИКА МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНОСТИ ИЗОЛЯТОВ <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ В ОРГАНИЗАЦИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ г. МИНСКА <i>Тонко О.В., Коломиец Н.Д., Ханенко О.Н., Кицаева О.Ф., Левшина Н.Н., Гойлова А.В., Илькевич Н.Г.</i>	94
ОСТРЫЕ РЕСПИРАТОРНЫЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ <i>MICOPLASMA PNEUMONIAE</i> И <i>CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE</i> : ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ <i>Шмелева Н.П., Грибкова Н.В., Сивец Н.В.</i>	99
АССОЦИАЦИЯ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ <i>HELICOBACTER PYLORI</i> С АКТИВНОСТЬЮ ВОСПАЛЕНИЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА <i>Янович О.О., Титов Л.П., Дорошко М.В., Гузов С.А.</i>	103
ВИРУСОЛОГИЯ	09
МЕТОДЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА РИСКА ИХ ВИРУСНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ <i>Амвросьева Т.В., Казинец О.Н., Поклонская Н.В., Лозюк С.К.</i>	109
ОТ РИБАВИРИНА К АЦИКЛИЧЕСКИМ НУКЛЕОЗИДАМ И ФАВИПИРАВИРУ ШИРОКОГО СПЕКТРА ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ <i>Бореко Е.И.</i>	112
ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА <i>Еремин В.Ф., Гасич Е.Л., Сосинович С.В.</i>	118
ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЖИЗНИ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С <i>Красавцев Е.Л., Свентицкая А.Л.</i>	132
АНАЛИЗ СЛУЧАЕВ ЗАБОЛЕВАНИЯ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ И МЕТАПНЕВМОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ СРЕДИ ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Лапо Т.П., Сивец Н.В., Шмелева Н.П., Грибкова Н.В.</i>	136
РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РЕГИОНА, КОДИРУЮЩЕГО РНК-ПОЛИМЕРАЗУ ВИРУСА КОКСАКИ В5 <i>Поклонская Н.В., Лозюк С.К., Прядко А.К., Амвросьева Т.В.</i>	140
АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ КЛЕЩЕВЫХ ТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РОССИИ <i>Рудаков Н.В., Ястребов В.К., Рудакова С.А.</i>	146

АНАЛИЗ ЗАРАЖЕННОСТИ КРОВСОСУЩИХ КОМАРОВ И МОШЕК ВИРУСОМ ЗАПАДНОГО НИЛА В БЕЛАРУСИ ЗА 2001–2015 гг. <i>Самойлова Т.И., Красько А.Г., Колтунова Ю.Б., Рустамова Л.М., Яшкова С.Е., Соловьева Е.В., Цвирко Л.С.</i>	153
ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Самойлова Т.И., Красько А.Г., Колтунова Ю.Б., Яшкова С.Е., Соловьева Е.В., Сеньковец Т.А.</i>	158
ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ NS5 ВИРУСА ГЕПАТИТА С <i>Семижон П.А., Счесленок Е.П., Фомина Е.Г., Школина Т.В., Розачева Т.А., Владыко А.С.</i>	159
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ НА ТЕРРИТОРИИ МОГИЛЕВСКОЙ ОБЛАСТИ <i>Счесленок Е.П., Семижон П.А., Омелянович О.Г., Войтенко Н.Т., Чайка А.В., Владыко А.С.</i>	165
ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ НЕПРЯМЫХ МАРКЕРОВ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ В <i>Терешков Д.В., Мицура В.М.</i>	169
ВИРУС ЛИМФОЦИТАРНОГО ХОРИОМЕНИНГИТА: СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА И АКТУАЛЬНОСТЬ ДЛЯ БЕЛАРУСИ <i>Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е., Владыко А.С.</i>	174
ВЫЯВЛЕНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ПОЛЕССКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ РАДИАЦИОННО-ЭКОЛОГИЧЕСКОМ ЗАПОВЕДНИКЕ <i>Цвирко Л.С., Самойлова Т.И., Красько А.Г., Колтунова Ю.Б., Карпук Л.И., Горбунов В.А.</i>	180
ИММУНОЛОГИЯ	185
ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МАКРОФАГОВ <i>EX VIVO</i> <i>Антоневич Н.Г., Гончаров А.Е.</i>	185
ИММУНОФЕНОТИП СИНОВИОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТЕОАРТРИТОМ КРУПНЫХ СУСТАВОВ <i>Гончаров А.Е., Дегтерева О.В., Романова И.В., Дуж Е.В.</i>	190
МОЛЕКУЛЫ CD35, CD88, CD282, CD284 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭТИОЛОГИИ ОСТРЫХ ИНФЕКЦИЙ <i>Гончаров А.Е.</i>	195
ПОКАЗАТЕЛИ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С ОПОЯСЫВАЮЩИМ ЛИШАЕМ И ВЕТРЯНОЙ ОСПОЙ <i>Гончаров А.Е., Давидович Г.М., Романова И.В., Дуж Е.В.</i>	198
ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИВИДОВЫХ АНТИТЕЛ К CN2 И CN3 ДОМЕНАМ IGG ЧЕЛОВЕКА У МЫШЕЙ <i>Маханько О.В., Фомина Е.Г., Счесленок Е.П., Семижон П.А., Школина Т.В., Дубков Н.А., Князева О.Р., Владыко А.С.</i>	203
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБОВ ГЕЙТИРОВАНИЯ БАЗОФИЛОВ НА ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРЕ <i>Романова И.В., Гончаров А.Е.</i>	209
СТРОЕНИЕ ОЛИГОМЕРОВ ПЕПТИДА SF23 <i>Хрусталева В.В., Колодкина В.Л., Кохановская Е.Ю., Хрусталева Т.А.</i>	214
ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ	219
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ	221

Подготовлено по заказу ГУ «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии»

Научное издание

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Сборник научных трудов

Выпуск 9

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. Капанова
Редакторы	О.С. Капанова
Корректор	О.С. Капанова
Компьютерная верстка	С.Л. Абрамович, Д.В. Сивуров
Обработка иллюстраций	С.Л. Абрамович, Д.В. Сивуров

Подписано в печать 18.10.2016.

Уч.-изд. л. 27,12.

Тираж 105 экз.

Государственное учреждение «Республиканская научная медицинская библиотека»

Зарегистрировано в Государственном реестре издателей, изготовителей

и распространителей печатных изданий Республики Беларусь

в качестве издателя печатных изданий 02.06.2014 за №1/340

ул. Фабрициуса, 28, 220007, г. Минск

Тел./факс +375 (17) 216-23-33

E-mail: med@med.by

<http://www.med.by>