МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

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

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Сборник научных трудов

Основан в 2008 году

Выпуск 13

Минск
2020

УДК 616.9-08(082) ISSN 2310-0982

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

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

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

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

С 56 **Современные проблемы инфекционной патологии человека:** сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В.А. Горбунова. — Минск: СтройМедиаПроект, 2020. — Вып. 13. – 246 с., 51 ил., 56 табл.

Редакционная коллегия:

В.А. Горбунов, канд. мед. наук, доц. (гл. ред.)
Т.В. Амвросьева, д-р мед. наук, проф. (зам. гл. ред.),
Е.И. Бореко, д-р мед. наук, доц. (зам. гл. ред.),
Л.П. Титов, чл.-кор. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф.
Н.Н. Полещук, д-р мед. наук, проф.,
Т.И. Самойлова, д-р биол. наук, проф.,
Е.О. Самойлович, д-р мед. наук, проф.,
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, акад. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. (Беларусь),
Д. Феби, проф. (Великобритания),
В.М. 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*

© Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», 2020

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ В ОБЛАСТИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ

[1]Горбунов В.А., [1]Дронина А.М., [1]Носова Е.С., [1]Петкевич А.С., [2]Карабан И.А., [2]Филонюк В.А., [2]Жукова Н.П., [2]Тарасенко А.А.

[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь
[2]Министерство здравоохранения Республики Беларусь

Научно-исследовательская деятельность государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (далее – Центр) включает в себя решение фундаментальных и прикладных задач в области эпидемиологии, вирусологии, микробиологии, иммунологии и паразитологии, направленных на сохранение и укрепление здоровья человека, развитие здравоохранения и медицинской науки. Центр обладает высоким научно-техническим потенциалом, имеет современную научно-исследовательскую и материально-техническую базу, соответствующую максимальному классу биологической безопасности (P3-P4) и международным стандартам GLP и GMP.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии является головной организацией-исполнителем подпрограммы «Инфекции и биологическая безопасность» государственной научно-технической программы «Новые методы оказания медицинской помощи», 2016-2020 гг.

В 2020 г. в рамках подпрограммы выполнялось 24 задания по следующим направлениям: нормативно-методическое и технологическое обеспечение эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями, устойчивостью к противомикробным лекарственным средствам и системы биологической безопасности; изделия медицинского назначения (ИМН) для диагностики инфекционных и иммунных заболеваний на основе использования геномных, протеомных и биоинформационных технологий; современные методы, средства и подходы к профилактике и этиопатогенетической (химио- и иммуно-) терапии инфекционных и иммунных заболеваний; научно-организационное сопровождение подпрограмм.

За период выполнения подпрограммы «Инфекции и биологическая безопасность» налажена система мониторинга наиболее значимых инфекций, разработаны и внедрены в практику новые технологии, обеспечивающие современный уровень комплекса мероприятий, проводимых в области контроля инфекционных заболеваний. Разработаны молекулярно-биологические методы детекции и средства диагностики вирусных и бактериальных инфекций на основе полимеразной цепной реакции.

В текущем году подготовлены проект паспортной части и технико-экономического обоснования новой подпрограммы на период 2021-2025 гг. «Геномные технологии и инфекционная безопасность» государственной научно-технической программы «Качество и доступность медицинских услуг». Цели новой подпрограммы соответствуют целям государственной политики социально-экономического развития, представленными в Концепции Национальной стратегии устойчивого развития Республики Беларусь на период до 2035 г. и включают: разработку и внедрение в здравоохранение новых технологий и средств геномной и иммунодиагностики, методов медицинской профилактики, подходов к персонифицированной терапии инфекционных заболеваний для снижения отрицательного воздействия патогенных биологических агентов на

молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях, совершенствования системы эпидемиологического слежения за актуальными инфекционными заболеваниями, предотвращения и эффективного реагирования на чрезвычайные ситуации в системе здравоохранении.

Научно-исследовательская работа в Центре в настоящее время проводится в рамках 24 заданий государственных научно-технических программ, государственных программ научных исследований, заданий Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, инициативных исследований, инновационных проектов, отраслевых научно-технических программ, утвержденных Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь, Министерством здравоохранения Республики Беларусь, Национальной Академией наук Беларуси, по договорам с органами государственного управления, учреждениями.

Основные темы научных исследований направлены на научно-техническое обеспечение эпидемиологического надзора, для предупреждения возникновения и распространения инфекционных заболеваний, борьбу с устойчивостью к противомикробным средствам, укрепление национальной биологической безопасности путем разработки и внедрения в практическое здравоохранение передовых технологий, методов и средств профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекционных заболеваний.

Специалисты Центра имеют существенные научные достижения в области эпидемиологического надзора за вакциноуправляемыми, кишечными, природно-очаговыми и вновь возникающими инфекциями, разработки нанотехнологических методов индикации и идентификации возбудителей, решения проблем устойчивости бактерии и вирусов к противомикробным средствам.

Острые кишечные инфекции (ОКИ). Осуществлен молекулярно-эпидемиологический анализ выявленных на территории республики вирусов гепатита Е, по результатам проведенного молекулярного типирования установлена принадлежность выделенных изолятов к генотипу GIII, нуклеотидные последовательности идентифицированных вирусов гепатита Е депонированы в международный банк данных [1-3].

Организовано поступление проб биологического материала пациентов с ОКИ и образцов сточных вод из областей республики, разработана схема динамического наблюдения за скрытой циркуляцией кишечных вирусов в популяции [3].

Разработаны наборы реагентов на основе ПЦР для выявления возбудителей кишечных инфекций, позволяющие улучшить этиологическую расшифровку ОКИ, повысить эффективность расследования групповых случаев заболевания, проводить мониторинг окружающей среды на наличие возбудителей ОКИ [4, 5].

Парентеральные гепатиты, ВИЧ. Выявлены генотипы/субтипы вируса гепатита С (ВГС), циркулирующие в Республике Беларусь. Определены доминирующие генетические варианты вируса гепатита В у пациентов с ВГВ-инфекцией, установлена частота встречаемости «вакциноускользающих» мутаций вируса гепатита В Определены мутации лекарственной устойчивости и выявлена частота их встречаемости среди ВГВ-инфицированных пациентов [6-8].

Методом секвенирования и филогенетического анализа определен субтип и мутации лекарственной устойчивости к ингибиторам протеазы и обратной транскриптазы ВИЧ-1. Получены приоритетные данные о высоком уровне клинически значимых мутаций ВИЧ, превышающий 10%, что требует рассмотрения вопроса об изменении схем лечения и необходимости тестирования всех ВИЧ-инфицированных пациентов до начала терапии. Методом секвенирования и филогенетического анализа определены субтипы ВИЧ и мутации лекарственной устойчивости к ингибиторам протеазы и обратной транскриптазы ВИЧ-1.

Вакциноуправляемые инфекции. Сероэпидемиологическое исследование по распространенности IgG антител к вирусу краснухи при обследовании жителей республики показало, что антитела в защитной концентрации имели 95,44%. Доля иммунных лиц во всех областях страны составила более 90%. Возрастных групп с уровнем серопозитивных менее 90% выявлено не было. С учетом результатов молекулярного изучения вирусов кори и краснухи и эпидемиологических данных доказано отсутствие эндемичной циркуляции обоих вирусов [9-11].

Доказано наличие эндемичной циркуляции парвовируса В19 на территории республики. Нуклеотидные последовательности фрагмента генома вируса краснухи и парвовирусов В19 депонированы в Международную базу данных GenBank [12].

Разработана моноплексная TaqMan ПЦР для выявления наличия ДНК видов *Bordetella holmesii* и *B. bronchiseptica.* для исследования этиологической структуры коклюшеподобных инфекций. При обследовании пациентов с подозрением на коклюш/паракоклюш выявлена высокая частота выделения видов *B. holmesii*, которые могут играть роль этиологического фактора коклюшной инфекции. Сиквенс-анализ подтвердил принадлежность фрагментов ДНК, выявленных в ПЦР, к геному B. holmesii. Получены семь нуклеотидных последовательностей фрагмента гена hIS1001, специфичных для *B. holmesii* [13].

Установлены качественные и количественные характеристики годовой динамики заболеваемости ветряной оспой. Определены генотипы вируса *Varicella zoster* от пациентов с различными клиническими формами инфекции [14].

Грипп и гриппоподобные инфекции. Определена этиологическая структура выявляемых возбудителей в зависимости от категории респираторной инфекции. Показан смешанный характер эпидемии гриппа в сезон 2019-2020 гг.: развитие эпидемического процесса было связано с циркуляцией вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, A(H3N2) и B.

Этиологическая структура выявляемых возбудителей отличалась в зависимости от категории ОРВИ. Вирусы гриппа вносили наибольший вклад в этиологическую структуру возбудителей ОРИ (суммарно 41,3%), наименьший удельный вес гриппа выявлен среди возбудителей ТОРИ (23,4%). Полученные результаты могут косвенно свидетельствовать об эффективности проведенной кампании вакцинопрофилактики гриппа в 2019 г. [15-18].

Природноочаговые инфекции. Выявлены этиологические агенты клещевого риккетсиоза. Сравнение последовательностей позволило отнести эти пробы к видам *Rickettsia raoultii* и *R. helvetica*. Методом филогенетического анализа показано, что изоляты *R. raoultii* и *R.helvetica*, имеют раннее происхождение по сравнению с последовательностями штаммов, опубликованных в GeneBank. Метод выявления ДНК риккетсий и типирования патогенных штаммов изложен в инструкции по применению, разработана тест-система для выявления ДНК риккетсий, переносимых клещами, в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Белар-Рик–ПЦР/РВ» (ТУ BY 100558032.418-2019). Разработан алгоритм выявления вируса бешенства в биологическом материале на основе реакции обратной транскрипции с последующей амплификацией диагностических участков гена нуклеопротеина (N) с двумя вариантами детекции – в режиме реального времени и электрофоретическая детекция продуктов амплификации с последующим секвенированием продуктов амплификации и биоинформационным анализом для типирования варианта вируса бешенства.

Получены высокоочищенные препараты полипептидов возбудителей ГЛПС – родоспецифические «DOB_136» и «PUU_120», и возбудителей лептоспироза – группоспецифические «L.can/Lip32-2» и «L.hebd/Lip32-2». Показано, что родоспецифические рекомбинантные полипептиды, используемые в качестве антигена, позволяют специ-

фически выявлять антитела к возбудителям ГЛПС рода *Hantavirus*, и видоспецифические рекомбинантные полипептиды – избирательно выявлять специфичесие антитела к вирусам Пуумала и Добрава/Куркино, циркулирующими на территории республики [19-22].

Иммунология, трансплантология, морфология наноструктур. Изучена распространенность вирусных инфекций среди детей-реципиентов гемопоэтических стволовых клеток. Проведена оценка клинического состояния детей с активной вирусной инфекцией. Создан перечень клинико-лабораторных показателей активной вирусной инфекции [23].

Разработан метод выявления хромосомно-интегрированной формы ВГЧ-6 в биологическом материале. Установлено, что бета-герпесвирусная инфекция у пациентов неврологического профиля протекает преимущественно в активной форме, что свидетельствует о необходимости мониторинга инфицированности пациентов данной группы с определением формы инфекции (латентная, активная).

Проведен электронно-микроскопический анализ нефробиоптатов, дана характеристика основных морфологических типов поражения клубочкового аппарата. Определен перечень показаний для проведения электронной микроскопии нефробиоптатов.

С использованием атомно-силовой микроскопии изучен патоморфологические изменения эпителиоцитов носовой полости и трахеи. По результатам электронной микроскопии выявлены нарушения организации ресничек эпителиоцитов, что позволяет диагностировать наследственно-обусловленную патологию респираторного тракта.

Охарактеризованы основные морфологические типы поражения клубочкового аппарата почечной ткани, определен порядок оценки ультрамикроскопических изменений в образцах. Разработан алгоритм ультраструктурного исследования нефробиоптата и форма регистрации результатов электронно-микроскопического анализа нефробиоптатов [24-26].

Бактериальные инфекции, антибиотикорезистентность. Охарактеризована белорусская популяция клинических штаммов *Chlamydia trachomatis*. Установлена генотипическая гетерогенность с преимущественной экспансией генотипов E, F и G. Охарактеризован морфогенез изолятов *C. trachomatis*, выявлены ультрамалые формы, являющиеся патогенетически значимыми морфовариантами, обеспечивающими выживание возбудителя и поддержание инфекционного процесса в виде «латентной персистенции» [27, 28].

Разработан метод оценки дисфункции иммунной системы при сепсисе, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на прогнозирование септического состояния пациентов. Методом проточной цитометрии определены основные популяции моноцитов, дендритных, Т-регуляторных и миелоидных супрессорных клеток. Исследована экспрессия генов, ответственных за регуляцию иммунных процессов, генов - регуляторов индукции апоптоза, генов, участвующих в реализации про- и противовоспалительных эффектов (IL-6, IL-8), генов, характеризующих адгезию клеток и трансэндотелиальную миграцию [29].

Впервые в Республике Беларусь выявлена циркуляция изолятов *Y. enterocolitica*, относящихся к новому биотипу 1A и имеющих ген патогенности *ail*, что свидетельствует о наличии в популяции иерсиний новых серо-биотипов, ранее считавшихся непатогенными.

Проведена оценка фенотипической антибиотикочувствительности клинических штаммов *P. aeruginosa, K. pneumoniae, Acinetobacter spp*. к девяти классам антимикробных препаратов, выявлен высокий уровень резистентности к большинству тестируемых классов антибиотиков.

Определены основные фенотипы резистентности циркулирующих изолятов сальмонелл, выделенных от пациентов и продуктов питания. Сохраняется высокая чувствительность штаммов сальмонелл к цефалоспоринам III-IV поколения, что позволяет их применять в качестве препаратов первого уровня в лечении тяжелых и среднетяжелых форм сальмонеллезов.

Разработан алгоритм подготовки проб и лабораторной диагностики периодонтита, вызываемого *T. denticola, P. gingivalis, B. forsythus*, с использованием метода ПЦР и оценки трипсино-подобной активности биологических проб. Изучена трипсино-подобная активность биологических проб в реакциях с различными синтетическими субстратам [30].

На базе Центра функционируют следующие референс-центры и референс-лаборатории по мониторингу инфекционных заболеваний:

- Региональная референс-лаборатория по ротавирусной инфекции ЕРБ ВОЗ (для Армении, Азербайджана, Грузии, Республики Молдовы, Таджикистана, Украины);
- Национальный центр по гриппу и другим острым респираторным заболеваниям;
- Национальный референс-центр по полиомиелиту;
- Республиканская референс-лаборатория по диагностике кори и краснухи;
- Республиканский референс-центр мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов;
- Республиканская референс-лаборатория по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний;
- Республиканская референц-лаборатория генодиагностики ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов В и С по определению генотипов/субтипов и резистентности к противовирусным препаратам ВИЧ, гепатитов В и С;
- Республиканская референс-лаборатория по диагностике вирусных кишечных инфекций и санитарной вирусологии;
- Республиканский референс-центр по диагностике особо опасных, природно-очаговых и вновь возникающих инфекций.

Референс-лаборатории координируют деятельность организаций здравоохранения по реализации взятых на себя Республикой Беларусь международных обязательств в рамках межгосударственных и межрегиональных программ.

Международная деятельность. Расширяются научные связи и повышается эффективность международного взаимодействия в области новых прикладных технологий и фундаментальных исследований. Центр поддерживает международные контакты по вопросам молекулярной диагностики инфекционных заболеваний, подготовки кадров по данной проблеме, а также совместном производстве иммунобиологических препаратов с 19 учреждениями здравоохранения и науки Российской Федерации, Республики Казахстан, Республики Узбекистан, Латвийской Республики, Украины. Заключены и реализуются Соглашения о сотрудничестве с 11 научными организациями Российской Федерации.

В рамках деятельности региональной лаборатории по ротавирусной инфекции в 2020 г. осуществлялась координация национальных ротавирусных лабораторий семи стран СНГ, входящих в состав лабораторной сети ВОЗ по ротавирусам.

В текущем году сотрудники Центра принимали участие в крупных международных сравнительных исследовательских проектах с Европейским региональным бюро ВОЗ и выступали в качестве головной организации при реализации международных научных проектов по обеспечению надзора за ротавирусной инфекцией в странах СНГ. Реализованы два совместных проекта в рамках Союзного государства по научно-методическому обеспечению совершенствования системы оперативного реагирования

на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения в рамках реализации ММСП (2005 г.) на пространстве ВЕЦА на примере Российской Федерации, Республики Беларусь, Кыргызской Республики и Республики Казахстан. В рамках данного международного проекта подготовлена и издана монография о реализации Международных медико-санитарных правил на пространстве Восточной Европы и Центральной Азии.

Большое внимание уделяется сотрудничеству в области санитарно-эпидемиологического благополучия и совместного преодоления возникающих рисков и угроз на территории Союзного государства. РНПЦ эпидемиологии микробиологии является членом Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников Содружества Независимых Государств от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней. Сотрудники центра приняли участие в заседаниях Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств – участников Содружества Независимых Государств; доработке и согласовании проектов новой редакции методических рекомендаций «Совершенствование санитарной охраны территорий государств-участников Содружества Независимых Государств от завоза и распространения карантинных и других опасных инфекционных болезней, санитарно-опасных товаров и грузов на основе паспортизации их субъектов и эпидемиологического районирования», Положения о порядке осуществления информационного обмена о чрезвычайных ситуациях в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера, Соглашения о сотрудничестве органов, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор. Принято участие в Консультациях глав и экспертов служб государств-членов Шанхайской организации сотрудничества (ШОС), отвечающих за обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия.

В сфере сотрудничества в рамках Союзного государства в области медицинской науки, профилактики, диагностики, лечения заболеваний и медицинской реабилитации РНПЦ эпидемиологии и микробиологии принято участие в доработке проекта концепции научно-технической программы Союзного государства «Разработка технологий обнаружения и преодоления устойчивости микроорганизмов к лекарственным препаратам для повышения эффективности оказания персонализированной медицинской помощи (Преодоление)». Целью программы является разработка инновационных технологий обнаружения и преодоления устойчивости микроорганизмов к антимикробным лекарственным средствам, пригодных к использованию на территории Российской Федерации и Республики Беларусь для повышения эффективности оказания персонализированной медицинской помощи и снижения заболеваемости и смертности населения от инфекционно-воспалительных заболеваний. Целесообразность объединения усилий научных коллективов Республики Беларусь и Российской Федерации в данном направлении обусловлена схожестью эпидемиологических процессов, наблюдаемых в обеих странах.

При формировании правоприменительной практики внедрения норм, гармонизированных в государствах ЕАЭС документов по обращению лекарственных средств и медицинских изделий, сотрудники РНПЦ эпидемиологии и микробиологии осуществляют экспертную деятельность в рамках Фармакопейного комитета Евразийского Экономического союза; в также Республиканской формулярной комиссии Министерства здравоохранения республики Беларусь.

Производственная и экспертная деятельность. В процессе производственной деятельности Центра постоянно расширяется номенклатура выпускаемой продукции. Так, в 2019 г. разработаны и получены разрешения на серийный выпуск тринадцати медицинских изделий: тест-систем для диагностики для качественного и количествен-

ного определения вирусов, бактерий, грибов и простейших, выявления мутаций лекарственной устойчивости, биомедицинского клеточного продукта. Разработанные диагностические тест-системы разрешены к применению в практике здравоохранения республики. В условиях пандемии COVID-19 сотрудниками Центра инициативно разработаны 4 диагностические тест-системы: для выявления короновируса SARS-CoV-2 и выявления антител к нему; получены разрешения Министерства здравоохранения Республики Беларусь на их реализацию и (или) медицинское применение для госучреждений.

Важнейшие научные достижения, полученные в рамках выполненных заданий, внедрены в практику работы лабораторий всех уровней (республиканского, областных, зональных, городских центров гигиены и эпидемиологии).

В 2020 г. получено 58 актов о внедрении результатов НИОК(Т)Р в практику здравоохранения, от учреждений государственного санитарного надзора и лечебно-профилактических учреждений, подготовлено шесть новых методов диагностики, лечения, профилактики (инструкции по применению). Регулярно проводятся научно-практические конференции и семинары, где ученые Центра активно делятся результатами научных исследований с врачами и специалистами.

Новые научные знания, полученные в Центре с помощью молекулярно-генетических методов, предоставляют непосредственную информацию для оценки и прогнозирования эпидемиологической ситуации, и входят в действующую в Республике Беларусь организационную систему мониторинга эпидемиологической обстановки, в которой задействованы эпидемиологи Центров гигиены и эпидемиологии, организаций здравоохранения всех уровней.

Литература

1. Частота выявления маркеров вируса гепатита Е у пациентов повышенного риска, в продуктах питания и внешней среде / Т.В. Амвросьева [и др.] // Здравоохранение. – 2019. – № 12. – С. 10-13.

2. Современные подходы и методы решения проблемы изучения вирусной контаминации пищевой продукции и оценки её безопасности для здоровья / Т.В. Амвросьева [и др.] // Наука, питание и здоровье: материалы II междунар. конгресса, Минск, 3-4 окт. 2019 г. [Опубл. в журн.] Пищевая промышленность: наука и технологии. – 2019. – Т. 12, № 3, спецвыпуск. – С. 68-73.

3. Научно-экспериментальное обоснование возможности использования аденовирусов человека в качестве контролируемых агентов при анализе качества воды и оценке ее безопасности по вирусологическим показателям / Т.В. Амвросьева [и др.] // Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Республики Беларусь. Науч.-практ. центр гигиены. – 2019. – Вып. 29. – С. 3-7.

4. Опыт использования молекулярных методов лабораторной диагностики вирусных ОКИ и типирования их возбудителей на примере Минского региона / Т.В. Амвросьева [и др.] // Современные аспекты здоровьесбережения [Электронный ресурс]: сб. материалов юбил. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 55-летию мед.-проф. ф-та УО БГМУ, Минск, 23-24 мая 2019 г. / под ред. А.В. Сикорского, А.В. Гиндюка, Т.С. Борисовой. – Минск: БГМУ, 2019. – С. 313-320. – Режим доступа: http://rep.bsmu.by/handle/BSMU/26095. – Дата доступа: 09.12.2019.

5. Алгоритм индикации вирусной контаминации и оценки вирусологической безопасности пищевой продукции / Т.В. Амвросьева [и др.] // Достижения медицинской науки Беларуси: науч. полнотекст. база данных [Электронный ресурс]. – Минск: РНМБ, 2018-2019. – Вып. 23. – Режим доступа: http://med.by/dmn/book.php?book=19-7_3. – Дата доступа: 17.12.2019.

6. Еремин, В.Ф. Вирусный гепатит С – современные подходы к терапии / В.Ф. Еремин, Е.Л. Гасич // Техническая химия. От теории к практике: сб. тез. докл. VI Всерос. конф. с междунар. участием, Пермь, 20-24 мая 2019 г. – Пермь, 2019. – С. 81.

7. Клиническая характеристика хронической гепатит В вирусной инфекции и возможности противовирусной терапии / Д.В. Терешков, В.М. Мицура, Е.Л. Гасич, С.В. Жаворонок // Медицинский журнал. – 2020. – № 2. – С. 109-114.

8. Клиническое значение мутаций резистентности вируса гепатита с к препаратам прямого противовирусного действия / В.В. Давыдов, С.В. Жаворонок, В.Р. Гутмане, О.В. Солдатенко, Т.М. Барьяш, В.М. Мицура, Е.Л. Гасич, А.С. Бунас, В.С. Кичатова, М.И. Михайлов // Вирусные гепатиты – достижения и новые перспективы: материалы XII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Москва, 19-20 сент. 2019 г. – М., 2019. – С. 32-33.

9. Роль эпидемиологических и молекулярно-генетических исследований в доказательстве элиминации кори / Е.О. Самойлович [и др.] // Современные аспекты здоровьесбережения [Электронный ресурс]: сб. материалов юбил. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 55-летию мед.-проф. фак-та УО БГМУ, Минск, 23-24 мая 2019 г. / под ред. А.В. Сикорского, А.В. Гиндюка, Т.С. Борисовой. – Минск: БГМУ, 2019. – С. 396-404. – Режим доступа: http://rep.bsmu.by/handle/BSMU/26095. – Дата доступа: 09.12.2019.

10. Совершенствование молекулярно-эпидемиологического мониторинга кори и краснухи в Республике Беларусь / Е.О. Самойлович [и др.] // Достижения медицинской науки Беларуси: науч. полнотекст. база данных [Электронный ресурс]. – РНМБ, 2018-2019. – Вып. 23. – Режим доступа: http://med.by/dmn/book.php?book=19-7_5. – Дата доступа: 17.12.2019.

11. Корь в Республике Беларусь в 2018 г. / Е.О. Самойлович [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В.А. Горбунова. – Минск: СтройМедиаПроект, 2019. – Вып. 12. – С. 68-73.

12. Ермолович, М.А. Генетические варианты парвовируса В19, циркулирующие в Беларуси в течение эпидемического цикла инфекции (2005-2016) / М.А. Ермолович, Г.В. Семейко, Е.О. Самойлович // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – № 1. – С. 35-45.

13. Колодкина, В.Л. Коклюш: причины роста заболеваемости / В.Л. Колодкина, В.С. Мартынов // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В.А. Горбунова. — Минск: СтройМедиаПроект, 2019. – Вып. 12. – С. 99-102.

14. Дронина, А.М. Развитие эпидемического процесса ветряной оспы во времени в Республике Беларусь / А.М. Дронина, Т.С. Гузовская, Е.О. Самойлович // Микробиология в современной медицине: сб. тез. VII ежегод. Всерос. заоч. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Казань, 27 июня 2019 г. [Электронный ресурс] / ред. кол.: Г.Ш. Исаева [и др.]. – Казань: КГМУ-КНИИЭМ, 2019. – С. 37-39. – Режим доступа: https://kazangmu.ru/files/microbio298/ Конференция /2019/Conference_2019.pdf. – Дата доступа: 21.11.2019.

15. Шмелёва, Н.П. Бремя болезни, связанное с сезонным гриппом среди детского населения Республики Беларусь / Н.П. Шмелёва, Н.В. Сивец, Т.П. Лапо // Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика: материалы Всерос. ежегод. конгр., Санкт-Петербург, 14-15 окт. 2019 г. [Опубл. в журн.] Журн. инфектол. – 2019. – Т. 11, № 4, прилож. 1. – С. 144-145.

16. Эпидемиологические аспекты коронавирусной инфекции в Республике Беларусь / Н.В. Сивец [и др.] // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сб. тр. XI Ежегод. Всерос. Конгресса по инфекционным болезням с междунар. участием, Москва, 1-3 апр. 2019 г. / под ред. акад. РАН В.И. Покровского. – М.: «Медицинское Маркетинговое Агентство», 2019. – С. 185-186.

17. Сивец, Н.В. Новые возможности дифференциальной диагностики острых респираторных вирусных заболеваний на основе использования разработанных в Республике Беларусь технологий молекулярно-биологического исследования / Н.В. Сивец, Н.П. Шмелева, Т.П. Лапо // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2019. – Т. 8, № 4. – С. 535-552.

18. Сивец, Н.В. Бокапарвовирусная инфекция у детей в Республике Беларусь: молекулярно-эпидемиологические аспекты / Н.В. Сивец, Н.П. Шмелева, Т.П. Лапо // Журн. инфектологии. – 2019. – Т. 1, № 4. – С. 113-121.

19. Инфицированность иксодовых клещей боррелиями, флавивирусами и риккетсиями в природных очагах Республики Беларусь / О.Р. Князева [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В.А. Горбунова. – Минск: СтройМедиаПроект, 2019. – Вып. 12. – С. 166-170.

20. Изучение зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита в Беларуси / Т.И. Самойлова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В.А. Горбунова. – Минск: СтройМедиаПроект, 2019. – Вып. 12. – С. 171-173.

21. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения Республики Беларусь от заноса и распространения особо опасных инфекций / П.А. Семижон [и др.] // Опасные инфекции: новые вызовы – взгляд в будущее: материалы междунар. науч. конф., Алматы, 2-3 окт. 2019 г. – Алматы, 2019. – С. 178-182.

22. Технология получения высокоочищенного препарата иммуноглобулинов G и перспективы ее использования для создания отечественных иммуноферментных лабораторно-диагностических тест-систем / Е.П. Счесленок [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2019. – Т. 8, № 3. – С. 430-438.

23. Вирусные инфекции при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей / Т.В. Амвросьева [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В.А. Горбунова. – Минск: СтройМедиаПроект, 2019. – Вып. 12. – С. 136-140.

24. Получение высокодифференцированных астроцитов из гиппокампальной области мозга человека и их наноскопический анализ / А.Н. Асташонок [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В.А. Горбунова. – Минск: СтройМедиаПроект, 2019. – Вып. 12. – С. 191-196.

25. Использование электронно-микроскопического анализа в диагностике редких форм наследственных нефритов у детей / А.Н. Асташонок [и др.] // XIV Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых с междунар. участием по актуальным вопросам внутренней патологии «Завадские чтения», Ростов-на-Дону, 30 марта 2019 г.: сб. науч. тр. / Ростов. гос. мед. ун-т. – Ростов-на-Дону, 2019. – С. 21-23.

26. Асташонок, А.Н. Влияние β-амилоидов (Aβ40, Aβ42) на фенотип и параметры цитоплазматической мембраны перевиваемых клеток астроглии / А.Н. Асташонок, З.Б. Квачева, Н.Н. Полещук // Новости мед.-биол. наук. – 2019. – Т. 19, № 3. – С. 61-67.

27. Капустина, Ю.М. Современные подходы к генотипированию *Chlamydia trachomatis* / Ю.М. Капустина, Л.В. Рубаник // Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 1. – С. 112-124.

28. Дубровина, С.О. Актуальные вопросы хламидийной инфекции / С.О. Дубровина, Л.В. Рубаник, О.А. Ардинцева // Акушерство и гинекология. – 2019. – № 5. – С. 36-42.

29. Трусевич, М.О. Субпопуляции моноцитов и Т-регуляторные клетки периферической крови у пациентов с бактериальным сепсисом / М.О. Трусевич, Л.П. Титов, Ю.Л. Горбич // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В.А. Горбунова. – Минск: СтройМедиаПроект, 2019. – Вып. 12. – С. 247-248.

30. Разработка метода ПЦР для идентификации бактерий "красного комплекса" (*T. denticola, P. gingivalis, B. forsythus*), вызывающих периодонтит / Е.Ю. Бурдейко [и др.] // Научные стремления – 2019: сб. материалов междунар. науч.-практ. молодежной конф. в рамках междунар. науч.-практ. инновац. форума «INMAX'19», Минск, 11-12 дек. 2019 г.: в 3-х ч. / ОО «Центр молодежных инноваций», ООО «Минский городской технопарк». – Минск: Лаборатория интеллекта, 2019. – Ч. 2. – С. 17-18.

Поступила 18.11.2020

ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ ПО ДИАГНОСТИКЕ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (COVID-19) В РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ МИКРОБИОЛОГИИ

Горбунов В.А., Дронина А.М., Носова Е.С., Петкевич А.С., Шмелева Н.П., Амвросьева Т.В., Красько А.Г.

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

Эффективный контроль современных инфекционных заболеваний обеспечивается многими составляющими. Одна из них – информационная. «Информация – это товар 21 века» – так выразились японские коллеги, в конце прошлого века. То есть, сегодня в информационном пространстве можно найти массу самых разнообразных данных и главная задача – найти нужную информацию, отделить ее от различного информационного мусора с тем, чтобы превратить объективную информацию в реальные действия, создание необходимых продуктов и технологий.

В республике в течение нескольких лет было налажено регулярное (еженедельное) информирование руководства Министерства здравоохранения о состоянии эпидситуации по данным СМИ в мире в целом, у наших ближайших соседей и о мерах, которые необходимо или целесообразно принимать в Республике Беларусь для своевременного реагирования на те или иные изменения в эпидемиологической обстановке. Это в полной мере касается и новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

Хронология событий. Первого января 2020 г. поступило сообщение о выявленной в китайском городе Ухань (административный центр провинции Хубэй) вирусной пневмонии неустановленной этиологии (зарегистрировано 27 заболевших, у 7 состояние оценивалось как тяжелое). Этиология заболевания неизвестна, но, по мнению китайских специалистов, заболевание не являлось новым видом тяжелого острого респираторного синдрома (атипичная пневмония, SARS).

Третьего января 2020 г. в ВОЗ предоставлена информация о выявленном в Ухане кластере случаев заболевания «вирусной пневмонией неизвестной этиологии», руководство Министерства здравоохранения Республики Беларусь информировано о данной ситуации и начало оперативно ее отслеживать.

По данным информационного источника Wall Street Journal от 8 января 2020 г. китайскими исследователями было показано, что возбудителем этого заболевания является новый штамм коронавируса.

Семнадцатого января 2020 г. ВОЗ публикует комплекс документов с рекомендациями, связанных с противодействием вспышке нового заболевания для стран (протокол выявления вируса 2019-nCov методом ПЦР в режиме реального времени, временные рекомендации лабораториям и субъектам, занятым в работах по лабораторному тестированию пациентов в случаях, соответствующих определению подозрительных на пневмонию, ассоциированную с новым коронавирусом, опубликованы генетические последовательности вируса 2019-nCoV).

Благодаря оперативной работе китайских ученых и открытой информации о геноме нового коронавируса мировое сообщество имело возможность оперативной разработки диагностических препаратов и поиска возможных лекарственных средств.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (далее – РНПЦЭМ) – ведущий национальный научно-методический центр по диагностике инфекционных болезней человека. Одним из важных достижений РНПЦЭМ является разработка отечественной универсальной технологии для создания наборов для диагностики возбудителей новых, в том числе

экзотических, особо опасных вирусных инфекций, включая тех, которые на территории нашей страны ранее не встречались [1-3].

Суть технологии заключается в получении от ведущих международных центров информации о генетической структуре вновь выявленных возбудителей, химическом синтезе специальных реагентов, которые позволяют выявить диагностически значимые сайты новых возбудителей, и непосредственной разработке протокола полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Так были созданы диагностические наборы для диагностики ряда энтеровирусных инфекций, лихорадки Зика, особо опасной геморрагической лихорадки Эбола. Последние наборы для диагностики лихорадки Эбола были успешно использованы в 2014 г. при обследовании иностранных студентов, прибывших в Республику Беларусь из стран Западной Африки и госпитализированных в инфекционные больницы г. Минска и г. Витебска с подозрением, на заражение вирусом Эбола [2-4].

В РНПЦЭМ был разработан экспериментальный набор для выявления РНК нового вируса и с 23 января 2020 г. начаты диагностические скрининговые исследования (тестирование на 2019-nCoV). В кратчайшие сроки была обеспечена готовность к оперативному проведению лабораторных исследований биологического материала от лиц с симптомами, не исключающими инфекцию, вызванную коронавирусом 2019-nCoV. Тестирование образцов выполнялось в надлежащим образом оснащенных лабораториях персоналом, прошедшим обучение соответствующим техническим процедурам и правилам техники безопасности. С 30 января 2020 г. исследования организованы круглосуточно и без выходных.

В соответствии с установленным порядком для проведения внешней оценки качества диагностики 5 первых положительных и 10 отрицательных образцов были направлены по линии Глобальной сети наблюдения за гриппом в Сотрудничающий центр ВОЗ по возникающим инфекциям и биологическим угрозам (Институт им. Роберта Коха, Германия). Исследования образцов, проведенные в Институте им. Роберта Коха, показали 100% совпадение с результатами, полученными в РНПЦЭМ на наборе реагентов для ПЦР диагностики SARS-CoV-2 собственного производства.

Там же проведено полногеномное секвенирование SARS-CoV-2 из двух образцов, отобранных на территории Республики Беларусь, нуклеотидные последовательности которых представлены в международной базе данных GISAID [5]. Представление данных в международной базе данных делает их доступными для мирового сообщества ученых, позволяет отслеживать происходящие генетические изменения вируса, помогает установить происхождение и перемещения вирусов в глобальном масштабе, а также отражает готовность системы здравоохранения страны к открытому сотрудничеству

Одновременно в РНПЦЭМ было развернуто производство препаратов для обеспечения потребности в диагностике новой коронавирусной инфекции.

В настоящее время в РНПЦЭМ производятся 98 наименований изделий медицинского назначения (ИМН) для диагностики различных вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваний. Это иммуноферментные тест-системы, иммунофлюоресцентные наборы, наборы на основе ПЦР, компоненты для ПЦР-наборов, ИФА-тест-систем, культуры клеток, питательные среды, растворы, наборы для санитарной вирусологии, для обнаружения возбудителей кишечных паразитарных заболеваний, наборы и образцы для контрольных исследований и другая продукция. Вся выпускаемая продукция является импортзамещающей и валютосберегающей, и объем выпускаемых РНПЦЭМ ИМН на 70-100% покрывает потребности республики для диагностики тех, или иных инфекций. Разработанная продукция используется также для собственных нужд РНПЦЭМ при выполнении исследований для оказания помощи организациям здравоохранения, платных медицинских услуг, экспертизы, научных исследований.

Для оперативного выполнения поручения Министерства здравоохранения Республики Беларусь в соответствии с письмом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 27 января 2020 г. № 7-19/1486 «О предупреждении завоза и распространения инфекции, вызванной коронавирусом 2019-nCoV» научными сотрудниками в кратчайшие сроки на инициативной основе был разработан набор реагентов «COVID-19-скрин» для выявления генетического материала коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени (ТУ BY 100558032.421-2020). Это первый диагностический препарат, разработанный сотрудниками центра в Республике Беларусь в марте 2020 г., для обеспечения готовности страны к выполнению оперативных диагностических исследований по выявлению нового коронавируса. Набор реагентов «COVID-19-скрин» позволяет выявлять участок гена E SARS-CoV-2. Аналитическая чувствительность – не менее $1x10^3$ ГЭ/мл, аналитическая специфичность – не менее 98%, диагностическая чувствительность – не менее 98%, воспроизводимость – 100% (разрешение Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 27.10.2020 № 1-4-20/11878 о проведении регистрации).

Лаборатория гриппа и гриппоподобных заболеваний первой начала диагностику COVID-19, по мере увеличения объема к работе по диагностике COVID-19 последовательно подключались лаборатории биобезопасности с коллекцией патогенных микроорганизмов, диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций, биотехнологии и иммунодиагностики особо опасных инфекций и инновационная лаборатория.

Одновременно были усовершенствованы санитарно-противоэпидемические мероприятия по организации работы с SARS-CoV-2 в РНПЦЭМ. С января по октябрь издано 19 приказов и распоряжений в РНПЦЭМ, направленных на усиление мер по проведению лабораторных исследований биологического материала, о проведении лабораторных испытаний диагностических тест-систем для выявления вируса SARS-CoV-2, о производстве наборов по COVID-19, об исследовании секционного материала, об упорядочении работ по исследованию биологического материала на COVID-19, об оказании гражданам платных медицинских услуг, по лабораторному исследованию на наличие коронавируса SARS-CoV-2 и другие.

К 05.11.2020 в РНПЦЭМ всего выполнено 115 562 исследований образцов биоматериала на наличие коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени (рисунок 1). С января по март 2020 г. В республике исследования проводились только в РНПЦЭМ. В соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 31.03.2020 № 367 в график тестирования COVID-19 были дополнительно включены 11 лабораторий республики. Фактически в среднем в сутки было выполнено 999 исследований в марте, 959 – апреле, 682 – мае. Тем не менее к 15.05.2020 более 20% всех ПЦР исследований в республике были выполнены на базе РНПЦЭМ. В октябре в график запуска лабораторного тестирования на коронавирус COVID-19 включены 58 лабораторий республики.

В период март-май материал для молекулярно-генетического исследования доставлялся практически из всех организаций здравоохранения республики (рисунок 2). Далее в РНПЦЭМ проводились исследования для учреждений Минской области, республиканских научно-практических центров и Минского городского центра гигиены и эпидемиологии.

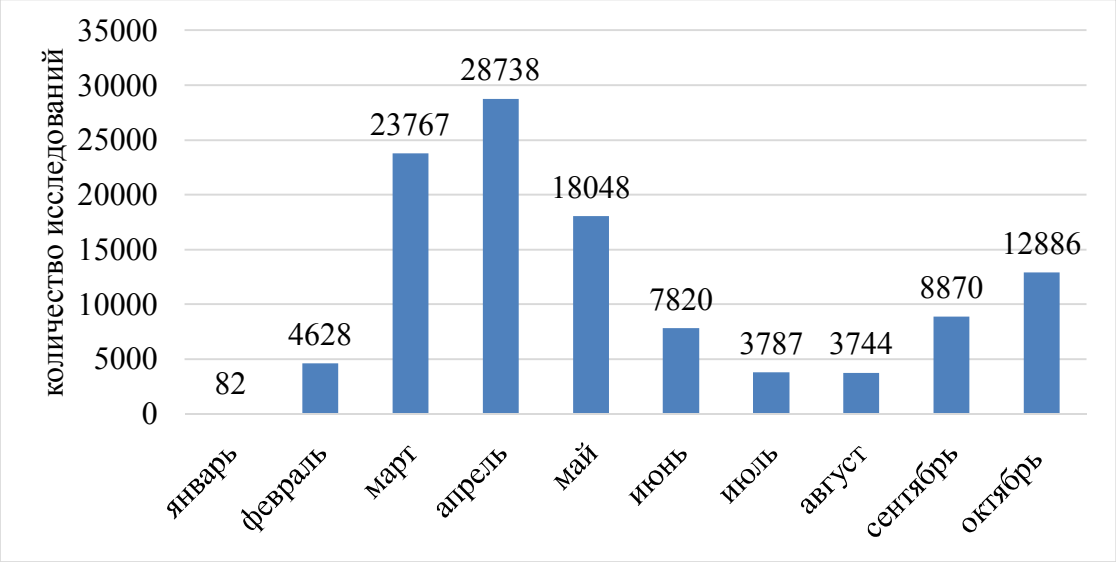


Рисунок 1. – Динамика выполнения ПЦР-исследований для выявления SARS-CoV-2

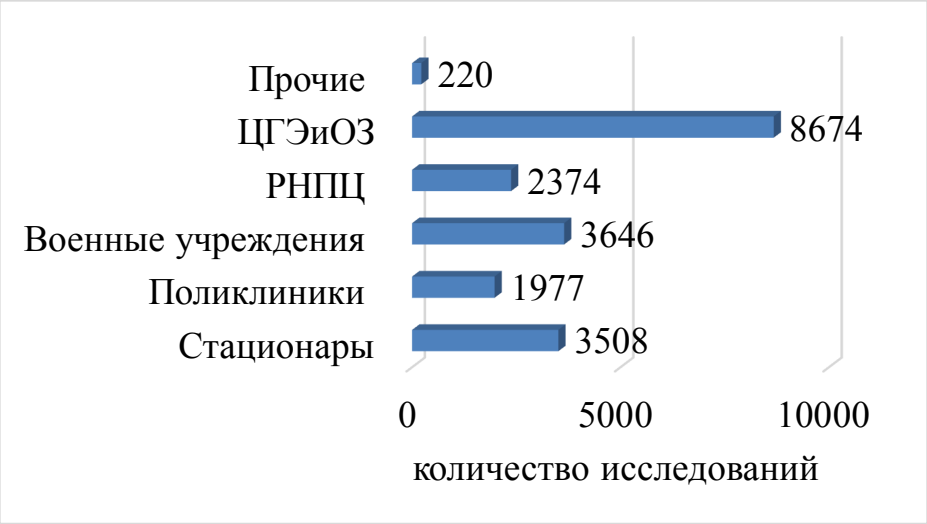
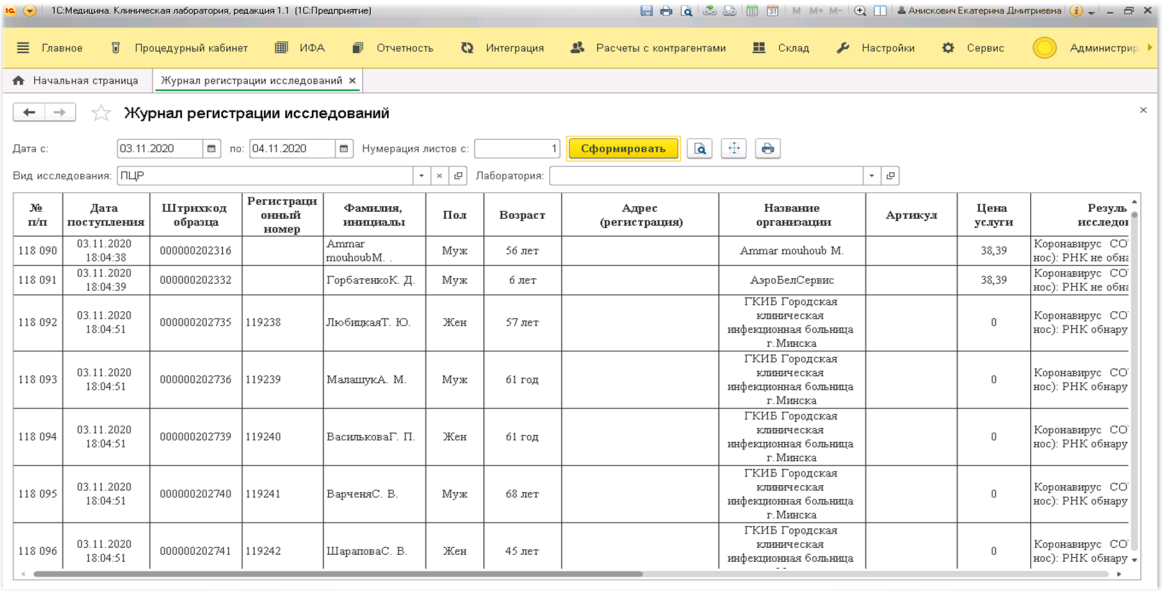


Рисунок 2. – Количество ПЦР-исследований для выявления SARS-CoV-2, выполненных в РНПЦЭМ для различных типов учреждений

В связи с большим количеством одновременного поступления биоматериала для учета и регистрации биопроб был создан Call-центр, в котором осуществлялась регистрация направлений на исследование, создана база данных обследованных пациентов, результатов исследования, формировались и передавались отчеты в организации здравоохранения. Для этого была использована и усовершенствована база лабораторной информационной системы (ЛИС), которая позволяет автоматизировать и перевести в электронный вид все ключевые рабочие процессы подразделений лабораторной диагностики медицинских учреждений. Все этапы лабораторных исследований автоматизированы, использовано штрихкодирование первичных проб пациентов (рисунок 3).



1С:Медицина. Клиническая лаборатория, редакция 1.1 (1С:Предприятие)

Главное | Процедурный кабинет | ИФА | Отчетность | Интеграция | Расчеты с контрагентами | Склад | Настройки | Сервис | Администрир

Начальная страница | Журнал регистрации исследований

Журнал регистрации исследований

Дата с: 03.11.2020 по: 04.11.2020 Нумерация листов с: 1 Сформировать

Вид исследования: ПЦР Лаборатория:

№ п/п	Дата поступления	Штрихкод образца	Регистрационный номер	Фамилия, инициалы	Пол	Возраст	Адрес (регистрация)	Название организации	Артикул	Цена услуги	Результ исследо
118 090	03.11.2020 18:04:38	000000202316		Ammar mouhoubM. .	Муж	56 лет		Ammar mouhoub M.		38,39	Коронавирус СО нос): РНК не обна
118 091	03.11.2020 18:04:39	000000202332		ГорбатенкоК. Д.	Муж	6 лет		АэроБелСервис		38,39	Коронавирус СО нос): РНК не обна
118 092	03.11.2020 18:04:51	000000202735	119238	ЛюбицкаяТ. Ю.	Жен	57 лет		ГКИБ Городская клиническая инфекционная больница г.Минска		0	Коронавирус СО нос): РНК обнару
118 093	03.11.2020 18:04:51	000000202736	119239	МалащукА. М.	Муж	61 год		ГКИБ Городская клиническая инфекционная больница г.Минска		0	Коронавирус СО нос): РНК обнару
118 094	03.11.2020 18:04:51	000000202739	119240	ВасильковаГ. П.	Жен	61 год		ГКИБ Городская клиническая инфекционная больница г.Минска		0	Коронавирус СО нос): РНК обнару
118 095	03.11.2020 18:04:51	000000202740	119241	ВарченяС. В.	Муж	68 лет		ГКИБ Городская клиническая инфекционная больница г.Минска		0	Коронавирус СО нос): РНК обнару
118 096	03.11.2020 18:04:51	000000202741	119242	ШараповаС. В.	Жен	45 лет		ГКИБ Городская клиническая инфекционная больница		0	Коронавирус СО нос): РНК обнару

Рисунок 3. – База лабораторной информационной системы (ЛИС) по учету и регистрации биопроб от пациентов и лиц с подозрением на COVID-19

Создана и включена в Государственный регистр информационных ресурсов «База данных пациентов, обследованных на содержание генетического материала коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени в Республике Беларусь» (регистрационное свидетельство № 1762023313 от 05.08.2020 (рисунок 4).

Министерство связи и информатизации Республики Беларусь
Научно-инженерное республиканское унитарное предприятие
"Институт прикладных программных систем"
(НИРУП "ИППС")

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕГИСТР ИНФОРМАЦИОННЫХ РЕСУРСОВ

РЕГИСТРАЦИОННОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 1762023313 от 05.08.2020 г.

о включении в Государственный регистр информационного ресурса

База данных пациентов, обследованных на содержание генетического материала коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени в Республике Беларусь

Владелец информационного ресурса

Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии"

Соавторы информационного ресурса

Шмелёва Наталья Петровна, Дронина Алина Михайловна, Сивец Наталья Валерьевна, Савинова Ольга Владимировна, Лапо Татьяна Петровна

Заместитель директора С.А. Шипов

М.П.

Рисунок 4. – Регистрационное свидетельство «База данных пациентов, обследованных на содержание генетического материала коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени в Республике Беларусь»

В качестве «золотого стандарта» лабораторной диагностики COVID-19 сегодня признан метод ОТ-ПЦР, направленный на выявление РНК ее возбудителя – коронавируса SARS-CoV-2. Однако данный метод имеет ряд ограничений, обусловленных объективными причинами (обследование пациента на поздних стадиях заболевания, качество взятия биологического материала у пациентов). Дополнительными методами диагностики являются серологические, направленные на выявление антител (IgM, IgG, IgA) к возбудителю в сыворотке крови, которые позволяют проводить лабораторную диагностику инфекции на более поздних сроках инфекции (спустя 10-14 дней от начала клинических проявлений), позволяют оценить динамику иммунного ответа человека в процессе заболевания, определить масштаб распространения COVID-19 среди населения, не обращавшегося за медицинской помощью, а также лиц, которые не были выявлены в связи с отсутствием или слабой выраженностью симптомов, установить факт контакта с возбудителем COVID-19, тестировать донорскую кровь и плазму переболевших, планируемых к использованию в лечебных целях. Также серологические исследования являются инструментом для установления индивидуального и популяционного (коллективного) иммунитета населения, в первую очередь для вакциноуправляемых инфекций. Доля людей, которым необходимо иметь антитела для обеспечения коллективного иммунитета, варьирует в зависимости от типа болезни. Концепция коллективного иммунитета активно обсуждается для COVID-19. В отношении формирования коллективного иммунитета при коронавирусной инфекции в доступной литературе имеются разные точки зрения. Популяционные сероэпидемиологические исследования активно проводятся в различных странах мира.

Очевидно, что разработка чувствительных, специфичных и технологичных в использовании тест-систем для серодиагностики COVID-19 сегодня имеет неоспоримую актуальность и востребованность.

В апреле 2020 г. в РНПЦЭМ с применением методов генной инженерии разработана современная технология, и получены рекомбинантные полипептиды коронавируса SARS-CoV-2. На их основе созданы ИФА наборы для детекции в сыворотке/плазме крови пациентов иммуноглобулинов M, G и суммарных антител: набор реагентов для выявления суммарных антител (IgA, IgM, IgG) к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа «SARS-CoV-2-РекИФА-АТ» (ТУ РБ 100558032.422-2020), набор реагентов для выявления иммуноглобулинов M к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа», «SARS-CoV-2-NP-ИФА-M», набор реагентов для выявления иммуноглобулинов G к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа», «SARS-CoV-2-NP-ИФА-G» (ТУ BY 100558032.423-2020) (рисунок 5). Наборы успешно прошли клинические испытания, получено разрешение Министерства здравоохранения Республики Беларусь на производство, применение и реализацию, завершается процедура государственной регистрации. Они доступны по цене для широкого применения в практическом здравоохранении.

В настоящее время диагностические наборы поставляются в учреждения здравоохранения республики, широко используются для проведения научно-исследовательских работ и оказания медицинских услуг населению.

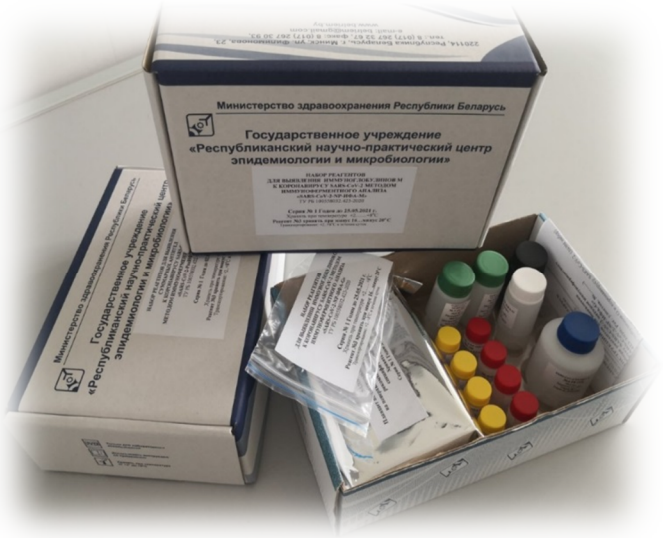


Рисунок 5. – ИФА наборы для детекции в сыворотке/плазме крови пациентов иммуноглобулинов M, G и суммарных антител, разработанные в РНПЦЭМ

В РНПЦЭМ разработаны и используются 8 наборов реагентов для диагностики новой коронавирусной инфекции (таблица).

Таблица. – Тест-системы для диагностики COVID-19 производства РНПЦЭМ

№ п/п	*Наименование*
1	Набор реагентов для выявления иммуноглобулинов G к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа «SARS-CoV-2-NP-ИФА-G»
2	Набор реагентов для выявления иммуноглобулинов M к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа «SARS-CoV-2-NP-ИФА-M»
3	Набор реагентов для выявления суммарных антител к коронавирусу SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа «SARS-Cov-2-РекИФА-АТ»
4	Набор реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТАЗА-M-MulV-50»
5	Набор реагентов «Covid-19-скрин» для выявления генетического материала коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени
6	Набор для выделения ДНК/РНК «НуклеСорб» с применением колонок с сорбирующей мембраной
7	Набор реагентов «КОРОНА-ген» для выявления генетического материала респираторных коронавирусов 229E, NL63, BetaCoV1, HKU1 методом ПЦР в режиме реального времени
8	Набор реагентов для одновременного выделения ДНК и РНК из биологического материала методом преципитации «НК экстра»

С 01.06.2020 в соответствии с письмом Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 6-1112/8387-1 в РНПЦЭМ выполняются лабораторные исследования по выявлению инфекции COVID-19 на платной основе для физических и юридических лиц. Заключено 162 договора с юридическими лицами различных форм собственности и 8009 договоров на обследование физических лиц.

РНПЦЭМ является одним из 6 аккредитованных учреждений в г. Минске для выполнения исследований по диагностике COVID-19 с выдачей сертификатов лицам, выезжающим за границу. Результат выдается не позже 36 часов с момента забора биологи-

ческого материала, что приводит к увеличению нагрузки не только в лабораторной части, но и в части оформления и выдачи сертификатов по форме, утвержденной Минздравом. С сентября наблюдается увеличение обращений юридических лиц для заключения договоров на оказание платных медицинских услуг по диагностике инфекции COVID-19 (рисунок 6).

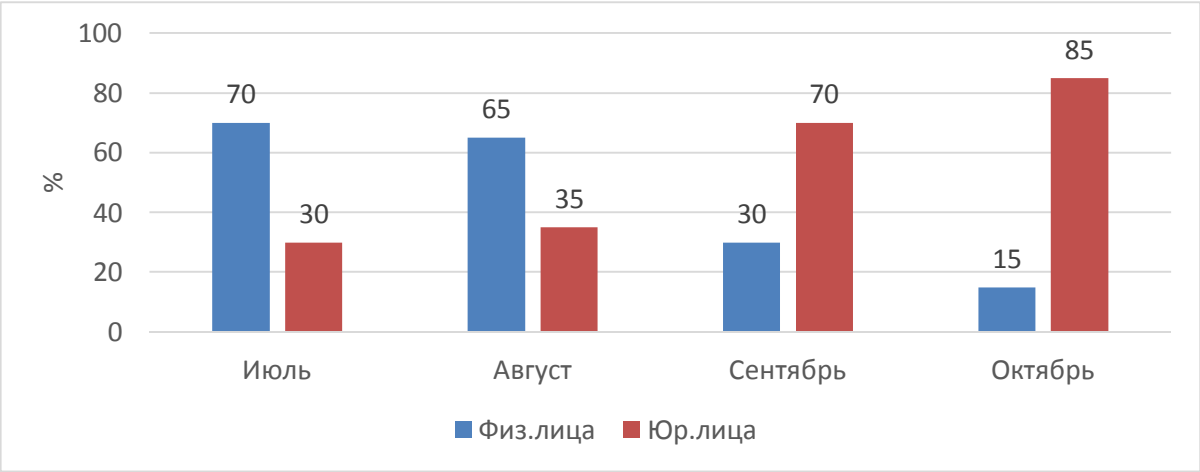


Рисунок 6. – Лабораторные исследования по выявлению инфекции COVID-19 для физических и юридических лиц в РНПЦЭМ (%)

В РНПЦЭМ выполняются рутинные исследования биоматериала на COVID-19 (ПЦР, ИФА): обследование лиц, выезжающих за пределы Республики Беларусь; обследование пациентов, имеющих направление на плановую госпитализацию; оказание платных медицинских услуг по желанию граждан. А также организованы работы по диагностике COVID-19, которые не выполняются в других учреждениях Республики Беларусь: срочные и внеплановые исследования, в том числе в выходные дни и в ночное время; круглогодичное дозорное эпидемиологическое слежение за ОРИ/ГПЗ/ТОРИ (грипп и 15 других возбудителей); дозорное эпидемиологическое слежение на COVID-19 (еженедельно по 210 образцов с мая 2020 г.); исследования аутопсийного материала.

Несмотря на сложные и напряженные условия труда, высокую загруженность имеющегося оборудования, приобретение, использование и утилизацию большого количества расходных материалов, что требует больших интеллектуальных, физических, эмоциональных и материальных затрат, диагностика COVID-2019 осуществляется без ущерба для научной деятельности Центра.

В 2020 г. в РНПЦЭМ выполняется 46 НИОК(Т)Р, из них выполнение в части НИОК(Т)Р 10 завершается в 2020 г., 34 задания выполняются на этапе освоения. Для успешного выполнения обязательств перед заказчиками, в первую очередь, перед государственным заказчиком – Минздравом, сотрудники центра выполняют закупки реагентов, необходимых в соответствии со сметами затрат, планирование, выполнение, анализ результатов научных исследований, оформление результатов научных исследований в виде научных публикаций, докладов на конференциях, семинарах, оформление ежеквартальных и годовых промежуточных и заключительных за весь период выполнения НИОК(Т)Р отчетов.

В январе-июне 2020 г. были разработаны, подготовлены, представлены на государственную научно-техническую экспертизу 8 принципиально новых проекта НИОК(Т)Р, которые успешно прошли все этапы экспертизы и включены в состав работ в подпрограмму «Инфекции и биологическая безопасность» государственной научно-технической программы «Новые методы оказания медицинской помощи».

Одновременно с рутинными исследованиями по диагностике COVID-19 начаты новые научно-прикладные исследования новой коронавирусной инфекции по трем направлениям: изучение вируса SARS-COV-2, изучение иммунного ответа человека на инфицирование вируса SARS-COV-2, разработка средств специфической терапии и профилактики.

В исследовательской группе Республиканской коллекции патогенных биологических агентов проведено выделение изолятов вируса SARS-CoV-2. Для этого были взяты назофарингеальные смывы от пациентов с COVID-19, проведены посевы на культуре перевиваемой клеточной линии Vero-E6 (клетки почек африканских зеленых мартышек), клетки экспрессируют рецептор ACE2. Проводится оценка вирусологических и молекулярно-генетических свойств полученных изолятов, их закрепление и стабилизация; проходит процедура проведения депонирования.

Наличие охарактеризованных штаммов позволит проводить фундаментальные исследования в области патогенеза нового заболевания; разрабатывать и испытывать препараты вакцин; исследовать противовирусную активность создаваемых лекарственных средств, антисептиков, дезинфектантов; проводить сравнительное изучение степени противовирусной активности сочетаний субстанций в отношении короновируса, оценивать диагностическую эффективность диагностикумов в отношении возбудителя COVID-19.

Начаты работы по изучению гуморального и клеточного иммунного ответа организма человека на проникновение вируса, а также популяционного иммунитета населения.

Лабораторная служба РНПЦЭМ аккредитована в Национальной системе аккредитации на соответствие требованиям СТБ ИСО/МЭК 17025 и единственная в Беларуси выполняет испытания вирулицидной активности дезинфицирующих средств. В 2020 г. существенно увеличилось количество испытаний: выполнено в 2,2 раза больше испытаний вирулицидной активности дезинфицирующих средств по сравнению с 2019 г. (100 и 45 соответственно) и в 9,4 раза больше – средств для обработки рук и кожных покровов (47 и 5 соответственно). Испытания проводятся на вирусах ЕСНО 6 (семейства *Picornaviridae),* аденовирусе 5 типа, парагриппа человека типа 3, простого герпеса первого типа (ВПГ-1), гриппа подтипа A(H1N1), коронавирусе (возбудитель вирусного гастроэнтерита свиней).

Несмотря на приостановку осуществления образовательного процесса по реализации программ дополнительного образования взрослых весной, связанную со сложной эпидемиологической ситуацией в стране, в 2020 г. на базе РНПЦЭМ прошли подготовку 22 специалиста по программам повышения квалификации руководящих работников и специалистов «Современные методы диагностики инвазивных бактериальных заболеваний. Мониторинг резистентности бактерий к антибиотикам», «Эпидемиология, диагностика, иммунопрофилактика и молекулярно-эпидемиологический мониторинг актуальных вирусных инфекционных заболеваний», программе обучающего семинара «Обращение с медицинскими отходами в организациях здравоохранения», программе стажировки руководящих работников и специалистов «Определение бактериальных эндотоксинов методом гель-тромб теста в лекарственных средствах».

Борьба с массовыми инфекционными заболеваниями невозможна без привлечения к ее решению медицинской общественности и населения в целом, поскольку только широкая поддержка различных слоев общества может обеспечить эффективную реализацию мероприятий, проводимых руководством страны, правительством и специалистами.

Всемирная организация здравоохранения формулирует свою позицию по этому вопросу как «необходимость формирования позитивного отношения населения к проблеме контроля инфекционных заболеваний».

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии всегда уделял этому вопросу большое внимание, постоянно затрагивая в своих выступлениях в средствах массовой информации такие темы, как грипп и острые респираторные инфекции, острые кишечные инфекции, иммунопрофилактика и борьба с вакциноуправляемыми инфекциями, природно-очаговые, особо опасные и другие вирусные, бактериальные и паразитарные заболевания.

Проблема борьбы с новой коронавирусной инфекцией также потребовала привлечения внимания общества к вопросам диагностики, профилактики, лечения и минимизации последствий этого заболевания в нашей стране.

Эта работа проводилась и продолжает проводиться сейчас по нескольким направлениям:

1. Выход на сайты и интернет-страницы основных информационных каналов (sb.by, belta.b, news.tut.by и др.). Первое сообщение «Остановим вирус на входе», которое было подготовлено заведующей лабораторией гриппа и гриппоподобных заболеваний, руководителем Национального центра по гриппу Натальей Шмелевой, уже 21 января 2020 г., а детальное описание нового вируса было сделано директором центра Владимиром Горбуновым на страницах belta.by («Коронавирус по полочкам» 04.03.2020). Таких оперативных сообщений в интернет ресурсах было сделано 11.

2. Эксперты центра принимали участие в 8 различных телевизионных программах («Панорама», Беларусь-1; «Главный эфир», Беларусь-1; «Клуб редакторов», Беларусь-1; «ОбъективНо», ОНТ; СТВ). Активное участие принимала Наталья Шмелева, заведующий организационно-методическим отделом Александр Петкевич, и заместитель директора по научной работе Алина Дронина.

3. Специалисты центра принимали участие в пресс-конференциях и давали интервью различным изданиям (Шмелева Н.П., Петкевич А.С., Гасич Е.Л., Красько А.Г., Семижон П.А. Владыко А.С. и др.)

4. Ряд сообщений и статей были опубликованы в периодической печати («Советская Беларусь. Сегодня», «Медицинский вестник», «Комсомольская правда», «Сельская Газета» и др.). Авторами являются профессор Николай Полещук, Наталья Шмелева, Тамара Амвросьева, Елена Фомина и другие специалисты.

5. Постоянно обновляется, актуализируется и наполняется раздел, касающийся коронавируса, на сайте центра по адресу: www.belrim.by. Здесь постоянными участниками и исполнителями являются Алина Дронина, Александр Петкевич, Тамара Амвросьева, Александр Владыко, Татьяна Аблова и Александр Ничипорук.

Выступления отличаются широким диапазоном тем, начиная с происхождения вируса и заканчивая масочным режимом и карантинными мероприятиями, т.е. все вопросы диагностики, профилактики, лечения и предупреждения новой коронавирусной инфекции доводятся до населения, повышая его общую грамотность и индивидуальную ответственность каждого гражданина.

В этом специалисты центра видят свой вклад в дело санитарной охраны территории, формирования у граждан биологического мышления, поддержания достигнутого в стране санитарно-эпидемиологического благополучия и повышения, в конечном итоге, необходимого уровня биологической безопасности нашего государства.

Пандемия коронавируса в 2020 г. поставила под угрозу множество человеческих жизней и парализовала экономическую и социальную активность всех стран мира. Поиск способов предотвращения или снижения негативных последствий от коронавирусной инфекции сегодня является приоритетным направлением научных исследований.

Приоритетным направлением научно-технической и инновационной деятельности РНПЦ эпидемиологии и микробиологии является разработка технологий и методик для

диагностики актуальных для страны инфекционных заболеваний. В 2020 г. в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии подготовлены 20 проектов заданий НИОК(Т)Р, в том числе по разработке высокотехнологичных медицинских изделий.

Продолжение исследований в области обеспечения биобезопасности и борьбы с эпидемиями – постоянный приоритет РНПЦЭМ.

Литература

1. Особенности разработки и использования иммунобиологических диагностических тестов, основанных на методе иммуноферментного анализа, на примере особо опасных вирусных геморрагических лихорадок Ласса, Марбург и Эбола / А.С. Владыко, Е.П. Счесленок, П.А. Семижон, Т.В. Школина, Е.Г. Фомина // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. – Минск: ГУ РНМБ, 2013. – Вып. 6. – С. 129-134.
2. Лихорадка Эбола: клинические проявления, особенности работы с пациентами / А.С. Владыко, П.А. Семижон, Е.П. Счесленок, Е.Г. Фомина, Т.В. Школина, А.С. Петкевич / Медицинские знания. – 2014. – № 6. – С. 3-5.
3. Разработка и использование иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусам Ласса, Марбург, Эбола / А.С. Владыко, Е.П. Счесленок, П.А. Семижон, Т.В. Школина, Е.Г. Фомина // Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: материалы междунар. конф. – М., 2015. – С. 79-81.
4. Рекомбинантный эктодомен белка GP вируса Эбола, экспрессированный в *E. coli* / М.В. Сергеева, А.А. Шалджян, А.Н. Горшков, А.Б. Комиссаров, В.Н. Сухоруков, П.А. Некрасов, А.Г. Красько, М.П. Грудинин, А.В. Васин, О.И. Киселев // Белки и пептиды: материалы VII Рос. симп., Новосибирск, 12-17 июля 2015 г. – Новосибирск, 2015. – С. 262.
5. Genomic epidemiology of hCoV-19 [Electronic resource] / GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data). – Mode of access: https://www.gisaid.org/epiflu-applications/phylodynamics. – Date of access: 09.11.2020.

Поступила 20.11.2020

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Оригинальные исследования

ОСОБЕННОСТИ ГОДОВОЙ ДИНАМИКИ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ВЕТРЯНОЙ ОСПОЙ НАСЕЛЕНИЯ БЕЛАРУСИ

[1]Дронина А.М., [1]Самойлович Е.О., [1]Семейко Г.В., [1]Ермолович М.А., [2]Гузовская Т.С.

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

[2]БУчреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Обсуждаются вопросы распространенности ветряной оспы в течение года среди населения Республики Беларусь. Сезонный подъем заболеваемости начинался 16 декабря и заканчивался 3 июля, его продолжительность составила 6,6 месяцев. Интенсивность эпидемического процесса формировалась под действием сезонных (496,3‰000 человеко-месяцев [95% ДИ: 491,9; 500,79], p<0,05) и круглогодичных (190,4‰000 человеко-месяцев [95% ДИ: 187,6; 193,1, p<0,05) факторов. Вероятность заболеть ветряной оспой (IRR) в 2,6 раза выше в период сезонного подъема в сравнении с межсезонным периодом. Продолжительность и интенсивность сезонного подъема отличалась в разных возрастных группах. Самый длительный и интенсивный сезонный подъем имел место среди детей 3-6 лет.

Ключевые слова: ветряная оспа, сезонность, заболеваемость, Беларусь.

Введение. Познание закономерностей развития эпидемического процесса позволяет научно обосновать стратегию и тактику проведения профилактических и санитарно-противоэпидемических мероприятий. Заболеваемость ветряной оспой в течение последнего десятилетия уступает только острым респираторным заболеваниям и гриппу [0, 2]. Ветряная оспа характеризуется рядом эпидемиологических параметров, которые, с одной стороны следует учитывать при изучении эпидемического процесса, с другой – именно эти параметры могут составить важнейшие материалы в познании фундаментальных основ эпидемиологии данной инфекции. Одним из основных является сезонность, позволяющая оценить значимость факторов, формирующих заболеваемость в течение года. Особый интерес для эпидемиологов представляет установление силы действия периодических причинных факторов, которые формируют сезонную заболеваемость.

Целью работы явилось изучение годовой динамики заболеваемости ветряной оспой населения Беларуси.

Материалы и методы исследования. Материалом явились данные официального учета случаев заболевания ветряной оспой за период 2008-2019 гг. Проведено сплошное, ретроспективное, продольное эпидемиологическое исследование. Для исключения влияния длительно действующих причин, обуславливающих многолетнюю тенденцию, использовали метод корригированных средних. Годовую динамику заболеваемости ветряной оспой совокупного населения анализировали по типовой кривой (по среднемноголетнему показателю). Кроме того, анализировали индивидуальные кривые заболеваемости в возрастных группах населения: дети 0-2 лет, 3-6 лет, 7-14 лет и взрослые (15 лет и старше) [3]. Максимальным показателем межсезонного уровня заболева-

емости считали среднемесячный показатель заболеваемости за 2008-2019 гг. По отношению к нему определяли сроки начала и окончания сезонного подъема, его продолжительность, оценивали интенсивность эпидемического процесса в месяцы максимальной и минимальной заболеваемости, интенсивность эпидемического процесса ветряной оспы под действием сезонных и круглогодичных факторов. Интенсивные показатели были представлены как ‰000 [ДИ 95%]. Интенсивность эпидемического процесса ветряной оспы оценивали на основе определения частоты случаев на 100 000 человеко-месяцев. Для количественной оценки влияния сезонных факторов в каждом месяце использовали метод сезонных индексов [0, 5]. Различия в рисках заболевания ветряной оспой в период сезонного подъема по сравнению с межсезонным периодом оценивали по показателю вероятности заболеть (incidence rate ratio – IRR) [3, 5]. Вероятность различий между показателями определяли по критерию t Стьюдента. Доверительные интервалы рассчитывали методом Уилсона без поправки на непрерывность. Обработка полученных данных проводилась с использованием компьютерных программ: Excel, Statistica 9.0.

Результаты и их обсуждение. Следует отметить различия в заболеваемости ветряной оспой населения Беларуси по месяцам за 2008-2019 гг. Во все годы, кроме 2016, 2017, 2018, минимальная заболеваемость регистрировалась в августе и колебалась от 9,4‰000 (2010 г.) до 17,7‰000 (2015 г.). Максимальные уровни заболеваемости (2008, 2009, 2011, 2012, 2013, 2016-2018 гг.) имели место в январе с колебаниями от 67,9‰000 (2009 г.) до 153,1‰000 (2012 г.). Исключение составили 2014 и 2015 гг., когда сезонный пик приходился на апрель (93,1‰000 и 91,8‰000) и 2019 г. – на май (105,1‰000) (рисунок 1).

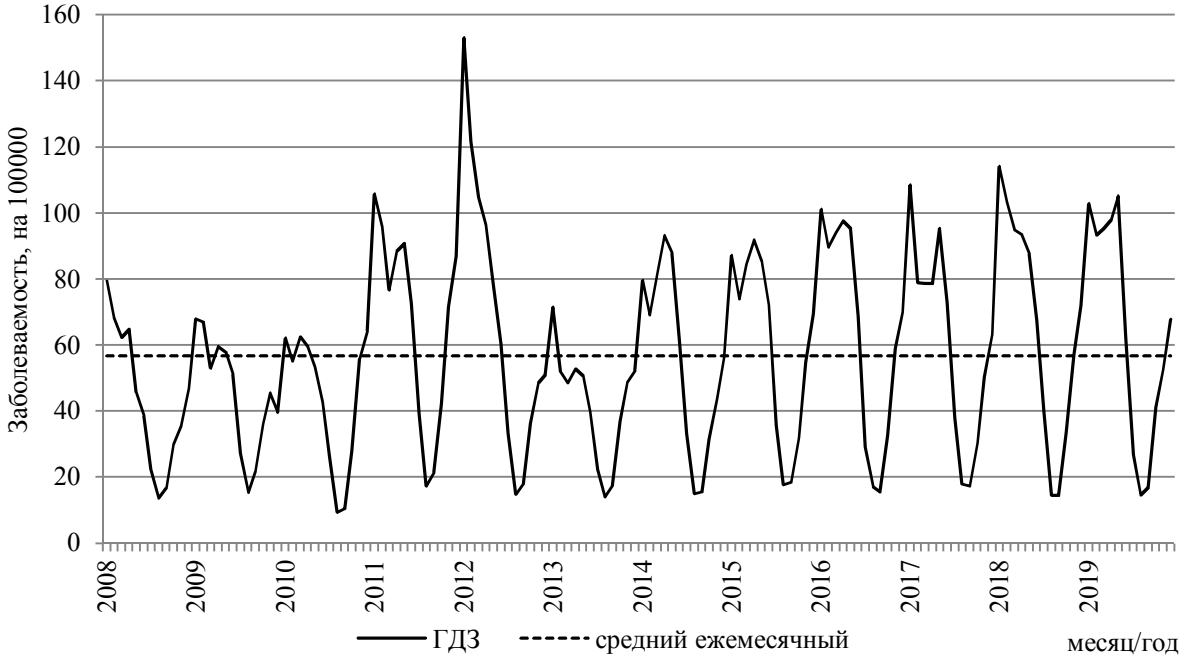


Рисунок 1. – Помесячная динамика заболеваемости ветряной оспой населения Республики Беларусь за период 2008-2019 гг.

При оценке типовой кривой, построенной по среднемноголетним данным за 2008-2019 гг., установлено, что сезонный подъем заболеваемости начинался 16 декабря и заканчивался 3 июля, его продолжительность составила 6,6 месяцев (190±3,41 дня), межсезонный период длился 5,4 месяцев. Минимальная заболеваемость регистрировалась в августе (15,1‰000 [95% ДИ: 14,4; 15,9]). Затем следовал постепенный рост заболеваемо-

сти до января, когда регистрировалась максимальная заболеваемость (94,4‰000 [95% ДИ: 92,45; 96,36]). После начала сезонного подъема заболеваемость держалась на высоком уровне в течение февраля-мая (p>0,05), затем резко снижалась (рисунок 2).

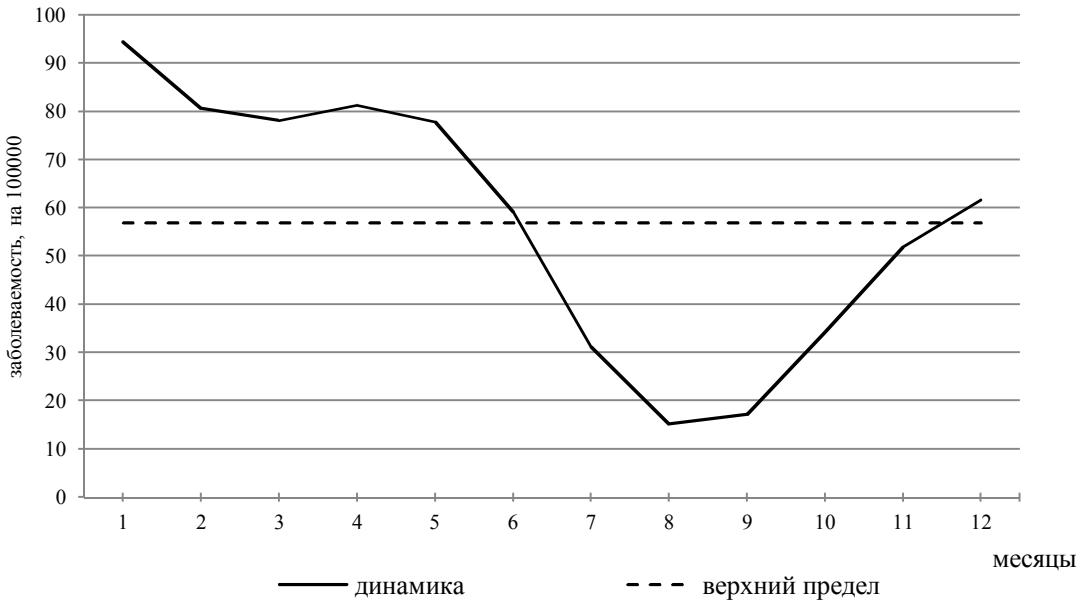


Рисунок 2. – Годовая динамика заболеваемости ветряной оспой населения Республики Беларусь за период 2008-2019 гг. (типовая кривая)

Дополнительно количественную оценку влияния сезонных факторов в каждом месяце проводили с использованием сезонных индексов. Диапазон колебаний сезонных индексов составил 26,6 в августе до 166,0 в январе (стандартное отклонение 47,7). Таким образом, установлено, что месяцами межсезонного периода были июль-ноябрь, сезонного подъема декабрь-июнь. Заболеваемость в августе была на 73,4% меньше среднемесячного уровня (сезонный индекс 26,6), а заболеваемость в январе превысила среднемесячный уровень на 66,0% (таблица 1).

Таблица 1. – Количественная оценка влияния сезонных факторов на заболеваемость ветряной оспой (метод сезонных индексов по среднемноголетним данным 2008-2019 гг.)

Месяцы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Сезонные индексы	166,0	141,8	137,3	142,8	136,8	104,0	54,9	26,6	30,0	60,3	91,3	108,3

Установлено, что интенсивность эпидемического процесса ветряной оспы, формировалась под действием как сезонных и круглогодичных факторов. Так, под действием только круглогодичных факторов формировалось 190,4‰000 человеко-месяцев [95% ДИ: 187,6; 193,1]. Заболеваемость, связанная с влиянием только сезонных факторов, была существенно выше и составила 496,3‰000 человеко-месяцев [95% ДИ: 491,9; 500,79]. (p<0,05). Вероятность заболеть ветряной оспой в период сезонного подъема (IRR) в 2,6 раза выше в сравнении с межсезонным периодом.

Во всех группах отмечался выраженный сезонный подъем заболеваемости в зимне-весенний период. В группах 3-6 лет, 7-14 лет и 15 лет и старше минимальные показатели регистрировались в августе, в группе детей 0-2 года – в сентябре. Затем отмечался постепенный рост заболеваемости. У детей 0-2 года максимальная заболевае-

мость выявлена в январе, а в других возрастных группах пик заболеваемости пришелся на май (рисунок 3).

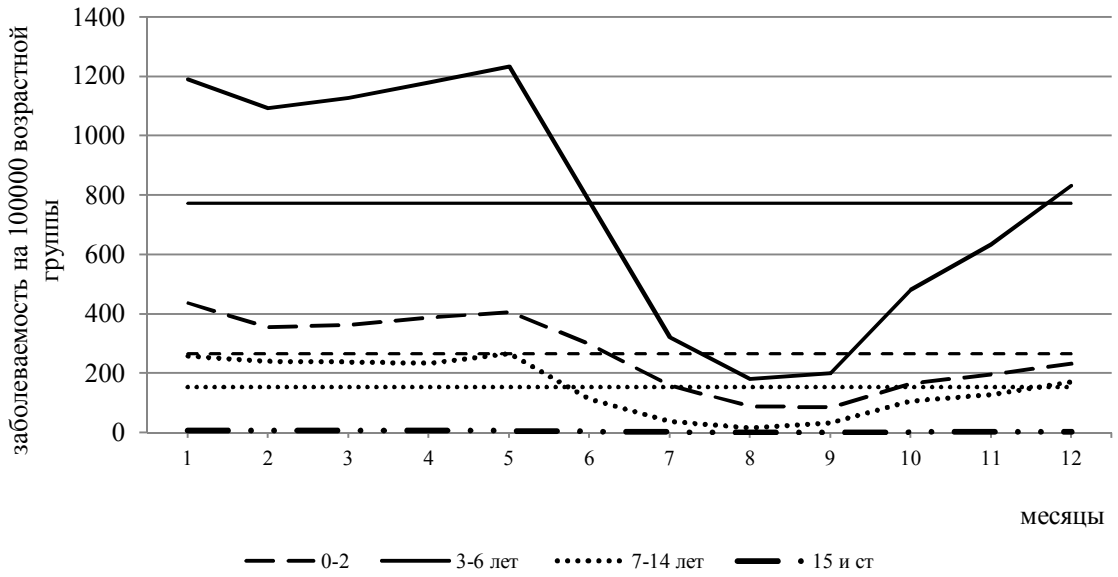


Рисунок 3. – Годовая динамика и верхний предел круглогодичной заболеваемости ветряной оспой в возрастных группах населения Беларуси (индивидуальные кривые, 2019 г.)

Продолжительность и интенсивность сезонного подъема существенно отличалась в разных группах. Раньше всех сезонный подъем заболеваемости ветряной оспой начинался в группе 7-14 лет (18 декабря) и длился 166 дней. Несмотря на то, что сезонный подъем у детей 3-6 лет начинался на 3 дня позже, он имел самую большую продолжительность (192 дня), и показатели заболеваемости были самыми высокими на протяжении всего года. Минимальный показатель регистрировался в августе и составил 181,3‰000, что в 10,1 раза выше, чем аналогичный показатель заболеваемости среди детей 7-14 лет. Максимальная заболеваемость была выявлена в мае и составила 1232,5‰000, что в 4,6 раза выше заболеваемости в этот месяц в 7-14 лет. В этой возрастной группе интенсивность как круглогодичной (4370,9%000 человеко-месяцев), так и сезонной формы (4879,8‰000 человеко-месяцев) ЭП ветряной оспы превышал аналогичные показатели в группе 7-14 лет в 4,1 и 6,1 раза соответственно. Однако IRR в период сезонного подъема детей в возрасте 3-6 лет составил лишь 1,1, что связано с достаточно высоким уровнем заболеваемости, обусловленной круглогодичными факторами (таблица 2).

В возрастной группе 0-2 года минимальный показатель регистрировался в сентябре и составил 87,1‰000. Максимальная заболеваемость в отличие от других групп была выявлена в январе – 437,1‰000. Сезонный подъем начинался на 13 дней позже (5 января), заканчивался на 6 дней позже (7 июля), чем в группе 3-6 лет, и продолжался 183 дня. По интенсивности ЭП ветряной оспы, обусловленной действием круглогодичных (1868,6‰000 человеко-месяцев) и сезонных факторов (1320,1‰000 человеко-месяцев) дети в возрасте 0-2 года уступали только группе 3-6 лет ($p<0,05$).

В группе взрослых (15 лет и старше) сезонный подъем начинался одновременно (6 января) с группой 0-2 года и имел длительность 175 дней. Однако интенсивность как круглогодичной, так и сезонной форм ЭП ветряной оспы в данной группе была низкой (соответственно – 38,5‰000 и 24,9‰000 человеко-месяцев, $p<0,05$).

Таблица 2. – Характеристика годовой динамики заболеваемости ветряной оспой в возрастных группах населения Беларуси (индивидуальные кривые, 2019 г.)

Параметры	*Возраст*			
	0-2 года	*3-6 лет*	*7-14 лет*	*15 лет и старше*
Дата начала сезонного подъёма	05,01	21,12	18,12	06,01
Дата окончания сезонного подъёма	07,07	01,07	22,06	28,06
Месяц минимальной заболеваемости	9	8	8	8
Минимальная заболеваемость, на 100 000 населения	87,1	181,3	18,0	1,6
Месяц максимальной заболеваемости	1	5	5	5
Максимальная заболеваемость, на 100 000 населения	437,1	1232,5	268,2	8,8
Продолжительность сезонного подъема (дней)	183	192	166	175
Круглогодичная интенсивность на 100 000 человеко-месяцев	1868,6	4370,9	1068,4	38,5
Сезонная интенсивность на 100 000 человеко-месяцев	1320,1	4879,8	792,9	24,9

Таким образом, годовая динамика заболеваемости ветряной оспой в различных возрастных группах в 2019 г. характеризовалась синхронностью течения с различиями в интенсивности и выраженной зимне-весенней сезонностью. Возрастная группа 3-6 лет определяла формирование сезонного подъема заболеваемости ветряной оспой. Несмотря на то, что данная возрастная группа вступала в сезонное повышение заболеваемости на 3 дня позже детей 7-14 лет, сезонный подъем в данной возрастной группе являлся самым продолжительным и интенсивным. Кроме того, явилась единственной возрастной группой, в которой интенсивность эпидемического процесса ветряной оспы, обусловленная действием сезонных факторов, преобладала над интенсивностью, связанной с действием круглогодичных факторов.

Несмотря на наличие сезонообразующего фактора в школьном возрасте (ежегодное формирование новых начальных классов в школах и заносы инфекции в школьные учреждения) в 2019 г. 72,0% детей уже переболели ветряной оспой к 7 годам. Интенсивность эпидемического процесса в группе 7-14 лет менее выражена, а сам сезонный подъем в наибольшей мере растянут во времени, достигая пика заболеваемости в мае. Так же, как и в группе 0-2 года интенсивность эпидемического процесса ветряной оспы, обусловленная действием круглогодичных факторов, преобладала над интенсивностью, связанной с действием сезонных факторов. Высокие значения частоты случаев ветряной оспы в круглогодичном компоненте эпидемического процесса в возрастных группах 0-2 года и 7-14 лет свидетельствуют, что именно в этих группах населения происходило сохранение возбудителя данной инфекции в межэпидемический период.

Лица в возрасте 15 лет и старше вступали в сезонный подъем заболеваемости ветряной оспой одновременно с детьми 0-2 лет. Вместе с тем, низкая интенсивность как круглогодичной, так и сезонной форм эпидемического процесса свидетельствует, что

данная возрастная группа в сезонных проявлениях заболеваемости ветряной оспой самостоятельного значения не имела.

Литература

1. Дронина, А.М. Тенденции в эпидемическом процессе ветряной оспы в условиях его естественного развития / А.М. Дронина, Т.С. Гузовская, Е.О. Самойлович // Мед. журн. – 2019. – № 4. – С. 53-57.

2. Varicella and herpes zoster vaccines: WHO position paper, June 2014 – Recommendations // Vaccine. – 2016. – Vol. 34. – P. 198-199.

3. Эпидемиология: учебник / Г.Н. Чистенко [и др.]; под ред. проф. Г.Н. Чистенко. – Минск: Новое знание, 2020. – 848 с.

4. Barnett, A.G. Analysing Seasonal Data / A.G. Barnett, P. Baker, A.J. Dobson [Electronic resource]. – The R. Journal. – 2012. – Vol. 4/1. – P. 5-10. – Mode of access: https://journal.r-project.org/archive/2012/RJ-2012-001/RJ-2012-001.pdf. – Date of access: 16.09.2020.

5. Davey, A.M. Identification of seasonality in time series: a note / A.M. Davey. B.E. Flores // Mathl. Comput. Modelling. – 1993. – Vol. 18, No. 6. – P. 73-81.

FEATURES OF THE SEASONAL DYNAMICS OF VARICELLA INCIDENCE AMONG THE POPULATION IN BELARUS

[1]Dronina A.M., [1]Samoilovich E.O., [1]Semeiko G.V., [1]Yermolovich M.A., [2]Guzovskaya T.S.

[1]Republican Research &Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Time series datasets can contain a seasonal component. Spatial and temporal distribution of varicella is heterogenic and insufficiently studied. In Belarus, varicella is a compulsory notifiable infectious disease. A 12-year retrospective study of the monthly and seasonal varicella epidemiology was performed national level. A seasonal pattern of varicella was clearly demonstrated. The seasonal rise began in December, reached the maximum in January, ended on July. The incidence rate ratio (IRR) are 2.6 times higher during the seasonal climb compared to the off-season. Varicella Zoster Virus is transmitted between children. It was identifying seasonality in the age group. The longest and most intense seasonal rise occurs among children 3-6 years old.

Keywords: varicella, seasonality, incidence, Belarus.

Поступила 16.11.2020

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СКАРЛАТИНЫ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Ракова К.С., Сакович М.Н.

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

Резюме. Качество оказания медицинской помощи пациентам со стрептококковой инфекцией во многом зависит от понимания врачами современных особенностей клиники, эпидемиологии и лечения заболеваний данной группы. Вместе с тем, в литературных обзорах отечественной и зарубежной научной публицистики специалистами в области общественного здравоохранения все чаще описываются случаи возникновения не типичного для благополучных и высокоразвитых стран роста заболеваемости скарлатиной на фоне эффективного применения антибактериальных препаратов, что вызывает обеспокоенность научного сообщества и медицинских работников. В настоящей работе проведена оценка особенностей проявления клинико-эпидемиологической характеристики скарлатины в Могилевской области и представлены результаты ретроспективного клинико-лабораторного наблюдения за 79 заболевшими скарлатиной, находившимися на стационарном лечении в учреждении здравоохранения «Могилевская инфекционная больница» в 2017-2019 гг.

Ключевые слова: эпидемиология, стрептококковая инфекция, скарлатина, *Streptococcus pyogenes*.

Введение. В середине XX века скарлатина имела широкое распространение среди населения и занимала значительную долю в структуре инфекционной патологии детского населения.

Введение в клиническую практику этиотропной терапии с применением антибактериальных препаратов, организация действенных санитарно-противоэпидемических мероприятий в очагах инфекционного заболевания, способствовали двадцатикратному снижению интенсивности эпидемического процесса скарлатины среди населения Могилевской области на протяжении 60 лет, с 325,1 случаев на 100 000 населения в 1961 г. до 16,1$^{0}/_{0000}$ в 2019 г.

Вместе с тем, в течение последних пяти лет специалисты в области общественного здравоохранения Европейского региона (Великобритания) отмечают рост заболеваемости скарлатиной на уровне 60-х годов прошлого века. Обзор научной литературы, позволяет полагать, что данное явление наиболее вероятно связано со сменой доминирующего штамма *Streptococcus pyogenes emm*1 M1global, на не циркулировавший ранее *S. pyogenes emm*1 M1UK, характеризующийся увеличенной продукцией стрептококкового пирогенного экзотоксина A (SpeA) [1-3].

Таким образом, несмотря на успехи антибактериальной терапии в лечении стрептококковых инфекций, для специалистов в области здравоохранения и в настоящее время остаются актуальными вопросы профилактики, диагностики и лечения скарлатины.

Цель исследования – провести анализ клинико-эпидемиологических особенностей скарлатины у лиц, находившихся на стационарном лечении в современных условиях, оценить результативность лабораторной диагностики.

Материалы и методы исследования. Работа проводилась в 2019-2020 гг. в учреждении здравоохранения «Могилевская инфекционная больница» и учреждении здравоохранения «Могилевский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья».

В рамках работы проведена оценка медицинской документации «Медицинская карта стационарного пациента» форма N 003/у-07 (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.10.2007 № 792 «Об утверждении форм первичной медицинской документации в организациях здравоохранения, оказывающих стационарную помощь») у 79 пациентов со скарлатиной. Клиническое наблюдение за пациентами включало оценку симптомов болезни при обращении за медицинской помощью и на момент поступления в стационар. Оценка лабораторного обследования заключалась в интерпретации клинического анализа крови, общего анализа мочи, посева мазка из ротоглотки на гемолитический стрептококк.

Сбор и обработка статистических данных выполнен с помощью пакета программ Microsoft Office Excel при использовании стандартных методик эпидемиологической диагностики.

Результаты исследования и их обсуждение. Под наблюдением в инфекционном стационаре в период с 2017-2019 гг. находились 79 пациентов со скарлатиной в возрасте от 11 мес. до 24 лет (n=79). Преобладали дети в возрасте 3-5 лет (40 чел. – 50,63%), $p>0,05$ по сравнению с детьми 6-11, 14-17 лет и взрослыми, $p<0,05$ по сравнению с детьми 0-2 года. Дети в возрасте 6-11 лет (n=23) составили 29,11%, дети 0-2 года (n=10) – 12,65%, подростки 14-17 лет (n=4) – 5,06%, взрослые составили 2,53% (n=2). Распределение заболевших по половому признаку характеризовалось преобладанием среди пациентов мужчин – 67,09% (n=53), женщины составили 32,91% (n=26) ($p<0,05$).

На протяжении 2017-2019 гг. количество госпитализированных больных возросло с 17 человек в 2017 г., до 29 в 2018 г. и до 37 в 2019 г. ($p<0,05$ по сравнению с показателем госпитализации в 2019 и 2017 гг.), что связано в том числе с ростом общего числа заболевших скарлатиной (2017 г. – 307, 2018 г. – 425, 2019 г. – 367) ($p<0,05$, по сравнению с показателем заболеваемости в 2019 и 2017 гг.).

В целом, сроки госпитализации заболевших были относительно ранними. На 1-2 день болезни госпитализированы 53 человека (67,09%), на 3-5 день болезни – 17 пациентов (21,52%). Причиной поздней госпитализации 9 человек являлось позднее обращение за медицинской помощью в организации здравоохранения, преимущественно связанное с ухудшением состояния заболевших.

Первичный диагноз скарлатины был установлен до поступления в стационар у 33 заболевших – 41,77%. В остальных случаях в инфекционный стационар поступали заболевшие с диагнозами острый тонзиллит – 18 человек, ОРИ – 10, экзантема и ОРИ – 7, экзантема – 5, гипертермический синдром – 4, инфекционный мононуклеоз – 1, энтеровирусная инфекция – 1 человек.

Эпидемиологический анамнез у 67 заболевших (84,81%) был без особенностей, подтвердили контакт с заболевшим скарлатиной 7 человек (8,86%), контакт с вероятным случаем скарлатины – 5 человек (6,32%).

Анамнестически начальный период болезни удалось установить у 78 человек, общим для заболевших симптомом являлось повышение температуры тела. На момент госпитализации у 10 человек зафиксировано повышение температуры тела свыше 39ºС (12,82% (ДИ±7,1%; 95%)), от 38 до 38,9ºС у 28 пациентов (35,89% (ДИ±10,19%; 95%)), от 37 до 37,9ºС у 30 (38,46% (ДИ±10,33%; 95%)), оставалась нормальной у 11 пациентов (14,10% (ДИ±7,39%; 95%)).

На боль в горле с начала болезни жаловались 41,02% (n=32) (ДИ±10,45%; 95%) пациентов, отмечали насморк 26,92% (n=21) (ДИ±9,42%; 95%), рвоту – 24,35% (n=19) (ДИ±9,12%; 95%), вялость и головную боль – 15,38%, (n=12) (ДИ±7,66%; 95%) (менее постоянными были жалобы на кашель – 11,53% (n=9), боль в животе – 6,41% (n=5), диарею –

1,28% (n=1). Треть пациентов (23 человека) на момент обращения предъявляли жалобы на появление от 2 до 3 выше обозначенных симптомов болезни (ДИ±9,65%; 95%).

Таким образом, основными проявлениями начального периода являлись повышение температуры тела, рвота (чаще на фоне повышенной температуры тела), боль в горле, насморк и синдром интоксикации.

При первичном осмотре в приемном отделении УЗ «Могилевская инфекционная больница» у всех пациентов выявлена гиперемия слизистой оболочки ротоглотки, у 57 человек (72,15%) отмечена гипертрофия небных миндалин (ДИ±9,52%; 95%), у 52 (65,82%) – увеличение регионарных лимфоузлов (ДИ±10,07%; 95%) (подчелюстные у 46,16%, шейные у 5,76%, подчелюстные и шейные – 48,08%), у 20 (25,3%) – насморк (ДИ±9,23%; 95%), реже – увулит 3,79% (3), цистит 2,53% (2), конъюнктивит 1,26% (1).

Анамнестически удалось установить период высыпаний, который у 56,96% заболевших (n=45) начинался с появления на коже типичной мелкоточечной сыпи на 1 сутки от момента заболевания (ДИ±10,52%; 95%), на 2 сутки – 27,85% (n=22) (ДИ±9,52%; 95%), на 3 и более у 15,19% (n=12) (ДИ±7,62%; 95%). Локализация сыпи была типична для всех заболевших: на туловище у 50,63% (40 человек), преимущественно на сгибательной поверхности туловища и конечностях у 35,44% (28 человек), на лице и туловище у 13,92% (11 человек). Характерный вид лица, а именно: бледный носогубный треугольник и румянец щек имели только 8 заболевших (10,13%) (ДИ±6.41%; 95%) [4].

При первичном осмотре у 54,28% (n=38) детей в возрасте до 10 лет выявлено снижение частоты дыхания, что вероятно связано с присутствием в крови заболевших токсических продуктов метаболизма *S. pyogenes*, влияющих на дыхательный центр головного мозга. Вместе с тем, у заболевших старше 10 лет оценка функции дыхания не выявляла отклонений, что свидетельствует о совершенствовании адаптационных систем организма на влияние токсических продуктов метаболизма *S. pyogenes* с увеличением возраста заболевшего (χ^2=9,414, p<0,01) (таблица).

Таблица. – Частота дыхания у лиц, заболевших скарлатиной и госпитализированных УЗ «Могилевская инфекционная больница» в 2017-2019 гг.

Возраст	*Частота дыхания при первичном осмотре, раз в минуту – кол-во человек (%)*	*Частота дыхания в норме, раз в минуту* [5]
1-3 года	18-24 – 21 человек (77%)	28-35
	26-28 – 8 человек (23%)	
4-6 лет	18-20 – 11 человек (42,3%)	24-26
	22-24 – 14 человек (53,9%)	
	40 – 1 человек (3,8%)	
7-9 лет	18-19 – 6 человек (40%)	21-23
	20-24 – 9 человек (60%)	
10-12 лет	18-22 – 4 человека (100%)	18-20
13-15 лет	18 – 2 человека (100%)	16-18
16-17 лет	18 – 1 человек (100%)	12-16
18-24 года	18 – 2 человека (100%)	12-16

Анализ крови в остром периоде заболевания характеризовался лейкоцитозом у 56 заболевших (70,88%) (ДИ±9,65%; 95%). Выраженная степень лейкоцитоза (12-20*10^9/л) выявлена у 82,14% (n=46), умеренное проявление (10-12*10^9/л) отмечалось у 17,85% (n=10), значительно выраженный лейкоцитоз (30-50*10^9/л) не выявлялся. Лейкопения выявлена у 2 заболевших (2,53%). Нормальное распределение лейкоцитов в анализе крови (4-9*10^9/л) было выявлено у 26,58% заболевших (21 человек). Палочкоядерный сдвиг влево выявлен у 79,74% (n=63) и колебался в пределах 7%-48% в структуре лейкоцитарной формулы [6].

Эозинофилия выявлена у 31,64% заболевших (n=25) (ДИ ±9,88%; 95%).

При оценке показателя среднего объема эритроцита (MCV) отмечено, что его нормальное распределение (в пределах 77-90 фл) лабораторно подтверждено у 43 заболевших (54,43%), микроцитарные эритроциты (менее 77 фл) выявлены у 36 человек (45,56% (ДИ ±10,58%; 95%)). С одной стороны, длительно протекающая инфекция способна вызвать данное состояние, с другой, не исключен риск развития железодефицитной анемии. Таким образом, установление причин снижения MCV, требует дополнительной дифференциальной диагностики [7].

Скорость оседания эритроцитов у 29,11% (n=23) не превышала 10 мм/ч, у 39,24% (n=32) — колебалась от 10 до 20 мм/ч, в 31,64% случаев (n=24) — составила более 20 мм/ч.

Распределение показателя уровня сахара в крови колебалось в пределах 3,3-5,5 ммоль/л у 79,74% (63 человека), менее 3,3 ммоль/л у 5,06% (4 человека), более 5,5 ммоль/л у 15,18% (12 человек).

Общий анализ мочи проведен всем госпитализированным при поступлении в стационар. Нормальное распределение показателей цветности выявлялось у 63,29% (n=50) (ДИ±10,24%; 95%), слабо мутной цветностью характеризовалась моча у 31,64% (n=25) (ДИ±9,88%; 95%), мутная 5,06% (n=4) (ДИ±4,66%; 95%). Соли в моче (оксалаты и ураты) выявлены у 10,12% заболевших (n=8) (ДИ±6,41%; 95%).

В анализе мочи в остром периоде заболевания лейкоцитоз выявлен у 32,91% заболевших (n=26) (ДИ±9,98%; 95%). Умеренное проявление лейкоцитоза (5-9 в поле зрения) отмечалось у 57,69% (n=15), выраженная степень лейкоцитоза (10-20 в поле зрения) выявлена у 30,76% (n=8), значительно выраженный лейкоцитоз (30-40 в поле зрения) у 11,53% (n=3).

Бактериологическое исследование клинического материала проведено 92,40% заболевшим (73 человека) до начала антибиотикотерапии, возбудитель *S. pyogenes* выявлен у 36,98% заболевших (27 человек) (ДИ±10,25%; 95%). 14 пациентам (17,72%) проведено серологическое и ПЦР-исследование клинического материала с целью дифференциальной диагностики возбудителей вирусной этиологии – у 1 пациента выявлено микст-инфицирование аденовирусом и *S. pyogenes*.

Лечение пациентов со скарлатиной было комплексным и включало этиопатогенетическую терапию. 74,35% всех пациентов принимали амоксициллин, в 15,38% цефотаксим, в остальных случаях — азитромицин, кларитромицин, флемоксин, цефазолин, цефтриаксон.

На фоне назначенной антибактериальной терапии – у 97,47% пациентов температура тела нормализовалась к 4 дню болезни (ДИ±3,34%; 95%). Из-за ранних сроков нормализации температуры на 4-6 день были выписаны 34,61% пациентов, на 1-3 – 20,51%. Вместе с тем, 44,8% были выписаны из стационара на 7-12 день болезни под наблюдение участкового педиатра.

Выводы

1. В современных условиях, несмотря на активное применение антибактериальных препаратов, проведение санитарно-противоэпидемических мероприятий отмечается рост заболеваемости скарлатиной.

2. Отмечается рост удельного веса госпитализированных лиц с 5,53% до 10,08% от общего количества пациентов со скарлатиной.

3. Более чем у 50% госпитализированных диагноз скарлатина только после или во время госпитализации.

4. В целом заболевание протекает с типичной клинической картиной и характеризуется соответствующей этапностью проявления симптомов.

5. Результаты лабораторного исследования общего анализа крови характеризовались сдвигом лейкоцитарной формулы влево, в крови заболевших выявлен лейкоцитоз и эозинофилия.

6. В крови 45,5% заболевших отмечено снижение среднего объема эритроцита, однако установление причин данного явления в настоящее время не являлось целью исследования.

7. В общем анализе моче у трети заболевших отмечены признаки воспалительного процесса, из них у 42,12% отмечена выраженная степень лейкоцитоза в моче.

8. Воспалительные изменения мочеполовой системы свидетельствуют о необходимости рассмотрения вопроса включения консультации врача-нефролога в перечень специалистов, проводящих диспансерное наблюдение переболевших.

9. Эффективность бактериологического обнаружения стрептококка группа А (*S. pyogenes*) классическими методами характеризуется как невысокая, идентифицировать культу возбудителя удалось у 36,98% заболевших.

Литература

1. Resurgence of scarlet fever in England, 2014–16: a population-based surveillance study [Electronic resource] / T. Lamagni [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2018. – Vol. 18, No. 2. – P. 180-187. – Mode of access: https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(17)30693-X/fulltext/. – Date of access: 13.07.2020.

2. Emergence of dominant toxigenic M1T1 *Streptococcus pyogenes* clone during increased scarlet fever activity in England: a population-based molecular epidemiological study [Electronic resource] / N.N. Lynskey [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2019. – Vol. 19, No. 11. – P. 1209-1218. – Mode of access: https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(19)30446-3/fulltext/. – Date of access: 13.07.2020.

3. Scarlet fever changes its spots [Electronic resource] / S. Brouwer [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2019. – Vol. 19, No. 11. – P. 1154-1155. – Mode of access: https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(19)30494-3/fulltext/. – Date of access: 13.07.2020.

4. Астапов, А.А. Скарлатина у детей: учеб.-метод. пособие / А.А. Астапов, Р.Н. Манкевич. – Минск: БГМУ, 2014.

5. Галькевич, Н.В. Частота дыхания, пульс / Н.В. Галькевич // Профессор: Профессорский консультационный центр Белорусского государственного медицинского университета [Электронный ресурс]. – Декабрь 02, 2016. – Режим доступа: http://professor.bsmu.by/article/chastota-dyhaniya-puls/. – Дата доступа: 13.07.2020.

6. Висмонт, Ф.И. Патофизиологический анализ гемограмм и оценка типовых нарушений системы крови: учеб.-метод. пособие / Ф.И. Висмонт, Л.С. Лемешонок, Д.М. Попутников. – Минск: БГМУ, 2011.

7. Шарабчиев, Ю.Т. Показатели здоровья в цифрах и фактах: справочник / Ю.Т. Шарабчиев, Т.В. Дудина. – Минск: Книжный дом, 2004.

CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SCARLET FEVER AT THE PRESENT STAGE

Rakova K.S., Sakovich M.N.

Mogilev Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Mogilev, Republic of Belarus

The quality of medical care for patients with streptococcal infection largely depends on the doctors' knowledge of the modern features of the clinic, epidemiology, and treatment of the diseases group. At the same time, in scientific reviews of domestic and foreign journalism, public health experts are increasingly describing the increase in the incidence of scarlet fever at the present stage. This work evaluates the features of the manifestation of the clinical and epidemiological characteristics of scarlet fever in the Mogilev region and presents the results of retrospective clinical and laboratory observation of 79 patients with scarlet fever who were hospitalized at the Mogilev Infectious Diseases Hospital in 2017-2019.

Keywords: epidemiology, streptococcal infection, scarlet fever, *Streptococcus pyogenes*.

Поступила 12.10.2020

ПОДДЕРЖАНИЕ ЭЛИМИНАЦИИ КОРИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ, 2019-2020 гг.

[1]Самойлович Е.О., [1]Семейко Г.В., [2]Высоцкая В.С., [1]Ермолович М.А., [1]Свирчевская Е.Ю., [2]Глинская И.Н.

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

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

Резюме. В 2019 г. в Республике Беларусь был выявлен 201 случай кори, из которых 193 подтверждены лабораторно с использованием серологических и/или молекулярных методов, 8 случаев являлись эпидемиологически связанными с лабораторно подтвержденными. Выполненное секвенирование вируса кори от 64 пациентов выявило 10 генетических вариантов вируса, принадлежащих к двум генотипам – B3 и D8. Генотип B3 был представлен двумя генетическими линиями: B3, Dublin (2 геноварианта) и B3, Marikina city. Генотип D8 был представлен тремя генетическими линиями: D8, Frankfurt, D8, Victoria, и D8, Gir Somnath (5 геновариантов). Со 100% идентичным сиквенсом были 47 штаммов D8, Gir Somnath. Эпидемиологические данные и результаты молекулярно-генетического изучения вируса позволили идентифицировать 58 случаев завоза вируса на территорию Республики Беларусь в 2019 г. Выявлено 24 цепочки передачи вируса кори на территории страны. Циркуляция каждого из выявленных генетических вариантов вируса продолжалась не более 2-3 месяцев после чего прекращалась, что подтверждает отсутствие эндемичной циркуляции вируса кори на территории Республики Беларусь. В течение 13 месяцев (сентябрь 2019 г. – сентябрь 2020 г.) ни одного случая кори в Республике Беларусь выявлено не было.

Ключевые слова: корь, вирус кори, генотипирование, элиминация, Беларусь.

Введение. В Европейском регионе (далее – Регион) 2018 и 2019 гг. ознаменовались существенным ростом заболеваемости корью. Число выявленных в 2018 г. случаев составило 83 540, в 2019 г. – 104 248 [1, 2]. За первую половину 2020 г. в Регионе зарегистрировано 12 028 случаев кори, что на 87% ниже по сравнению с числом случаев, зарегистрированных за аналогичный период 2019 г. [3].

Согласно оценке Европейской региональной комиссии по верификации элиминации кори, проведенной в июле 2019 г., основанной на результатах анализа эпидемической ситуации по кори в предшествующие годы, 35 стран Региона приобрели или сохранили статус элиминации кори (по сравнению с 37 странами в 2017 г.), 2 страны прервали эндемическую передачу кори (на протяжении 12–35 месяцев), 12 стран остаются эндемичными в отношении кори, а в 4 странах, которые ранее добились элиминации кори, возобновилась ее передача [4]. К странам, которые утратили статус элиминации кори, отнесены Албания, Греция, Соединенное Королевство и Чехия. Подобная ситуация возникла в Регионе впервые с момента начала процесса верификации в 2012 г.

Республика Беларусь за все годы оценки комиссией (2012-2018 гг.) отнесена к странам, в которых корь элиминирована.

Целью настоящего исследования явился анализ ситуации по кори в Республике Беларусь за 10 месяцев 2019 и 2020 гг., основанный на эпидемиологических данных и результатах генотипирования вируса, для представления полученной информации в Республиканскую комиссию по сертификации элиминации кори и краснухи Министерства здравоохранения Республики Беларусь с последующим представлением в Европейскую региональную комиссию.

Материалы и методы исследования. Выявление подозрительных на корь пациентов и направление клинического материала на лабораторное исследование проводилось в соответствии с Санитарными нормами и правилами «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения кори и краснухи» от 26.12.2013 № 130. Лабораторное обследование всех подозрительных пациентов было выполнено в Республиканской референс-лаборатории по кори и краснухе (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии).

В 2019 г. в Республике Беларусь на корь лабораторно обследовано 556 подозрительных пациентов, с 1 января по 30 сентября 2020 г. (9 месяцев) – 113 пациентов.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ основным методом исследования было выявление IgM антител к вирусу кори в ИФА [5]. В отдельных случаях (при сомнительном результате исследования IgM антител, при наличии клинической картины инфекции у ранее вакцинированного пациента) проводилось выявление нарастания концентрации IgG антител в парных сыворотках и обнаружение РНК вируса в клиническом материале в ОТ-ПЦР [6]. Кроме того, выявление РНК вируса в ПЦР с последующим генотипированием вируса проводили для всех тех случаев, которые не имели четкой эпидемиологической связи с другим лабораторно подтвержденным случаем.

Антитела классов IgM и IgG к вирусам кори определяли с использованием соответствующих иммуноферментных тест-систем производства Euroimmune (Германия), Вектор-БЕСТ (Российская Федерация).

Выделение вирусной РНК из клинического материала выполняли с помощью набора «АртРНК MiniSpin» (АртБиоТех, Беларусь).

В целях генотипирования выполняли секвенирование С-терминальной области N-гена (450 нуклеотидов) вируса кори [6]. Амплифицированные фрагменты кДНК вируса кори вырезали из геля, очищали с использованием набора «QIAEX II Gel Extraction Kit» (QIAGEN, Германия) и секвенировали в обоих направлениях с использованием набора «BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit» (Applied Biosystems, США) на капиллярном секвенаторе модели 3500 (Applied Biosystems, США).

Редактирование полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием лицензионного программного обеспечения SeqScape v.3.0 (Applied Biosystems, США), выравнивание – с помощью алгоритма Clustal W, встроенного в программу BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0. Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA версии 6 [7]. Эволюционные расстояния между последовательностями определяли на основании двухпараметрической модели эволюции Кимура. Достоверность топологий филограмм оценивали методом псевдореплик (анализировались 1000 псевдореплик).

Результаты исследования и их обсуждение.

Заболеваемость корью и краснухой в 2019 и 2020 гг. В 2019 г. при лабораторном обследовании 556 пациентов, подозрительных на корь, диагноз подтвержден у 193 заболевших, у 363 диагноз корь на основании результатов лабораторных исследований был исключен. Показатель исключенных случаев составил 3,8 на 100 000 населения, что полностью соответствует критериям ВОЗ (2 и более на 100 000 населения).

Наряду со 193 лабораторно подтвержденными случаями кори было выявлено 8 случаев, которые классифицированы как эпидемиологически связанные с лабораторно подтвержденным случаем. Таким образом, число зарегистрированных случаев кори в 2019 г. составило 201, показатель заболеваемости – 2,13 на 100 000 населения. Заболеваемость корью регистрировалась во всех областях Беларуси – показатели заболеваемости варьировали в пределах от 0,57 на 100 000 населения (Могилевская область) до 5,21 на 100 000 населения (Гродненская область) (таблица 1).

Таблица 1. – Регистрация случаев кори в регионах Республики Беларусь, 2019 г.

Область	*Январь*	*Февраль*	*Март*	*Апрель*	*Май*	*Июнь*	*Июль*	*Август*	*Сентябрь*	*Октябрь*	*Ноябрь*	*Декабрь*	*Всего*
Брестская	3	6	7	1	0	1	1	0	0	0	0	0	19
Витебская	0	2	3	1	8	15	1	0	0	0	0	0	30
Гомельская	1	2	1	11	6	4	1	0	0	0	0	0	26
Гродненская	0	0	3	3	11	35	2	0	0	0	0	0	54
г. Минск	7	1	5	3	9	6	15	5	0	0	0	0	51
Минская	3	6	2	2	0	1	1	0	0	0	0	0	15
Могилевская	0	1	1	0	1	1	2	0	0	0	0	0	6
Республика Беларусь	14	18	22	21	35	63	23	5	0	0	0	0	201

Регистрация случаев кори продолжалась с января по август. Пик заболеваемости пришелся на май-июнь, когда было зарегистрировано 48,8% всех выявленных в 2019 г. случаев кори. Начиная с сентября 2019 г. ни одного случая кори выявлено не было.

В 2020 г. ситуация по кори продолжала оставаться стабильной. За период с 1 января по 30 сентября 2020 г. ни одного случая кори выявлено не было. В сравнении с предыдущими годами существенно снизилось число подозрительных пациентов, материал от которых был направлен в Республиканскую лабораторию по кори и краснухе. За 9 месяцев текущего года обследовано 113 пациентов. Показатель исключенных случаев составил 1,2 на 100 000 населения и за анализируемый период 2020 г. не достиг рекомендованного ВОЗ показателя – не менее 2 на 100 000 населения [8].

Молекулярно-генетический анализ вирусов кори и расшифровка цепочек их передачи. Выполненное в 2019 г. секвенирование вируса кори от 64 пациентов выявило, что они принадлежали к двум генотипам – B3 и D8. Генотип B3 был представлен двумя генетическими линиями: B3, Dublin (2 геноварианта) и B3, Marikina city. Генотип D8 был представлен тремя генетическими линиями: D8, Frankfurt, D8, Victoria и D8, Gir Somnath (5 геновариантов). Со 100% идентичным сиквенсом были 47 штаммов D8, Gir Somnath. По одному генетическому варианту вируса выявлено в Брестской и Гомельской областях, по 2 варианта – в Витебской и Могилевской областях, по 3 варианта – в Гродненской и Минской областях, 5 вариантов – в г. Минске. В целом в течение 2019 г. на территории Республики Беларусь были выявлены вирусы кори, относящиеся к 10 генетическим вариантам, что подтверждает многократность завозов вируса кори на территорию страны

С учетом результатов молекулярного изучения вируса кори и эпидемиологических данных по каждому пациенту, была выполнена классификация выявленных случаев кори (таблица 2). Среди всех зарегистрированных случаев заболевания корью 28,86% (58 случаев) квалифицированы как завозные случаи (завозы вируса кори осуществлялись гражданами Республики Беларусь, выезжавшими за рубеж (в Украину, Российскую Федерацию, страны Балтии, Польшу и др.); 49,75% (100 случаев) – случаи,

связанные с завозными; 21,39% (43 случаев) – случаи с не установленными условиями инфицирования. Эндемичных случаев заболевания корью не выявлено.

Таблица 2. – Классификация случаев кори, выявленных в Республике Беларусь в 2019 г.

Корь	*Лабораторно подтверждённые*	*Эпидемиологически связанные*	*Клинически совместимые*	*Всего*
Завозные случаи	58	0	0	58
Связанные с завозными	92	8	0	100
Эндемичные	0	0	0	0
Случаи с неустановленными условиями инфицирования	43	0	0	43

Полученные молекулярные и эпидемиологические данные позволили выполнить расшифровку цепочек передачи вируса кори на территории страны. В целом в 2019 г. на территории Республики Беларусь было выявлено 24 цепочки передачи вируса кори, в которые вошли 151 случай кори. Одна из них, вызванная вирусом D8, Gir Somnath, уходит своим началом в 2018 г. (продолжалась в период 31.12.2018-15.01.2019, включала 3 заболевших, один из них заболел в 2019 г.).

Из 24 цепочек передачи вируса кори для 22 (91,7%) установлен генотип вируса, что полностью соответствует критериям ВОЗ (90% и более). Установить генотип вируса не удалось для двух цепочек передачи: Гомельская область, г. Чечерск, 3 случая, 22.01.2019-28.01.2019 – по причине не предоставления материала для вирусологического исследования, Брестская область, Кобринский район, 2 случая, 23.01.2019-06.02.2019 – в биологическом материале заболевших вирусную РНК обнаружить не удалось.

Цепочки передачи вируса кори в большинстве случаев были короткими (2-7 случаев кори), в ряде случаев цепочки передачи включали 10 случаев кори и более. В одном случае (Гродненская область) цепочка передачи вируса кори включала 32 случая и продолжалась с 15.03.2019 по 10.06.2019.

Наряду со случаями кори, которые входили в цепочки передачи вируса, было выявлено 50 спорадических случаев. Результаты генотипирования получены для 30 из них (60,0%); 26 были вызваны теми же геновариантами вируса, что и цепочки передачи (D8, Gir Somnath, 4683 – 23 случая; D8, 5795 – 1; D8 (без номера Distinct seq ID) – 2). Еще 4 спорадических случая кори были обусловлены другими генетическими вариантами вируса (таблица 3).

По результатам проведенных исследований 64 вируса кори депонированы в базу данных эпиднадзора за корью на основе определения нуклеотидных последовательностей (MeaNS) [9]. Эпидемиологические данные и результаты лабораторных (серологических, вирусологических, молекулярных, биоинформационных) исследований обобщены и представлены в Республиканскую комиссию по верификации элиминации кори и краснухи в Республике Беларусь и через республиканскую комиссию в Европейскую региональную комиссию.

Таблица 3. – Спорадические случаи кори с генетическими вариантами вируса, не представленными в цепочках передачи

Генотип – идентификационный номер специфической последовательности в MeaNS	*Название субнациональной территории, на которой он был зарегистрирован*	*Дата начала заболевания*	*Документированный завоз (да/нет)*
D8, 5824	Могилевская обл., г. Бобруйск	10.03.2019	да (Литва / РФ)
D8, 5826	Витебская обл., г. Чашники	21.02.2019	нет
B3, Dublin 4299	г. Минск	09.03.2019	нет
B3, Marikina City 5306	г. Минск	18.02.2019	да (Филиппины)

Заключение. Анализ данных эпидемиологического надзора за корью с использованием всего арсенала имеющихся методов свидетельствует о том, что заболеваемости корью в Республике Беларусь в 2019 г. (201 случай) была связана с многочисленными завозами вируса на территорию страны. Выявлено 58 эпизодов завоза, в результате которых на территорию Республики Беларусь были завезены вирусы кори двух генотипов, представленные десятью генетическими вариантами. Некоторые из них получили ограниченное распространение на территории страны, но их циркуляция продолжалась недолго, не более 2-3 месяцев, после чего прекращалась, и восстановления эндемичной циркуляции вируса не произошло, что подтверждается результатами эпидемиологического слежения за корью. Уже более года (с сентября 2019 г. по сентябрь 2020 г.) случаи кори в Республике Беларусь не выявлялись.

Литература

1. World Health Organization Regional Office for Europe. WHO EpiBrief. – 2019. – No. 1. – P. 1-9.
2. World Health Organization Regional Office for Europe. WHO EpiBrief. – 2020. – No. 1. – P. 1-11.
3. World Health Organization Regional Office for Europe. WHO EpiBrief. – 2020. – No. 2. – P. 1-8.
4. Европейское региональное бюро Всемирной организации здравоохранения. Восьмое совещание Европейской региональной комиссии по верификации элиминации кори и краснухи (РКВ), Варшава, Польша, 12-14 июня 2019 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/417900/RVC_Rus.pdf?ua=1. – Дата доступа: 20.10.2020.
5. WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. – 2nd ed. – Geneva: WHO, 2006. – 100 p.
6. Методы лабораторной диагностики кори и краснухи и генотипирования возбудителей: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 19.12.2018, № 022-1118 [Электронный ресурс] / авт.-разраб. Г. В. Семейко, Е. Ю. Свирчевская, М. А. Ермолович, Е. О. Самойлович. – Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2018. – 18 с. – Режим доступа: http://www.belriem.by/images/docs/instruction_main/022-1118_16.12.2018.pdf. – Дата доступа: 20.10.2020.
7. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2013. – Vol. 30, No. 12. – P. 2725-2729.
8. WHO Regional Office for Europe. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. – Copenhagen: WHO, 2010. – 48 p.

9. Measles Nucleotide Surveillance (MeaNS): database for the WHO Measles Laboratory Network [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.who-measles.org/. – Date of access: 20.10.2020.

MAINTAINING MEASLES ELIMINATION IN THE REPUBLIC OF BELARUS, 2019-2020

[1]Samoilovich E.O., [1]Semeiko G.V., [2]Vysotskaya V.S., [1]Yermalovich M.A., [1]Svirchevskaya E.Yu., [2]Glinskaya I.N.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

[2]Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus

In 2019, 201 measles cases were detected in the Republic of Belarus, 193 of them were laboratory confirmed by serological and/or molecular methods and 8 cases were epidemiologically related to laboratory confirmed ones. Sequencing of measles virus from 64 patients was revealed 10 genetic variants of the virus belonging to two genotypes – B3 and D8. The B3 genotype was represented by two genetic lineages: B3, Dublin (2 genetic variants) and B3, Marikina city. The D8 genotype was represented by three genetic lineages: D8, Frankfurt, D8, Victoria, and D8, Gir Somnath (5 genetic variants). There were 47 D8, Gir Somnath strains with 100% identical sequence. Based on epidemiological data and the results of a molecular genetic study it was possible to identify 58 episodes of the importation of the virus into the country in 2019. In the country, 24 chains of measles virus transmission have been identified. The circulation of each of the identified virus genetic variants lasted no more than 2-3 months and then stopped, which confirms the absence of endemic circulation of the measles virus in the Republic of Belarus. In the period for 13 months (September 2019-September 2020) no cases of measles was detected in the country.

Keywords: measles, measles virus, genotyping, elimination, Belarus.

Поступила 03.11.2020

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКИМ ПАРОТИТОМ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ, 2013-2020 гг.

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

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

Резюме. Целью настоящего исследования являлся анализ заболеваемости эпидемическим паротитом в Республике Беларусь за период 2013-2020 гг. по данным официальной регистрации и результатов лабораторного обследования подозрительных на эпидемический паротит пациентов. За этот период зарегистрировано 36 случаев эпидемического паротита, заболеваемость ежегодно составляла менее 1 случая на миллион населения. Случаи регистрировались во всех регионах Республики Беларусь за исключением Гродненской области. Из 36 зарегистрированных случаев 19 (52,8%) подтверждены лабораторно, другие зарегистрированы на основании клинических данных. За анализируемый период времени этиологическая диагностика эпидемического паротита выполнена у 946 пациентов с воспалением слюнных желез, только у 29 из них (19 – жители Республики Беларусь, 10 – иностранные граждане) диагноз подтвержден. Низкий уровень подтверждаемости диагноза эпидемический паротит (3,07%) у пациентов с подозрением на эпидемический паротит, выдвигает необходимость проведения исследований на другие клинически сходные инфекции и расширения использования молекулярных методов при дифференциальной диагностике воспалительных заболеваний слюнных желез.

Ключевые слова: эпидемический паротит, заболеваемость, диагностика, Беларусь.

Введение. В последнее десятилетие в Республике Беларусь удалось достичь поставленной ВОЗ цели – сократить заболеваемость к 2010 г. или раньше до уровня 1 или менее на 100 000 населения страны. Однако в настоящее время во многих странах мира даже на фоне высокого уровня привитости населения регистрируются вспышки эпидемического паротита [1], что выдвигает необходимость своевременного выявления случаев и недопущения их распространения.

Как известно, в условиях низкой заболеваемости значимость лабораторной диагностики инфекции и молекулярно-генетического изучения возбудителя является очень высокой. В Республике Беларусь, в соответствии с инструкцией от 2 июня 2014 г. № 022-1213 «Методы лабораторной диагностики эпидемического паротита» для диагностики эпидемического паротита рекомендовано выявление IgM антител к вирусу паротита в сыворотке крови, обнаружение диагностически значимого нарастания концентрации IgG антител в парных сыворотках, выявление вирусной РНК в биологическом материале с помощью гнездовой ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов реакции.

Целью настоящего исследования являлся ретроспективный анализ заболеваемости эпидемическим паротитом в Республике Беларусь по данным официальной регистрации и с результатов лабораторного обследования подозрительных на эпидемический паротит пациентов.

Материалы и методы исследования. Ретроспективный анализ заболеваемости эпидемическим паротитом в Республике Беларусь по данным официальной регистрации выполнен за восьмилетний период (2013-2020 гг.), в течение которого в стране было зарегистрировано 36 случаев этой инфекции.

За этот же период времени в лабораторию вакциноуправляемых инфекций РНПЦ эпидемиологии и микробиологии был направлен на исследование клинический материал (сыворотка крови, носоглоточный мазок, моча) от 946 пациентов, подозрительных на

эпидемический паротит (188 – 2013 г., 160 – 2014 г., 127 – 2015 г., 120 – 2016 г., 140 – 2017 г., 103 – 2018 г., 83 – 2019 г., 25 – 2020 г.).

Подозрительными на эпидемический паротит считали пациентов с острым воспалением слюнных желёз. Лабораторным подтверждением диагноза считали положительный результат, полученный одним из следующих методов: выявление сывороточных IgM антител к вирусу паротита в иммуноферментном анализе, обнаружение нарастания концентрации IgG антител к вирусу паротита в парных сыворотках крови в иммуноферментном анализе, детекция РНК вируса паротита в биологических образцах (носоглоточный мазок и моча) методом ОТ-ПЦР.

Определение IgM и IgG антител к вирусу паротита выполняли с использованием иммуноферментных тест-систем производства Virion\Serion (Германия), Euroimmun (Германия), Вектор-БЕСТ (Российская Федерация).

Вирусную РНК выделяли из мочи и носоглоточного мазка с помощью наборов QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Германия) и выявляли методом гнездовой ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к SH-гену согласно описанному протоколу [3]. Полученные ПЦР продукты вырезали из геля и секвенировали с использованием набора BigDyeTerminatorv.3.1 Cycle Sequencing kit (AppliedBiosystems, США) на капиллярном секвенаторе 3500 или Avant 3100 (Applied Biosystems, США). Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программ SeqScape, BioEdit и MEGA 6.0 [4].

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ данных официальной регистрации эпидемического паротита в Республике Беларусь показал, что за 8-летний период (2013-2020 гг.) в стране официально зарегистрировано 36 случаев этого заболевания. Эпидемический паротит регистрировался во всех регионах Республики Беларусь, за исключением Гродненской области (Брестская область – 2, Витебская – 6, Гомельская – 1, Минская – 2, Могилевская – 5, г. инск – 17), три случая эпидемического паротита были выявлены в ведомстве вооруженных сил.

Среди зарегистрированных случаев имели место как лабораторно подтвержденные случаи, так и случаи, зарегистрированные только на основании клинической симптоматики. Лабораторное подтверждение получили 19 из 36 (52,8%) зарегистрированных случаев (2013 г. – 5, 2014 г. – 2, 2015 г. – 1, 2016 г. – 2, 2017 г. – 1, 2018 г. – 1, 2019 г. – 7, 2020 г. – 1 (10 месяцев)).

Проведенный анализ данных лабораторного обследования подозрительных на эпидемический паротит пациентов показал, что в течение 8-летнего периода (2013-2020 гг.) в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии лабораторно обследовано 946 подозрительных на эпидемический паротит пациентов из 7 регионов Республики Беларусь (188 – в 2013 г., 160 – в 2014 г., 127 – в 2015 г., 120 – в 2016 г., 140 – в 2017 г., 103 – 2018 г., 83 – 2019 г., 25 – 2020 г. (10 месяцев)). На основании результатов лабораторной верификации диагноз эпидемический паротит был подтвержден у 29 пациентов (5 – в 2013 г., 2 – в 2014 г., 1 – в 2015 г., 11 – в 2016 г., 1 – в 2017 г., 1 – в 2018 г., 7 – в 2019 г., 1 – в 2020 г.). Из них 17 случаев заболевания были подтверждены на основании обнаружения специфических IgM антител, 2 – IgM антител и нарастания концентрации IgG антител, 9 – IgM антител и РНК вируса, 1 – РНК вируса.

Среди лабораторно подтвержденных случаев эпидпаротита 10 были выявлены у иностранных граждан, временно пребывающих на территории Республики Беларусь (Китай – 1 (2016 г.), Таджикистан – 1 (2016 г.), Россия (Республика Чечня) – 7 (2016 г.), 1 – (2017 г.)) и в официальную регистрацию заболеваемости эпидемическим паротитом в Республике Беларусь включены не были.

Среди случаев эпидемического паротита, выявленных у граждан Республики Беларусь, для 4 случаев было установлено, что они развились после посещения во время ин-

кубационного периода заболевания других стран, и они были классифицированы как завозные по эпидемиологическим данным: из России (2013 г.), из Чехии (2013 г.), из Индии (2014 г.), из Литвы-Австрии-Чехии (2019 г.).

Известно, что важную информацию для эпидемиологического анализа предоставляют результаты молекулярно-генетического изучения вирусов от пациентов. Такой информации в Республике Беларусь пока немного. Только для четырех случаев эпидемического паротита, выявленных в 2013-2016 гг., было выполнено секвенирование SH-гена вируса, позволившее выявить различные генотипы или различные генетические варианты одного генотипа вируса [5]. Так, случай эпидпаротита, развившийся в 2013 г. у ребенка 12 лет из г. Могилева после отдыха в Чехии, был вызван вирусом паротита генотипа G. По данным литературы в 2013 г. в Чехии отмечалась крупная вспышка эпидемического паротита (зарегистрировано 1553 случая заболевания), вызванная вирусом этого генотипа [6]. Генотипирование вируса от пациента в возрасте 29 лет из г. Минска, заболевшего после посещения Индии (2014 г.), показало, что он также относится к генотипу G (в Индии в этот период отмечалась коциркуляция генотипов G и C [7]), но обладает значительной долей различий (2,8%, 9 замен) в сравнении с вирусом, завезенным из Чехии. Случай, выявленный в 2016 г. на территории Витебской области у гражданина Китая 25 лет, был вызван вирусом генотипа F. Выявленные в 2016 г. связанные между собой 7 случаев эпидпаротита у детей из Чеченской Республики, временно находящихся с родителями на территории г. Бреста с целью выезда в Евросоюз, были вызваны вирусом генотипа G. Данный вариант вируса также отличался от вариантов генотипа G, завезенных в Республику Беларусь ранее из Чехии и из Индии. Многообразие генетических вариантов вируса на фоне низкой заболеваемости и отсутствие одного характерного для страны генетического варианта свидетельствует в пользу отсутствия эндемичной циркуляции вируса на территории Республики Беларусь. Однако генотипы вируса эпидемического паротита, вызвавшие случаи заболевания в Республике Беларусь позднее 2016 г. не известны и это несколько осложняет анализ эпидемической ситуации.

Случаи эпидемического паротита, зарегистрированные среди граждан Республики Беларусь в 2013-2020 гг., были диагностированы на основании клинических данных без лабораторного обследования либо преимущественно подтверждены только серологическими методами, следовательно, определить генотип вируса не представлялось возможным. Связанных между собой случаев заболевания среди граждан Республики Беларусь выявлено не было. Период времени между случаями составлял несколько месяцев. Эти данные также косвенно свидетельствуют об отсутствии эндемичной циркуляции вируса на территории страны.

В то же время за анализируемый период времени на лабораторную верификацию диагноза был направлен клинический материал от 946 пациентов, подозрительных на эпидемический паротит. Из них диагноз эпидемического паротита удалось подтвердить только у 29 (3,07%) человек. Имели ли случаи с отвергнутым на основании лабораторных данных диагнозом эпидемический паротит вирусную этиологию и были ли обусловлены другими вирусами осталось недоказанным. Требуются дополнительные исследования, направленные на вирусологическое подтверждение каждого случая заболевания с последующей молекулярно-генетической характеристикой вируса, вызвавшего заболевания.

Заключение. Проведенный анализ свидетельствует о том, что заболеваемость эпидемическим паротитом в Республике Беларусь за период 2013-2020 гг. являлось низкой и составляла менее 1 миллиона на 100 000 населения. Низкий уровень подтверждаемости диагноза эпидемический паротит (3,07%) у пациентов с воспалением слюнных желез, направленных на исследование как подозрительные на эпидемический паротит, выдви-

гает необходимость проведения исследований и на другие инфекции. Требуется расширение использования молекулярных методов при диагностике эпидемического паротита и других воспалительных заболеваний слюнных желез.

Литература

1. Principi, N. Mumps outbreaks: A problem in need of solutions / N. Principi, S. Esposito // J. Infect. – 2008. – Vol. 76, No. 6. – P. 503-506.
2. Reported mumps cases (Jan 2011–Jun 2017) and outbreaks (Jan 2016–Jun 2017) in the United States / N.S. Clemmons [et al.] // Presentation at ID Week 2017; October 4–8, 2017; San Diego, California.
3. Методы лабораторной диагностики эпидемического паротита: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 2 июня 2014 г., № 022-1213 [Электронный ресурс]. – Минск: РНПЦЭМ, 2013. – 12 с – Режим доступа: http://www.belriem.by/images/docs/instruction_main/022-1213_02.06.2014.pdf. – Дата доступа: 01.12.2020.
4. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2013. – Vol. 30. – P. 2725-2729.
5. Существует ли эндемичная циркуляция вируса паротита в Республике Беларусь? / Е.О. Самойлович [и др.] // Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии: тез. респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Минск, 2-3 нояб. 2017 г. [Опубл. в] Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. [Электронный ресурс] / М-во здравоохранения. Респ. Беларусь. Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л. П. Титова. — Минск: ГУ РНПЦЭМ, 2017. – Вып. 10. – С. 313-315. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
6. Mumps in the Czech Republic in 2013: clinical characteristics, mumps virus genotyping and epidemiological links / M. Havlockova [et al.] // Centr. Eur. J. Public. Health. – 2016. – Vol. 24, No. 1. – P. 22-28.
7. Genomic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes / L. Jin [et al.] // Rev. Med. Virol. – 2014. – Vol. 25, No. 2. – P. 85-101.

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF MUMPS INCIBENCE IN THE REPUBLIC OF BELARUS, 2013-2020

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

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

The aim of this study was to analyze the incidence of mumps in the Republic of Belarus for the period 2013-2020 according to the official registration data and using the results of laboratory confirmation of mumps suspected patients. During this period, 36 cases of mumps were reported, the incidence annually was less than 1 case per million populations. Cases were reported in all regions of the Republic of Belarus with the exception of the Grodno region. Of the 36 registered cases, 19 (52.8%) were laboratory confirmed, others were registered on the basis of clinical data. During the analyzed period of time, the etiological diagnosis of mumps was performed in 946 patients with inflammation of the salivary glands, only 29 of them (19 - residents of the Republic of Belarus, 10 – foreign citizens) had the diagnosis confirmed. The low level of confirmation of mumps (3,07%) in patients with inflammation of the salivary glands, sent for research as mumps suspected, makes it necessary to conduct examination for other infections. It is required to expand the use of molecular methods in the diagnosis of mumps and other inflammatory diseases of the salivary glands.

Keywords: mumps, incidence, diagnosis, Belarus.

Поступила 04.12.2020

ОЦЕНКА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ НЕИНВАЗИВНЫМИ ФОРМАМИ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ДЕТЕЙ ТРЕХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

[1]Соколова М.В., [2]Романова О.Н., [3]Ханенко О.Н., [4]Босяков С.М.

[1]Учреждение здравоохранения «Городская детская инфекционная клиническая больница», Минск, Республика Беларусь

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

[3]Учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

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

Резюме. Целью настоящей работы явилось определение средней и медианной продолжительности заболеваний, вызванных неинвазивными формами пневмококковой инфекции, детей трех возрастных групп. Установлено, что наибольшая продолжительность болезни (приблизительно 10,1 суток) наблюдается у детей до 1 года. Среднее значение продолжительности заболевания неинвазивной формой пневмококковой инфекции у детей всех возрастных групп (до 1 года, от 1 года до 3 лет, от 3 лет до 7 лет) составляет приблизительно 9,2 суток. Медианное значение множества продолжительностей заболевания неинвазивными формами пневмококковой инфекции для детей трех рассмотренных возрастных групп и детей всех возрастных групп практически не отличается от соответствующих средних значений.

Ключевые слова: пневмококковая инфекция, компартментная модель, неинвазивная форма, продолжительность заболевания, возрастная группа.

Введение. Математические компартментные (компартментальные) модели являются важным инструментом анализа распространения и борьбы с инфекционными заболеваниями. Такие модели обеспечивают концептуальные результаты, связанные с определением различных пороговых значений, количеств уязвимых и восприимчивых к переносу инфекции людей, количеств несущих инфекцию людей, а также количеств выздоровевших (восстановившихся) людей [1, 2]. Согласно обзору A. Lochen с соавт. [3], посвященному систематизации исследований, связанных с разработкой эпидемиологических моделей и верификацией используемых при этом гипотез и предположений, компартментные модели составляют большинство. Модификации таких моделей позволяют учитывать вакцинацию пациентов, серотипы пневмококковой инфекции, иммунитет пациента, тип используемых антибиотиков и многие другие факторы, влияющие на количество входящих в различные группы пациентов. В частности, в работе K.E. Lamb с соавт. [4] представлена математическая модель динамики распространения заболеваний, вызванных пневмококковой инфекцией, для одного типа последовательности, связанной с двумя серотипами и учитывающая вакцинацию пациентов. Результатом решения соответствующей системы дифференциальных уравнений являются функциональные зависимости количеств восприимчивых к инфекции и инфицированных детей, от времени. Математическая компартментная модель изменения бактериальной популяции пневмококка в легких и в крови мышей, разработанная в исследовании E. Mochan с соавт. [5], учитывает клеточную гибель, вызванную инфекцией, а также активацию и миграцию фагоцитов в инфицированную ткань, а также степень иммунного ответа и скорости внелегочного фагоцитоза. В работе Th. Van Effelterre с соавт. [6] разработана динамическая ком-

партментарная модель переноса пневмококка, учитывающая влияние вакцинации и использования антибиотиков на заболеваемость пневмококковыми инфекциями определенного серотипа в США у детей в возрасте до 2 лет.

В то же время, согласно Ю.Б. Гришуниной с соавт. [7] анализ влияния параметров компартментных моделей на эпидемическую ситуацию усложняется отсутствием точных аналитических решений соответствующих дифференциальных уравнений. Также существенные проблемы представляет собой определение количественных параметров модели, поэтому, как правило, параметры модели предполагаются известными или взяты из различных литературных источников. В частности, данные о продолжительности заболеваний, вызванных пневмококком, коэффициенте, определяющем скорость перехода детей из группы, несущих пневмококковую инфекцию, в группу восприимчивых к пневмококковой инфекции, а также интенсивность выздоровления одного пациента (являющиеся величинами обратными продолжительности болезни) могут существенно отличаться. В работе K.E. Lamb с соавт. [4] продолжительность заболевания пневмококковой инфекцией возрастом до 2 лет (Великобритания) составляет 7,1 недели (49,7 суток) с учетом вакцинации. Использование антибиотиков при этом не учитывается. В исследовании Th. Van Effelterre с соавт. [6] средняя продолжительность инвазивных форм пневмококковой инфекции у детей до 2 лет (США) без применения антибиотиков составляет 75 суток. При применении различных типов антибиотиков продолжительность заболевания составляет от 6 до 42 суток. Эти данные указывают на то, что параметры компарентных моделей могут существенно различаться для различных регионов и специфики протекания заболевания.

Целью настоящей работы является определение средней и медианной продолжительности неинвазивных форм пневмококковой инфекции у детей трех возрастных групп (до 1 года, от 1 года до 3 лет, от 3 до 7 лет) в случае применения антибиотиков в ходе лечения.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена в рамках задания 1.8.01.1 «Разработать математические модели и методы решения новых классов краевых задач механики сплошных сред применительно к актуальным современным проблемам науки и техники» Государственной программы научных исследований «Конвергенция».

База данных о длительности заболеваний неинвазивными формами пневмококковой инфекции 435 детей трех возрастных групп (до 1 года, от 1 года до 3 лет и от 3 до 7 лет), госпитализированных в Городскую детскую инфекционную клиническую больницу г. Минска, подготовлена сотрудниками кафедры эпидемиологии и микробиологии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования». Данные наблюдения охватывают 2016, 2017 и 2018 гг. В качестве неинвазивных форм пневмококковой инфекции рассматривались бронхит, внебольничная пневмония, отит, синусит, ринит, конъюнктивит, ринофарингит, фарингит, назофарингит, фаринготрахеид, риноаденоидит, гастроэнтерит, ринофаринготонзиллит, инофарингоаденоидит, ларинготрахеит, трахеобронхит, риноаденоидит, бронхиолит.

Результаты исследования и их обсуждение. Количество детей для трех возрастных групп и детей всех возрастных групп, перенесших различные формы неинвазивной пневмококковой инфекции, приведено в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, наибольшее количество детей, перенесших неинвазивную форму пневмококковой инфекции в течение 2016-2018 гг., соответствует возрастной группе от 1 года до 3 лет.

Таблица 1. – Количество детей трех возрастных групп, перенесших различные формы неинвазивной пневмококковой инфекции

Возрастная группа	*Год наблюдения*			*За три года*
	2016	*2017*	*2018*	
До 1 года	42	45	47	134
От 1 года до 3 лет	83	92	45	220
От 3 лет до 7 лет	21	39	21	81
Все наблюдаемые дети до 7 лет	146	176	113	435

При лечении детей всех возрастных групп использовались антибиотики. Применялись отдельно антибиотики групп аминопенициллинов и цефалоспоринов, ступенчато антибиотики групп аминопенициллинов и цефалоспоринов, ступенчато групп аминопенициллинов, цефалоспоринов и макролидов, а также ступенчато групп аминопенициллинов, макролидов, ступенчато групп цефалоспоринов, макролидов. В таблице 2 приведены средние значения продолжительности заболевания неинвазивной формой пневмококковой инфекции детей трех различных возрастных групп и детей всех возрастных групп, а также соответствующие среднеквадратичные отклонения.

Таблица 2. – Средняя продолжительность заболевания пневмококковой инфекцией у детей различных возрастных групп и стандартное отклонение от среднего значения (значения приведены в сутках)

Возрастная группа	*Год наблюдения*			*За три года*
	2016	*2017*	*2018*	
До 1 года	8,9±3,9	10,1±5,3	9,4±5,7	9,5±5,0
От 1 года до 3 лет	8,8±5,9	9,8±4,0	8,7±3,4	9,2±4,7
От 3 лет до 7 лет	8,1±7,0	9,7±5,8	6,8±4,5	8,5±4,5
Все наблюдаемые дети до 7 лет	8,6±5,5	9,8±4,8	8,6±4,7	9,2±5,1

Из таблицы 2 видно, что наибольшая продолжительность заболевания неинвазивными формами пневмококковой инфекцией наблюдается у детей до 1 года за все время наблюдений и за отдельные годы наблюдений. Наименьшая продолжительность заболевания – у детей из возрастной группы от 3 до 7 лет. Следует отметить, что среднеквадратичные отклонения для найденных средних значений достаточно велики, что указывает на большой разброс значений от средней величины.

Рассматриваемые множества продолжительностей заболевания неинвазивными формами пневмококковой инфекции, помимо среднего, также могут характеризоваться медианным значением. В таблице 3 сформулированы медианные значения продолжительности заболевания неинвазивными формами пневмококковой инфекции для детей трех возрастных групп и детей всех возрастов.

Таблица 3. – Медианная продолжительность заболевания пневмококковой инфекцией у детей различных возрастных групп (значения приведены в сутках)

Возрастная группа	*Год наблюдения*			*За три года*
	2016	*2017*	*2018*	
До 1 года	9	10	9	9
От 1 года до 3 лет	9	10	9	9
От 3 лет до 7 лет	8	11	7	8
Все наблюдаемые дети до 7 лет	9	10	9	9

Из таблиц 2 и 3 видно, что соответствующие медианные и средние значения множества продолжительностей заболевания неинвазивными формами пневмококковой инфекции для детей до 1 года, от 1 года до 3 лет, от 3 лет до 7 лет, а таже детей всех возрастных групп (до 7 лет) практически совпадают. Наибольшее отличие между ними соответствующими медианными и средними значениями продолжительности заболевания составляет приблизительно 4,4%.

Заключение. На основании базы данных о детях до 7 лет, перенесших заболевание неинвазивной формой пневмококковой инфекцией с использованием антибиотиков, установлено, что наибольшая продолжительность болезни (приблизительно 10,1 суток) наблюдается у детей до 1 года. Среднее значение продолжительности заболевания неинвазивной формой пневмококковой инфекции у детей всех возрастных групп (до 1 года, от 1 года до 3 лет, от 3 лет до 7 лет) составляет приблизительно 9,2 суток. Установленные значения средней продолжительности заболевания пневмококковой инфекцией соответствуют данным работы Th. Van Effelterre с соавт. [6], согласно которой значение средней продолжительности заболевания инвазивной формой пневмококковой инфекцией детей до 2 лет, которое сопровождалось использованием различных групп антибиотиков (цефалоспорины и другие антибиотики), составляет 6 суток. Также найденные значения соответствуют средней продолжительности ОРВИ, приведенной в работе Ю.Б. Гришуниной с соавт. [7], и равной 10 суткам.

Среднеквадратичное отклонение от средних продолжительностей заболевания неинвазивной формой пневмококковой инфекции для детей трех возрастных групп, детей всех возрастных групп принимает достаточно большое значение (до ±7 суток), что указывает на достаточно больший разброс значений средней величины множества продолжительностей сроков заболевания.

Медианное значение множества продолжительностей заболевания неинвазивными формами пневмококковой инфекции для детей трех рассмотренных возрастных групп и детей всех возрастных групп практически не отличается от соответствующих средних значений. Наибольшее отличие между соответствующими медианными и средними значениями продолжительности заболевания составляет приблизительно 4,4%.

Найденные значения средней продолжительности заболевания неинвазивными формами пневмококковой инфекцией и коэффициента, определяющего скорость перехода детей из группы, несущих пневмококковую инфекцию, в группу восприимчивых к пневмококковой инфекции, могут быть использованы для анализа компартментных математических эпидемиологических моделей и численного решения соответствующих дифференциальных уравнений.

На основании средней продолжительности заболевания можно определить значения коэффициента, определяющего скорость перехода детей из группы, несущих пневмококковую инфекцию, в группу восприимчивых к пневмококковой инфекции [4] и интенсивность выздоровления одного больного [7] как величины обратные продолжительности заболевания.

Литература

1. Hethcote, H.W. The Mathematics of infectious diseases / H.W. Hethcote // SIAM Review. – 2000. – Vol. 42, No. 4. – P. 599-653.

2. Beckley, R. Modeling epidemics with differential equations [Electronic resource] / R. Beckley // Tenessee State University. – Nashville, 2013. – Mode of access: http://www.tnstate.edu/mathematics/mathreu/filesreu/GroupProjectSIR.pdf. – Date of access: 14.10.2020

3. Lochen, A. Dynamic transmission models and economic evaluations of pneumococcal conjugate vaccines: a quality appraisal and limitations / A. Lochen, R.M. Anderson // Clin. Microbiol. Infect. – 2019. – Vol. 26, No. 1. – P. 60-70. doi: 10.1016/j.cmi.2019.04.026.

4. Lamb, K.E. A simple mathematical model for genetic effects in pneumococcal carriage and transmission / K.E. Lamb, D. Greenhalgh, Ch. Robertson // J. Computational and Applied Mathematics. – 2011. – Vol. 235. – P. 1812-1818.
5. A mathematical model of intrahost pneumococcal pneumonia infection dynamics in murine strains / E. Mochan [et al.] // J. Theor. Biol. – 2014. – Vol. 353. – P. 44-54.
6. A dynamic model of pneumococcal infection in the United States: Implications for prevention through vaccination / Th. Van Effelterre [et al.] // Vaccine. – 2010. – Vol. 28, No. 21. – P. 3650-3660.
7. Моделирование эпидемической ситуации с учетом внешних рисков / Ю.Б. Гришунина [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 5. – С. 61-66.

ASSESSMENT OF THE DURATION OF PNEUMOCOCCAL INFECTION WITH NON-INVASIVE FORMS IN CHILDREN OF THREE AGE GROUPS

[1]Sokolova M.V., [2]Romanova O.N., [3]Hanenko O.N., [4]Bosiakov S.M.

[1]Urban Children's Infectious Disease Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus
[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[3]Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Republic of Belarus
[4]Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

The aim of this study is to determine the average and median duration of diseases caused by non-invasive forms of pneumococcal infection in children of three age groups. The longest duration of the disease (approximately 10.1 days) is observed in children under 1 year of age. The average value of the disease duration of non-invasive form pneumococcal infection in children of all age groups (up to 1 year, from 1 to 3 years, from 3 to 7 years) is approximately 9.2 days. The median value of the set of disease durations with non-invasive forms of pneumococcal infection for children of the three age groups and children of all age groups practically does not differ from the corresponding mean values. On the basis of the average duration of the disease can be evaluate the values of the coefficient determining the rate of transition from the group of susceptible people to the group of infectious people, as well as the rate of recovery of one patient.

Keywords: pneumococcal infection, compartmental model, non-invasive form, duration of the disease, children age group.

Поступила 14.10.2020

ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ МОНИТОРИНГА ЧИСТОТЫ И САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ НА ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВАХ

Тонко О.В., Коломиец Н.Д., Ханенко О.Н.

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

Резюме. В ходе проведения исследований объектов окружающей среды пищевых производств экспресс-методами (АТФ люминесценция) установлено, что для определения уровня чистоты поверхности окружающей среды пищевых производств необходимо провести корреляционный анализ сравнения значений АТФ-люминометра (RLU) с полученным количеством микроорганизмов на чашках с питательной средой (КОЕ/мл), что позволит разработать рекомендации по оценке значений АТФ-люминометра во время проведения работ на пищевом предприятии с целью проведения мероприятий по выявлению и устранению причины загрязнения поверхности. Кроме того, установлено, что для применения этого метода для мониторинга гигиены, предельные значения АТФ должны быть определены для конкретного пищевого производства.

Ключевые слова: экспресс-методы, смывы, микробиота, АТФ, пищевые производства.

Введение. Согласно Всемирной организации здравоохранения существует четкая взаимосвязь между большим бременем болезней пищевого происхождения и низким уровнем безопасности пищевой промышленности. Определение риска для здоровья населения, связанного с биологическими опасностями в пищевых продуктах, позволяет сравнивать эффективность различных мер по снижению риска и, более точно, разных операционных условий, прогнозируя их влияние на конечный продукт. Чтобы минимизировать или управлять риском безопасности пищевых продуктов, необходимо разрабатывать и внедрять стандарты безопасности и качества пищевых продуктов, а также системы обеспечения качества в пищевой промышленности для производства безопасных пищевых продуктов [1].

Применение анализа рисков сместило акцент с тестирования готовой продукции на более проактивные подходы, такие как использование контрольных точек с критическими научными пределами для последовательного снижения риска. В связи с этим возросло использование мониторинга окружающей среды в качестве средства надзора за чистотой и безопасностью. Не каждое предприятие по производству пищевых продуктов может иметь свои программы мониторинга окружающей среды. Большое количество испытаний не обязательно означает высокий уровень безопасности. Скорее, разумное использование ресурсов по безопасности пищевых продуктов требует вмешательства и проверки, которые должны быть направлены на наиболее подходящие области, представляющие опасность, и требующие наибольшего снижения риска. Тщательная оценка риска по безопасности пищевых продуктов должна быть проведена чтобы определить нужен ли мониторинг окружающей среды, какой организм или индикаторную группу контролировать, и степень строгости мониторинга окружающей среды [2].

Многие новые быстрые и автоматизированные методы для микробиологического тестирования среды пищевого предприятия коммерчески доступны, и регулярно внедряются новые методы. Однако их принятие зависит от нескольких факторов, в том числе от скорости (время до результата), специфичности, селективности, точности и воспроизводимости. Другие критерии, которые следует учитывать, это простота использования, стоимость, реагенты, расходные материалы, необходимость в обучении, доступность

технической поддержки и принятие нормативных документов. Выбор методов/инструментов зависит от типа учреждения, типа пищевых продуктов, циркулирующих микроорганизмов и т.д. Общие системы для отбора проб, которые можно использовать для оценки санитарно-эпидемиологического состояния объекта, включают стерильные тампоны, губки, пробоотборники воздуха, наборы для анализа биолюминесценции АТФ, наборы для молекулярно-генетического исследования и другое [3].

Многие пищевые предприятия, внедрившие мониторинг гигиены окружающей среды с помощью классических микробиологических методов, являющимися сложными, трудоемкими и дорогостоящими, рассматривают возможности применения экспресс-методов, в частности системы биолюминесценции АТФ для контроля гигиены.

Микробиологические тесты, предназначенные для обнаружения и/или подсчета индикаторных или патогенных микроорганизмов с объектов окружающей среды с использованием тампонов или губок, используются для количественной проверки эффективности санитарных процедур. Эти тесты, однако, могут занять несколько дней, чтобы получить результаты. Высокая чувствительность молекулярно-генетических методов, требует в своем выполнении дорогостоящего лабораторного оборудования, питательных сред, реагентов и материалов. В большинстве случаев такие методы малодоступны для массового применения в санитарно-микробиологической практике. В связи с вышеперечисленными обстоятельствами для выполнения оперативного санитарно-микробиологического контроля безопасности пищевых продуктов и мониторинга гигиенического состояния поверхностей технологического оборудования необходимы экспресс-методы микробиологического анализа. В настоящее время в практику работы микробиологических лабораторий внедрен ряд горизонтальных методов отбора проб с поверхности с использованием контактных чашек и тампонов на аппликаторах, а также косвенные методы, такие как тестирование аденозинтрифосфата, которые являются популярным вариантом гигиенического мониторинга и проверки чистоты и санитарии [3-5].

Однако, предлагаемые экспресс-методы количественно неточны, поэтому обоснованную научную новизну имеет разработка методик, позволяющих проводить оценку санитарно-эпидемиологического состояния объектов технологической среды пищевых производств.

Цель работы – провести исследование объектов окружающей среды пищевых производств экспресс-методами и оценить возможность их использования для прогнозирования санитарно-эпидемиологического состояния окружающей среды пищевых производств.

Материалы и методы исследования. Материалами исследования являлись смывы, отобранные с объектов окружающей среды пищевых производств, для выявления зон и точек постоянного мониторинга и надзора за санитарно-эпидемиологическим состоянием объекта.

Взятие смывов производили с помощью стерильных коммерческих ватных тампонов. Перед взятием смыва тампон погружали в стерильный раствор (0,1% пептонная вода, физиологический раствор, при необходимости – нейтрализатор). Смывы с крупного оборудования и инвентаря отбирали с поверхности от 100 см^2 до 1000-3000 см^2. Смоченным ватным тампоном отбирали смыв во взаимно перпендикулярных направлениях. При взятии смывов с мелкого инвентаря обтирали всю внутреннюю поверхность предмета. Отбор проб производился со столов, разделочных досок, стеллажей, транспортеров, поддонов, кранов, моек, стоков, стен и других поверхностей. После взятия смыва тампон вновь погружали в пробирку со стерильной жидкостью, встряхивали и транспортировали в термоконтейнерах с охлаждаемыми вкладышами в течении 2 ч.

Тампон тщательно отмывали, после чего 1,0 мл смывной жидкости помещали в чашку Петри и заливали расплавленным мясо-пептонным агаром (МПА). Чашки помещали в термостат при 30°С. Предварительный подсчет выросших колоний проводили через 24 ч, окончательный – через 48-72 ч. Подсчитывали количество колоний, выросших на чашке, умножали на 10 для определения общего количества бактерий, содержащихся на поверхности исследуемого предмета.

Для ускоренного определения микробной обсемененности использовали подложки Aerobic Count Plate для подсчета мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. Помещали подложки на ровную поверхность, поднимали верхнюю пленку и вносили 1 мл образца на поверхность питательной подложки в центр. Опускали верхнюю пленку на образец и помещали пластиковый распределитель в центр выемкой вниз для распределения образца. Инкубировали подложки в горизонтальном положении прозрачной стороной вверх в течение 24-48 ч при 30°С. Подсчитывали количество красных колоний, независимо от их размера и интенсивности окраски, умножали на 10 для определения общего количества бактерий, содержащихся на поверхности исследуемого предмета.

После инкубации у всех выделенных штаммов проверяли морфологические и тинкториальные свойства (окраска по Граму). Дополнительно проводили идентификацию выросших колоний микроорганизмов с использованием автоматического бактериологического анализатора VITEK 2 COMPACT (Biomerieux).

Статистическая обработка цифрового материала с целью определения корреляционной взаимосвязи проводилась с использованием программы EPI INFO.

Результаты исследования и их обсуждение. В качестве экспресс-тестов использовали оценку микробного статуса среды технологического окружения пищевых производств методом АТФ-биолюминесценции при помощи тестов АТФ UltraSnap для твердой поверхности, предназначенного для использования с люминометром компании Hygiena. Данный тест и люминометр составляют систему, используемую для контроля санитарно-эпидемиологического состояния технологического оборудования и других объектов в различных отраслях. Принцип работы системы основан на измерении аденозинтрифосфата (АТФ) – универсальной энергетической молекулы, встречающейся в клетках животных, растений, бактерий, дрожжевых и плесневых грибков. Остатки продуктов органического происхождения, оставшиеся на поверхности, так же содержат АТФ. Правильная очистка поверхности значительно сокращает количество источников АТФ. При взятии пробы, когда АТФ вступает во взаимодействие с уникальным жидким реагентом люцифераза/люциферин, который содержится в тесте UltraSnap, испускается свет, количественно прямо пропорциональный количеству АТФ в пробе.

Люминометр измеряет интенсивность испускаемого света и представляет результаты в относительных световых единицах (RLU). Результат RLU предоставляет информацию об уровне загрязнения за несколько секунд. Чем выше значение RLU, тем выше количество АТФ и, соответственно, выше уровень загрязнения поверхности. Тест UltraSnap предназначен для выявления остатков загрязнения и определения их количества. Чрезмерное органическое загрязнение тампона остаточными веществами в результате забора пробы с явно грязной поверхности затормозит биолюминесцентную реакцию и даст недостоверные результаты.

В данном исследовании проведена оценка возможностей использования АТФ-биолюминесцентного анализа как ускоренного метода выявления загрязнения окружающей среды в сравнении с традиционным микробиологическим методом культивирования на средах, приготовленных в лаборатории и подложках Aerobic Count Plate для подсчета мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

В ходе проведения научно-исследовательской работы разработан алгоритм применения АТФ-люминесценции для мониторинга чистоты объектов окружающей среды пищевых производств. Перед началом взятия смыва тест-тампоны, хранящиеся в холодильнике, выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре чтобы сравнялась температура тест-тампона UltraSnap с комнатной температурой (21-25°С). Допустимо наличие конденсата внутри пробирки. Тампон UltraSnap предувлажнен, но чтобы собрать максимальное количество остаточного вещества с сухих поверхностей рекомендуется предварительно увлажнить тампон в стерильной дистиллированной воде или стерильном изотоническом растворе (раствор NaCl концентрации 0,9%). Производим отбор проб с исследуемой поверхности определённой площади – от 100 см^2 до 3000 см^2 тампоном, тщательно проводя тампоном вдоль и поперек, вертикально и горизонтально, а также по диагонали плоской поверхности, вращая, надавливая с такой силой, чтобы стержень тампона изогнулся, охватив всю площадь. При отборе пробы необходимо помнить, что нельзя прикасаться к тампону и внутренней поверхности теста. Намочив тампон жидкостью из верхней ампулы, встряхиваем тампон в течении 5-10 с, удерживая люминометр в вертикальном положении, помещаем тест UltraSnap в люминометр Hygiena. Закрываем крышку люминометра и нажимаем OK, чтобы начать измерение. Внутренняя калибровка прибора выполняется автоматически, после чего через 15 с на цифровом индикаторе прибора высвечивается результат, выраженный в относительных световых единицах (RLU). Согласно литературным источникам и рекомендациям производителя Hygiena, чем выше уровень значения RLU, тем грязнее исследуемая поверхность и выше микробная контаминация объекта.

Подложки Aerobic Count Plate содержат готовую питательную среду, гель, растворимый в холодной воде, который застывает при комнатной температуре и тетразолиевый индикатор, который облегчает подсчет колоний. Подложки Aerobic Count Plate используются для подсчета мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов КМАФАнМ в образцах из смывов с целью мониторинга окружающей среды.

В рамках микробиологического мониторинга проведено исследование микробиоты среды технологического окружения на предприятии по переработке рыбы. Выделены штаммы *Enterobacter cloacae, Providencia rustigiani, Enterococcus caseliflavus, Citrobacter vercomanii, Citrobacter braakii, Citrobacter freundii, Lelliotia amnigena Stapylococcus saprophyticus, Staphylococcus worneri, Staphylococcus hominis, Aeromonas hidrophila, Bacillus spp., Pantoca spp., Listeria monocytogenes, Serratia fonticola, Hafnia alvei и др.*

С целью изучения чистоты и санитарно-эпидемиологического состояния поверхностей проведены исследования смывов с технологического оборудования, рук персонала и спецодежды. Для разработки методики определения уровней оценки чистоты поверхностей окружающей среды пищевых производств проведено сравнение значений АТФ-люминометра (RLU) с полученными значениями числа микроорганизмов при культивировании посевов смывов на чашках Петри с питательной средой МПА, приготовленной в лаборатории и на готовых коммерческих подложках Aerobic Count Plate (КОЕ/мл). Измерения АТФ производили несколько раз, записывая средний результат (таблица).

Согласно литературным источникам и рекомендациям производителя Hygiena, чем выше уровень значения RLU, тем грязнее исследуемая поверхность. За критерии оценки несоответствия нормам гигиены и чистоты поверхностей производитель теста предлагает считать уровень значения RLU более 30.

Таблица. – Результаты исследования объектов среды технологического окружения пищевого предприятия

№ п/п	*Наименование объекта*	*АТФ, RLU*	*Общее микробное число (КОЕ/мл)*	
			Чашки Петри	*Подложки Aerobic Count Plate*
1	Стол для разделки рыбы	7485	$3,2\times10^6$	$\geq10^7$
2	Моечная машина для рыбы (щетка)	9592	$1,0\times10^7$	$\geq10^7$
3	Тушка рыбы после мойки	8701	$2,6\times10^3$	8
4	Разделочная доска	676	$1,0\times10^6$	$\geq10^7$
5	Филе рыбы готовое к заморозке	234	$1,0\times10^6$	4×10^2
6	Порционер до работы (нож)	1518	$4,3\times10^3$	$3,6\times10^2$
7	Порционер до работы (лента)	1105	$1,0\times10^6$	$\geq10^7$
10	Тележка для рыбы (до работы)	394	$1,0\times10^6$	2×10^2
11	Ведро для хранения соленой рыбы	15	100	2×10^2
15	Стеллаж для дефростации рыбы (в работе)	1347	$1,0\times10^7$	$\geq10^7$
18	Фартук в процессе работы (на этапе обесшкуривания рыбы)	2329	$3,5\times10^3$	2×10^2
19	Соленая рыба (цех готовой продукции)	5	$2,0\times10^2$	$1,4\times10^2$
20	Решетка для посола (в работе)	33	$1,0\times10^2$	$3,4\times10^2$
23	Фартук, нарукавники, перчатки (цех готовой продукции)	32	$1,0\times10^2$	$2,6\times10^2$

В ходе наших исследований только 2 точки отбора смывов показали уровень значения RLU меньше 30, что предлагается оценить как удовлетворительный результат. Основное число проб имели значения АТФ-люминесценции в несколько раз превышающие предлагаемые критерии в 30 RLU.

Для определения уровня микробной контаминации поверхностей окружающей среды проведен корреляционный анализ сравнения значений АТФ-люминометра (RLU) с полученным количеством микроорганизмов на чашках с питательной средой и подложках Aerobic Count Plate (КОЕ/мл) (рисунок).

Установлена положительная корреляционная связь (R=0,3041), которая подтверждает, что увеличение значений одной переменной ведет к закономерному увеличению другой переменной, т.е. установлена взаимосвязь типа увеличение-увеличение. Однако, необходимо отметить, что зависимость между уровнем АТФ и общим микробным числом начинает наблюдаться только при высоком уровне микробной обсемененности.

Таким образом, на основании только значений АТФ-люминометрии не представляется возможным оценить уровень микробиологической контаминации поверхностей и прогнозировать санитарно-эпидемиологическое состояние пищевого производства.

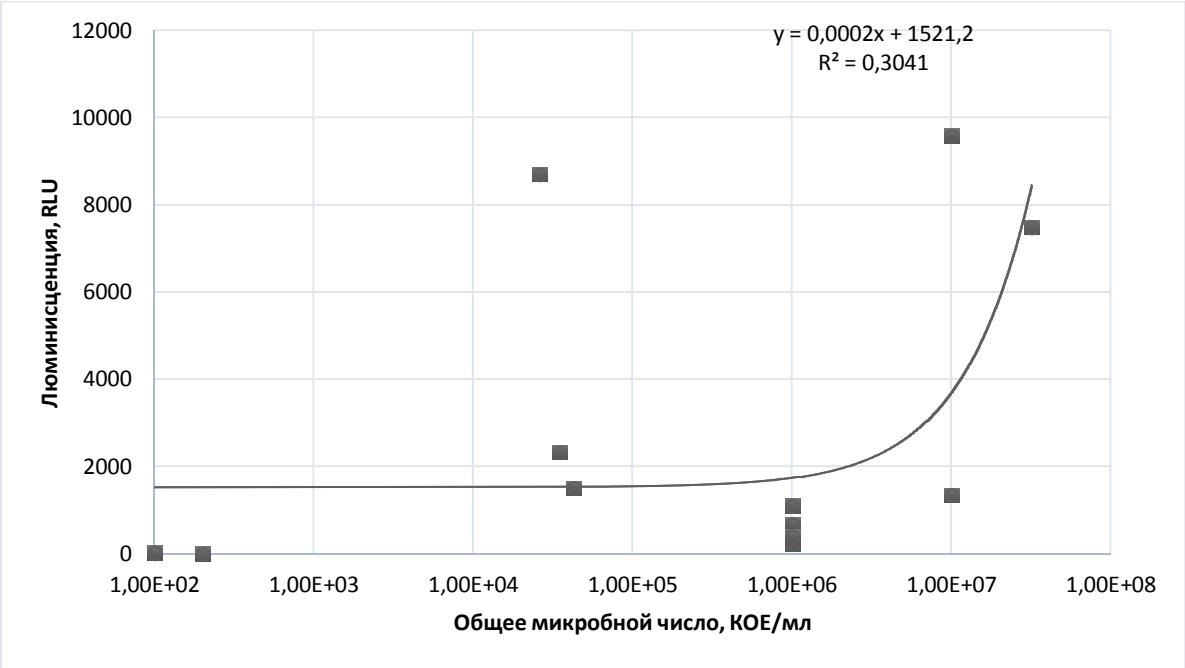


Рисунок. – График корреляции АТФ-люминесценции и числа микроорганизмов на поверхностях среды технологического окружения пищевого предприятия

Заключение. При оценке санитарно-эпидемиологического состояния объектов на пищевом производстве разработан алгоритм применения прибора проверки очистки, предназначенного для выявления и измерения аденозинтрифосфата (АТФ). Установлено, что использование этого метода для мониторинга контаминации объектов окружающей среды во время проведения работ на пищевом предприятии, предельные значения АТФ должны быть определены для конкретного пищевого производства на основе выделения и изучения микробиоты при культивировании посевов смывов на средах, приготовленных в лаборатории или с использованием готовых коммерческих подложек. Оценка санитарно-эпидемиологического состояния позволит разработать рекомендации по проведению мероприятий для выявления и устранения причин загрязнения поверхностей среды технологического окружения.

Литература

1. Freier, T. Components in a Pathogen Environmental Monitoring Program / T. Freier, J. Shebuski // Food Quality & Safety's Mission [Electronic resource]. – 2014. – Mode of access: https://www.foodqualityandsafety.com/article/components-for-an-effective-pathogen-environmental-monitoring-program/. – Date of access: 08.10.2020.

2. Channaiah, L. Improving Environmental Controls Lakshmikantha / L. Channaiah // Food Quality & Safety's Mission [Electronic resource]. – 2015. – Mode of access: https://www.foodqualityandsafety.com/article/improving-environmental-controls/. – Date of access: 08.10.2020.

3. Next generation of microbiological risk assessment: Potential of omics data for exposure assessment // H.M.W. den Bestena [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2018. – Vol. 287. – P. 18-27. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.006.

4. Deibel, V. Examining the Differences Between Pathogen Control Programs and Hygiene Monitoring / V. Deibel, L. Post // Food Quality & Safety's Mission [Electronic resource]. – 2019. – Mode of access: https://www.foodqualityandsafety.com/article/examining-the-differences-between-pathogen-control-programs-and-hygiene-monitoring/. – Date of access: 08.10.2020.

5. Vasavada, P.C. Using ATP Testing to Verify Cleaning and Sanitation / P.C. Vasavada. // Food Quality & Safety's Mission [Electronic resource]. – 2015. – Mode of access: https://www.foodqualityandsafety.com/article/using-atp-testing-to-verify-cleaning-and-sanitation/. – Date of access: 08.10.2020.

EXPRESS METHODS FOR MONITORING CLEANLINESS AND SANITARY-EPIDEMIOLOGICAL STATE IN THE FOOD PRODUCTION

Tonko O.V., Kolomiets N.D., Hanenko O.N.

Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Republic of Belarus

It was found that in order to determine the level of cleanliness of the surfaces of the environment of food production, it is necessary to carry out a correlation analysis of comparing the values of the ATP luminometer (RLU) with the obtained number of microorganisms on plates with a nutrient medium (CFU/ml). This is necessary to develop recommendations for assessing the values of the ATP luminometer during work at a food enterprise in order to identify and eliminate the causes of surface contamination. It has been found that in order to use this method for hygiene monitoring, ATP limit values must be determined for each food production.

Keywords: express methods, washings, microbiota, ATP, food production.

Поступила 12.10.2020

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ СЛЕЖЕНИЕ ЗА БЕШЕНСТВОМ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Ханенко О.Н., Коломиец Н.Д., Тонко О.В.

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

Резюме. В Республике Беларусь с 2013 по 2018 гг. при отсутствии случаев заболевания бешенством среди населения частота обращения населения за антирабической медицинской помощью (АРМП) оставалась стабильно высокой, составив от 209,6$^0/_{0000}$ до 227,2$^0/_{0000}$ в разные годы наблюдения. Сохраняющуюся актуальность проблемы рабической инфекции в Республике Беларусь определяют активность эпизоотического процесса, события с контактами населения, в том числе массовыми, с больными бешенством животными. При этом, ежегодная обращаемость населения за АРМП вследствие контакта с больными бешенством животными в 2018 г. увеличилась в 1,3 раза ($P \leq 0,001$) по сравнению с 2017 г. Функционирующая в Республике Беларусь система эпидемиологического слежения за бешенством основывается на тесном взаимодействии систем эпидемиологического слежения и эпизоотологического мониторинга за рабической инфекцией.

Ключевые слова: бешенство, эпидемиологическое слежение, укусы животными, обращаемость населения за антирабической медицинской помощью, взаимодействие специалистов, Беларусь.

Введение. Бешенство по-прежнему признано одним из самых опасных для человека инфекционных заболеваний зоонозной природы, которое, по оценкам, вызывает 59 000 смертных случаев и более 3,7 миллионов потери лет жизни, скорректированных на нетрудоспособность (DALY) ежегодно. Большинство случаев наблюдается в Африке и Азии, при этом приблизительно 40% случаев регистрируется среди детей в возрасте до 15 лет [1].

В Республике Беларусь, несмотря на отсутствие заболевших бешенством людей в стране с 2013 г., что, несомненно, является результатом комплексного подхода в решении проблем по профилактике бешенства среди людей и животных, риски в реализации эпидемического потенциала проблемы рабической инфекции, к сожалению, по-прежнему вероятны.

Целью настоящей работы является установление эпидемиологических особенностей рабической инфекции в Республике Беларусь на современном этапе, а также систематизация подходов по профессиональному взаимодействию специалистов при осуществлении эпидемиологического слежения за бешенством в решении вопросов его профилактики.

Материалы и методы исследования. Основу методологии составил ретроспективный эпидемиологический анализ обращаемости населения Республики Беларусь за антирабической медицинской помощью (АРМП) с 2013 по 2018 гг. Изучение современных эпидемиологических и эпизоотологических особенностей рабической инфекции осуществлялось на основании сведений, включенных в ежегодные бюллетени «Эпидемическая и эпизоотическая ситуация по бешенству в Республике Беларусь» Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья. 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 (p) со статистическими ошибками (Sp) и 95% доверительными интервалами (ДИ). Различия между сравниваемыми относительными величинами определяли по значению t-критерия Стьюдента и

уровню значимости (Р), сравнивая его с критической величиной для соответствующего объёма выборки, а также по значениям 95%ДИ.

Обобщение и систематизация подходов по осуществлению эпидемиологического слежения за бешенством и профессиональному взаимодействию специалистов в решении вопросов его профилактики основано на анализе национальных, межгосударственных и международных рекомендаций по описываемой проблеме.

Результаты исследования и их обсуждение. В Республике Беларусь с 2013 по 2018 гг. при отсутствии случаев заболевания бешенством среди населения за оказанием АРМП обратились 124 658 человек. При этом обращаемость населения страны за АРМП оставалась стабильно высокой, составив в разные годы наблюдения от 209,6$^{0}/_{0000}$ до 227,2$^{0}/_{0000}$ (рисунок).

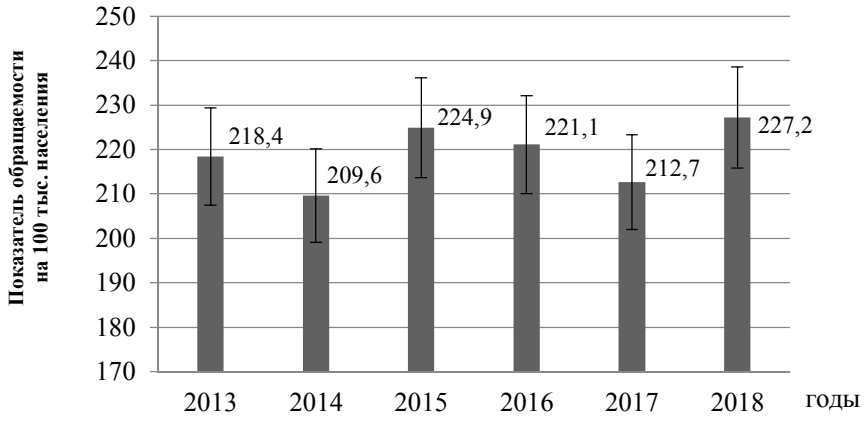


Рисунок. – Частота обращений за антирабической медицинской помощью населения Республики Беларусь в 2013-2018 гг.

У 3 392 или 2,7% (ДИ 2,5-2,9) из 124 658 пациентов повреждения были нанесены животными с лабораторно подтвержденной инфекцией. Ежегодная частота обращений населения Республики Беларусь за АРМП в связи с повреждениями, нанесенными животными с установленным бешенством, не была стабильной и составила: в 2013 г. – 5,7$^{0}/_{0000}$ (ДИ 5,3-6,1); в 2014 г. – 4,4$^{0}/_{0000}$ (ДИ 4,8-4,0), что в 1,3 раза ниже значения предыдущего года (Р≤0,001); в 2015 г. – 7,1$^{0}/_{0000}$ (ДИ 6,5-6,7), превышая значение 2013 г. в 1,3 раза (Р≤0,001) и показатель 2014 г. в 1,6 раз (Р≤0,001); в 2016 г. – 6,6$^{0}/_{0000}$ (ДИ 6,0-7,2), т.е. достоверно не изменилась по отношению к предшествующему году (Р≥0,05) и была выше значений 2013 и 2014 гг. в 1,2 раза (Р≤0,02) и 1,5 раза (Р≤0,001) соответственно. В 2018 г. по сравнению с 2017 г. обращаемость населения за АРМП вследствие контакта с больным бешенством животными в целом по стране увеличилась в 1,3 раза (Р≤0,001) и составила 6,9$^{0}/_{0000}$ (ДИ 6,3-7,5).

В целом на долю лиц с повреждениями, нанесенными домашними животными с установленным бешенством и имеющих владельцев, за весь период наблюдения пришлось 1 489 или 43,9% (ДИ 42,1-45,7) из 3 392 пациентов. При этом доля пострадавших от укусов больных бешенством домашних собак составила 925 или 27,3% (ДИ 25,7-28,9) и домашних кошек – 564 или 16,6% (ДИ 15,4-17,8).

На актуальность проблемы рабической инфекции указывают также факты продолжающей регистрации случаев массовых контактов людей с больными бешенством животными (с числом пострадавших на 1 случай – 5 и более человек), в результате которых

за шесть лет в стране пострадало 1 029 человек, из них 137 или 13,3% (ДИ 11,1-15,5) детей.

Проблема бешенства многогранна и ее решение требует комплексного подхода. Основой эпидемиологического слежения за бешенством является признание зависимого характера эпидемического процесса при данной инфекции от эпизоотического, поскольку эпидемический процесс при гидрофобии представляет собой процесс вовлечения человека в цепь заболеваний животных.

В Республике Беларусь длительное время (с 2013 г.) не наблюдается случаев бешенства среди населения. Вместе с тем на территории страны по-прежнему сохраняются очаги бешенства в природе и напряженная эпизоотическая ситуация. Так за период наблюдения с 2013 по 2018 гг. в выявленных неблагополучных по бешенству пунктах заболело и пало 3 034 диких, домашних и сельскохозяйственных животных. В 2013 г. зарегистрировано 453 случая, в 2014 г. – 354, а начиная с 2015 г. эпизоотическая ситуация стала ухудшаться. В 2015 г. бешенство лабораторно подтверждено уже у 582 животных, в 2016 г. – у 541, в 2017 г. – у 484, и в 2018 г. – у 620 животных.

В Республике Беларусь в эпизоотическую цепь рабической инфекции вовлечены почти все виды животных, обитающих на территории страны. Однако в силу разной значимости и численного различия вовлеченных животных, конкуренции пищевых цепей и многих других факторов заболеваемость их бешенством различна. За период с 2013 по 2018 гг. из 3 034 животных с установленным бешенством, дикие составили 1 897, или 62,5% (ДИ 60,7-64,3), тогда как домашние животные (собаки и кошки, включая безнадзорных) – 740, или 24,4% (ДИ 22,8-26,0), сельскохозяйственные животные – 397, или 13,1% (ДИ 14,3-11,9). Основным доминирующим видом животных в структуре заболеваемости бешенством, по-прежнему, является лисица.

Эффективность борьбы с бешенством во многом зависит от того насколько связаны системы надзора за болезнями человека и животных.

Эпизоотологические и эпидемиологические проявления бешенства должны своевременно улавливаться системами надзора за болезнями человека и животных, распознаваться еще на уровне изучения риска и учитываться при разработке профилактических мероприятий.

В соответствии с принятыми на национальном уровне подходами по взаимодействию систем эпидемиологического слежения и эпизоотологического мониторинга за бешенством [2], на этапах оперативного реагирования и информационного обеспечения функционирования системы эпидемиологического слежения врачи-эпидемиологи территориальных ЦГЭ обеспечивают:

1. направление в адрес главного государственного ветеринарного инспектора соответствующей административно-территориальной единицы информации:

об известном животном, с которым произошел контакт, с целью установления за ним ветеринарного наблюдения (по телефону – немедленно, письменно – в течение 24 часов после получения экстренного извещения);

о случае заболевания бешенством или подозрении на заболевание бешенством среди населения направление по телефону – немедленно (письменно – в течение 24 часов после окончания эпидемиологического обследования очага бешенства);

2. регистрацию информации, поступившей из ветеринарного учреждения:

о результатах лабораторного исследования животного на бешенство или 10-дневного ветеринарного наблюдения за животным по случаю контакта с больным бешенством или подозрительным на бешенство животным. Дальнейшая передача информации (по телефону – немедленно, копию письменного ветеринарного заключения – в течение 24 часов после получения соответствующей информации из ветеринарного учреждения)

осуществляется в адрес организации здравоохранения, в которой проводится оказание антирабической помощи лицу, подвергшемуся риску заражения вирусом бешенства;

о лабораторно подтвержденном или клиническом случае бешенства у животного.

При установлении осложнения эпизоотологической обстановки оперативное реагирование на ситуацию с проведением комплексного обследования очага с участием врача-эпидемиолога и специалистов ветеринарной службы, позволяет активно выявить случаи контакта с больным бешенством животным и оперативно направить лиц, подвергшихся риску заражения вирусом бешенства, в организации здравоохранения с целью оказания им необходимой антирабической помощи.

Специалисты территориальных ЦГЭ обеспечивают:

участие в проведении обследования эпизоотического очага бешенства в течение 24 часов после поступления информации о выявлении случая бешенства у животного и разработку оперативного плана мероприятий по его локализации и ликвидации, а также недопущению заболевания бешенством людей;

участие в проведении подворных (поквартирных) обходов населенного пункта, где был зарегистрирован случай бешенства у животного либо контакт с больным или подозрительным на бешенство животным.

В рамках углубленного эпидемиологического слежения врачи-эпидемиологи организовывают сбор дополнительной информации:

ежемесячно: о количестве отловленных безнадзорных собак и кошек количестве лабораторно подтвержденных и клинических случаев бешенства среди животных и их распределение по территории;

2 раза в год: о численности учтенных домашних животных (собак, кошек) и количестве привитых против бешенства домашних животных;

ежегодно: о численности диких плотоядных животных, размерах территории обитания этих видов животных на момент учета их численности, количестве добытых в течение года животных, площадях охотничьих угодий, охваченных приманками для оральной иммунизации.

На основании углубленного анализа эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по бешенству на подконтрольной территории определяется прогноз ее развития на предстоящий период; осуществляется информирование заинтересованных, в том числе специалистов ветеринарного надзора, местных исполнительных и распорядительных органов власти с целью планирования и проведения соответствующих комплексных противоэпизоотических и санитарно-противоэпидемических мероприятий; разрабатываются соответствующие управленческие решения.

Учитывая наличие внешних эпизоотических рисков, борьба с рабической инфекцией в отдельно взятой стране невозможна без усилий на уровне межгосударственного взаимодействия.

Для снижения риска угрозы жизни человека через обеспечение благополучия по бешенству животных каждого государства-участника СНГ является реализация принятого 1 июня 2018 г. Советом глав правительств Содружества Независимых Государств «Решения о Комплексе совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года» [3].

Всемирная организация здравоохранения и ее партнеры – Всемирная организация здравоохранения животных в сотрудничестве с Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Организации Объединенных Наций и Глобальным альянсом по борьбе против бешенства поддерживают цель «Ноль смертельным исходам от бешенства человека, распространяемого собаками, к 2030 году» (Ноль к 30) [4]. Это соответствует цели 3 Целей устойчивого развития, ликвидации эпидемий инфекционных болезней, включая забытые тропические болезни, к 2030 году [5].

Заключение. В Республике Беларусь с 2013 по 2018 гг. при отсутствии случаев заболевания бешенством среди населения частота обращения населения за АРМП оставалась стабильно высокой, составив от 209,6$^0/_{0000}$ до 227,2$^0/_{0000}$ в разные годы наблюдения. Сохраняющуюся актуальность проблемы рабической инфекции в Республике Беларусь определяют также активность эпизоотического процесса, события с контактами населения, в том числе массовыми, с больными бешенством животными. При этом, ежегодная обращаемость населения за АРМП вследствие контакта с больными бешенством животными в 2018 г. увеличилась в 1,3 раза ($P \leq 0{,}001$) по сравнению с 2017 г.

Функционирующая в Республике Беларусь система эпидемиологического слежения за бешенством основывается на тесном взаимодействии систем эпидемиологического слежения и эпизоотологического мониторинга за рабической инфекцией. Для дальнейшего сохранения эпидемиологического благополучия требуется постоянный неснижаемый контроль за эпизоотической и эпидемиологической ситуацией, и координация совместных действий в рамках комплексного надзора за бешенством.

Литература

1. Бешенство. Информационный бюллетень // Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. – ВОЗ. – Режим доступа: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/rabies. – Дата доступа: 28.09.2020.
2. О профилактике бешенства: приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 17.12.2018 № 1341.
3. Комплекс совместных действий государств-участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года: решение Совета глав правительств Содружества Независимых Государств от 1 июня 2018 г. // Единый реестр правовых актов и других документов Содружества Независимых Государств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://cis.minsk.by/reestr/ru/index.html#reestr/view/text?doc=5789. – Дата доступа: 04.10.2020.
4. Zero by 30 our catalytic response // Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Organisation for Animal Health, Global Alliance for Rabies Control and country partners [Electronic resource]. – FAO, OIE, GARC, 2018. – Mode of access: http://www.who.int/rabies/United_against_Rabies/en/. – Date of access: 09.04.2020.
5. Цель устойчивого развития в области здравоохранения // Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. – ВОЗ. – Режим доступа: https://www.who.int/topics/sustainable-development-goals/targets/ru/. – Дата доступа: 04.10.2020.

EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE FOR RABIES AMONG THE POPULATION IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Hanenko O.N., Kolomiets N.D., Tonko O.V.

Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Republic of Belarus

In the Republic of Belarus, from 2013 to 2018, in the absence of cases of rabies among the population, the frequency of people applying for anti-rabies medical care (ARMC) remained stably high, ranging from 209.6$^0/_{0000}$ to 227.2$^0/_{0000}$ in different years of observation. The continuing urgency of the problem of rabies infection in the Republic of Belarus is determined by the activity of the epizootic process, events with contacts of the population, including mass contacts, with animals sick with rabies. At the same time, the annual appeal of the population for ARMC due to contact with animals with rabies in 2018 increased by 1.3 times ($P \leq 0.001$) compared to 2017. The rabies epidemiological monitoring system functioning in the Republic of Belarus is based on close interaction of the epidemiological monitoring and epizootic monitoring systems for rabies infection.

Keywords: rabies, epidemiological surveillance, animal bites, population requests for anti-rabies medical care, interaction of specialists, Belarus.

Поступила 12.10.2020

ДИНАМИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ЛЯМБЛИОЗА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

[1]Шуманская С.Ю., [1]Дронина А.М., [1]Фомина Е.Г., [1]Григорьева Е.Е., [1]Пархомчук О.Ю., [2]Семижон О.А.

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

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

Резюме. Эпидемический процесс лямблиоза за период с 2007-2018 гг. в Республике Беларусь характеризовался вы раженной тенденцией к снижению в многолетней динамике, периодические факторы формировали цикличность в 3,5-4 года. Наибольший вклад в структуру заболеваемости вносило детское население (71,9%). Ежегодно обследованию копроцистоскопическим методом подлежит от 416 353 до 869 218 человек, пораженность не зависела от количества обследованных и находилась в пределах от 0,07 до 0,44%.

Ключевые слова: лямблиоз, эпидемический процесс, жиардиаз, пораженность, Беларусь.

Введение. В современном мире по данным Всемирной организации здравоохранения на фоне значительного улучшения качества жизни населения, а также достижений современной медицины основной причиной смерти является неинфекционная патология, однако инфекционная заболеваемость, неотъемлемой частью которой является паразитарная, не теряет своей актуальности.

Наиболее часто встречающимся заболеванием, вызываемым простейшими в странах с умеренным климатом, к которым относится и Республика Беларусь, является лямблиоз, что обусловлено такими особенностями возбудителя как возможность образования цист, длительное сохранение в окружающей среде и др. Согласно международной классификации болезней 10-го пересмотра данное заболевание принято шифровать под кодом А07.2 Жиардиаз [лямблиоз], однако в странах Восточной Европы чаще употреблять термин «лямблиоз». По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире лямблиозом заражается 200 млн. человек, а распространённость в детской популяции составляет 355 случаев на 100 000 детского населения [1-4]. В Беларуси ежегодно регистрируются случаи протозоозных инвазий, на долю лямблиоза приходится более 90% от общего количества случаев. В соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 15.12.2010 № 1334 [5] основным методом диагностики и подтверждения диагноза «Лямблиоз» является копроцистоскопический метод, основанный на специальной обработке материала с последующей микроскопией. Данный метод характеризируется низкой чувствительностью и специфичностью, а также не учитывает такие особенности лямблиоза как наличие «немого» периода, когда выделение цист из организма может прекращаться на период от 2 до 14 дней и др. [3, 6], что позволяет выдвинуть гипотезу о более широком распространении протозоозов на территории Республики Беларусь.

Цель: охарактеризовать эпидемический процесс лямблиоза в Республике Беларусь за период 2008-2018 гг., установить возрастную структуру заболевших, а также уровни заболеваемости в группах.

Материалы и методы исследования. В работе использованы данные официальной регистрации лямблиоза в период 2007-2018 гг. (уч. ф. 01 – годовая, ф. 060-у, ф. 357-у), данные о численном составе возрастных групп населения. Многолетнюю тенденцию определяли методом наименьших квадратов и оценивали по среднему темпу прироста

(Тпр). Значимость возрастных групп в распространенности оценивали по средним многолетним экстенсивным, интенсивным показателям и относительному риску быть инфицированным (incidence rate ratio – IRR). Для оценки относительного риска быть инфицированным референтной группой считали группу с наименьшим относительным показателем заболеваемости. Пути передачи определяли по данным, внесенным в «Карту эпидемиологического обследования очага инфекционного заболевания» ф. 357/у [7].

Результаты исследования и их обсуждение. За период 2007-2018 гг. в Республике Беларусь эпидемический процесс лямблиоза характеризовался выраженной тенденцией к снижению заболеваемости (Тпр= -8,59%), заболеваемость колебалась от 6,02 за 2017 г. (572 случая) до 20,62 за 2007 г. (1988 случаев) на 100 000 населения (рисунок 1).

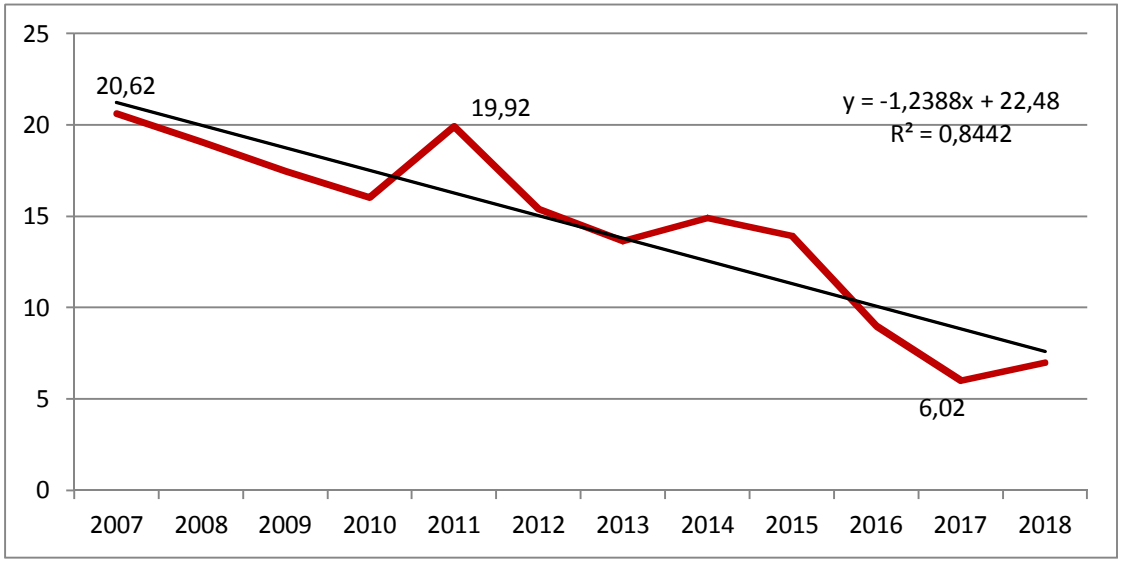


Рисунок 1. – Многолетняя динамика заболеваемости лямблиозом в Республике Беларусь за период 2007-2018 гг.

Выявлялась периодичность эпидемического процесса продолжительностью 3,5-4 года с амплитудой 3,31-4,74 на 100 000 населения, рисунок 2.

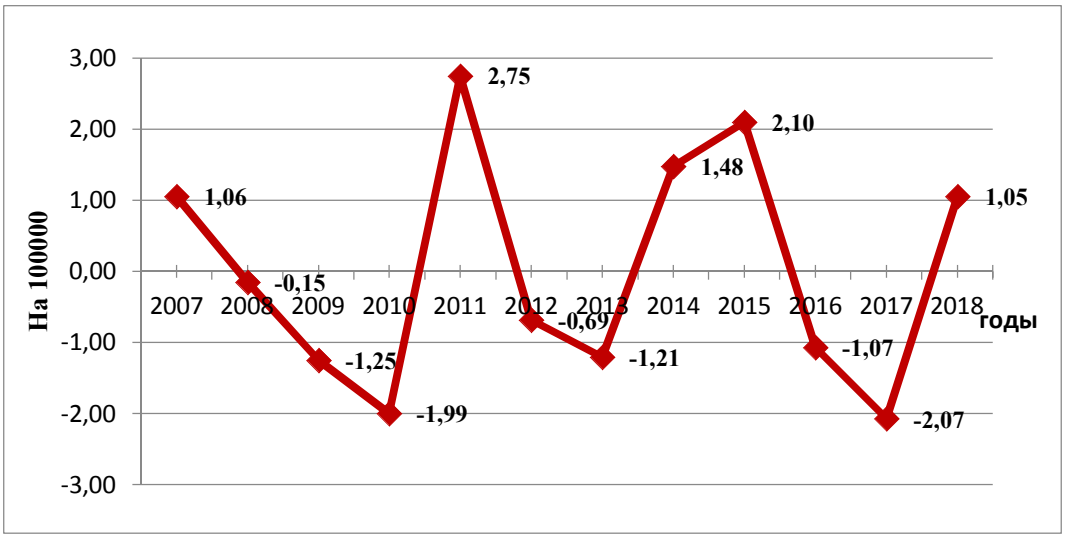


Рисунок 2. – Цикличность эпидемического процесса лямблиоза (по параболе 2 порядка) в Республике Беларусь в 2007-2018 гг.

В возрастной структуре в Республике Беларусь наибольшее количество случаев лямблиоза регистрировалось среди детского населения (71,89%), рисунок 3.

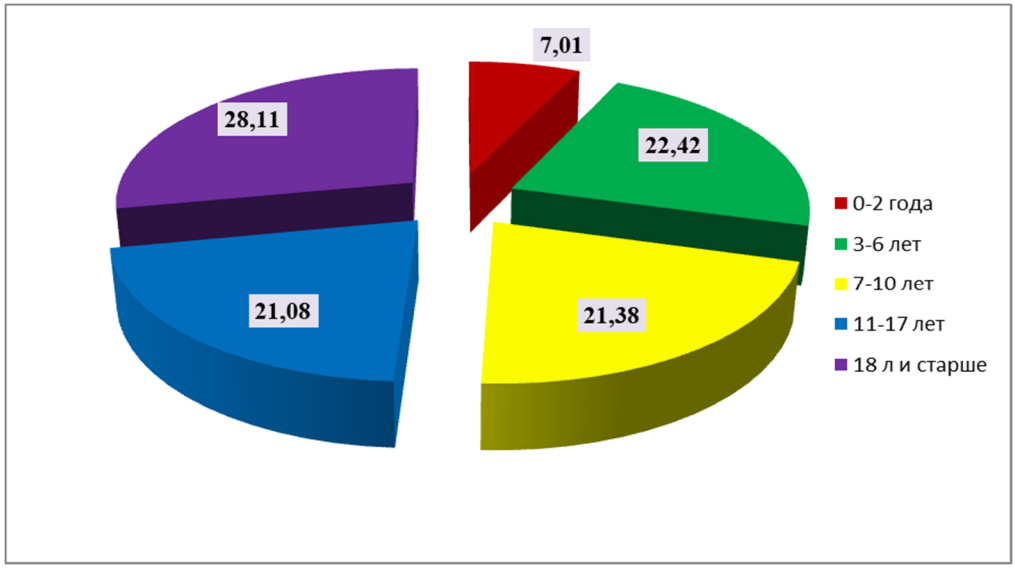


Рисунок 3. – Возрастная структура заболеваемости лямблиозом в Республике Беларусь за период 2008-2018 гг.

Следует отметить, что, не смотря на ежегодное увеличение количества обследований пациентов с симптомами, не исключающими лямблиоз (за 2018 г. обследовано в 2,1 раза больше, чем за 2008 г.), поражённость населения Республики Беларусь в период 2008-2018 гг. колебалась от 0,07% в 2018 г. до 0,44% в 2008 г., рисунок 4.

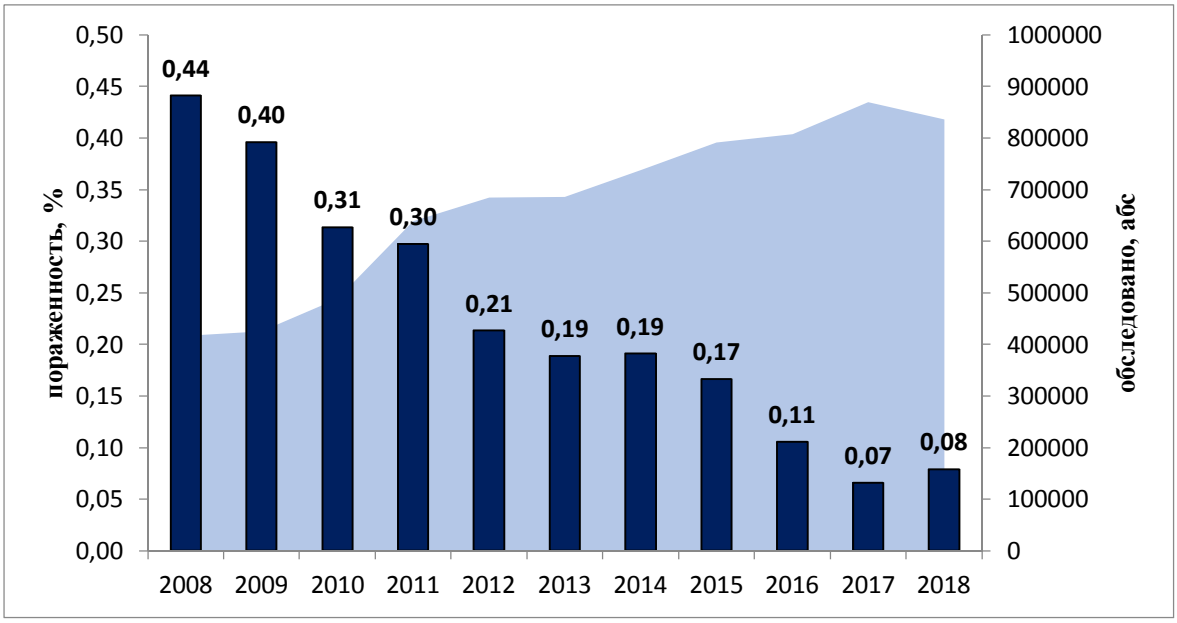


Рисунок 4. – Пораженность лямблиозом населения Республики Беларусь с 2008 по 2018 гг.

Высокий относительный риск быть инвазированным лямблиями выявлялся в группе 3-6 лет (IRR =14,52), 7-10 лет (IRR =15,51) и 11-17 лет (IRR =8,31), таблица 1.

Таблица 1. – Средняя многолетняя заболеваемость лямблиозом

Группа	*I (на 100 000)*	*CI min 95%*	*CI max 95%*	*IRR*
до 2 лет	28,25	26,21	29,98	5,85
от 3 до 6 лет	70,15	67,74	72,55	14,52
от 7 до 10 лет	74,94	72,30	77,57	15,51
от 11 до 17 лет	40,17	38,75	41,59	8,31
старше 17 лет	4,83	4,68	4,98	1,00

При оценке инвазированности по возрастным группам в Республике Беларусь за период 2008-2018 гг. установлено, что пораженность по областям в группе до 2 лет колебалась от 0,07% до 0,73%; в группе от 3 до 6 лет – от 0,08% до 2,39%; от 7 до 10 лет – от 0,1% до 3,07% и старше 17 лет – от 0,01% до 0,25% (коэффициент корреляции Спирмена -0,95), таблица 2.

Таблица 2. – Пораженность населения лямблиозом в областях Республики Беларусь

	0-2 года	**3-6 лет**	**7-10 лет**	**0-17 лет**	**старше 17**
Брестская область	0,28	1,14	1,33	0,93	0,25
Витебская область	0,73	2,39	3,07	1,98	0,06
Гомельская область	0,09	0,32	0,48	0,33	0,05
Гродненская область	0,18	0,48	0,71	0,57	0,13
Минская область	0,07	0,08	0,10	0,09	0,01
Могилевская область	0,10	0,17	0,31	0,21	0,05

При анализе показателей заболеваемости по областям установлено, что за период 2007-2018 гг. в Минской (Тпр= -6,29%), Брестской (Тпр= -10,37%), Гомельской (Тпр= -14,75%), Могилевской (Тпр= -17,01%), Гродненской (Тпр= -6,17%) областях и г. Минске (Тпр= -9,28%) наблюдалась выраженная тенденция к снижению заболеваемости, тогда как на территории Витебской области произошла активизация эпидемического процесса (Тпр=9,13%).

Выводы. Заболеваемость лямблиозом в Республике Беларусь колебалась по годам от 6,02 до 20,62 на 100 000 населения. Многолетняя динамика заболеваемости лямблиозом формировалась под влиянием постоянных и периодических факторов. Сила действия постоянных факторов снижалась и характеризовалась выраженной тенденцией к снижению (-8,59%), периодические факторы формировали цикличность 3,5-4 года с амплитудой 3,31-4,74 случая на 100 000 населения.

В возрастной структуре заболевших преобладало детское население, на долю которого приходилось 71,9% случаев; из них возрастные группы 3-6, 7-10, 11-17 лет. Высокий относительный риск быть инвазированным выявлялся в группах 7-10 лет (IRR=15,51), 3-6 лет (IRR=14,52) и 11-17 лет (IRR=8,31) по сравнению с референтной группой (взрослые).

Ежегодно обследованию копроцистоскопическим методом подлежит от 416 353 до 869 218 человек, пораженность не зависит от количества обследованных и находится в пределах 0,07-0,44% (коэффициент корреляции Спирмена -0,95).

Литература

1. Бельмер, С.В. Лямблиоз у детей: принципы базисной терапии (на основании Рабочего протокола диагностики и лечения лямблиоза у детей 2013 г.) / С.В. Бельмер, В.П. Новикова // Русский мед. журн. – 2013. – Т. 21, № 24. – С. 1201-1205.

2. Бобырева, Н.С. Анализ данных лабораторного обследования на лямблиоз у различных групп населения Ненецкого автономного округа / Н.С. Бобырева, Г.Н. Дегтева // Инфекции и иммунитет. – 2015. – № 3. – С. 279-284.

3. Приворотский, В.Ф. Лямблиоз у детей: современное состояние проблемы / В.Ф. Привовротский, Н.Е. Луппова // Педиатрия. – 2013. – Т. 4, № 3. – С. 101-110.

4. Human cellular immune response against Giardia lamblia 5 years after acute giardiasis / K. Hanevik [et al.] // J. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 204, No. 11. – P. 1779-1786.

5. Об утверждении Инструкции о порядке применения методов обследования на паразитарные заболевания отдельных профессиональных, возрастных и других групп населения [Электронный ресурс]: приказ М-ва здравоохранения Респ. Беларусь 15.12.2010, № 1334 / Белорусский государственный медицинский университет. – Режим доступа: https://www.bsmu.by/downloads/kafedri/k_epidem/stud/2013-2/i3.pdf. – Дата доступа: 06.11.2020.

6. Профилактика паразитарных болезней. Профилактика лямблиоза: методические указания МУ 3.2.1882-04 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293851/4293851833.pdf. – Дата доступа: 15.11.2020.

7. Лапач, С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – Киев: Морион, 2001. – 408 с.

DYNAMICS OF THE EPIDEMIC PROCESS OF GIARDIASIS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

[1]Shumanskaya S.Yu., [1]Dronina A.M., [1]Fomina E.G., [1]Grigorieva E.E., [1]Parkhomchuk O.Yu., [2]Semizhon O.A.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

[2]Minsk City Center for Hygiene and Epidemiology, Minsk, Republic of Belarus

Epidemic process of giardiasis for the period from 2007 to 2018 in the Republic of Belarus was characterized by a pronounced downward trend in long-term dynamics, periodic factors formed a cyclicity of 3.5-4 years. The largest contribution to the morbidity structure was made by the child population (71.9%). From 416 353 to 869 218 people are subject to examination by the coprocystoscopic method annually, the incidence did not depend on the number of examined people and ranged from 0.07 to 0.44%.

Keywords: giardiasis, epidemic process, affection, Belarus.

Поступила 16.11.2020

МИКРОБИОЛОГИЯ

Обзорные сообщения

ПРИНЦИПЫ И СТРУКТУРА ОРГАНИЗАЦИИ КОЛЛЕКЦИИ И КРИОБАНКА КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Корень С.В., Фомина Е.Г.

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

Резюме. В обзоре представлена информация об основных мировых коллекциях культур клеток, назначении и видах криобанков, криоконсервации и контроле качества культур клеток.

Ключевые слова: культура клеток, криобанк, криоконсервация, контроль качества

Введение. Во второй половине 20 века широкое применение получили культуры клеток человека и животных, полученные как из нормальных (немалигнизированных), так и из опухолевых тканей, что позволило исследовать многие биологические процессы, которые до этого было сложно или невозможно изучать на уровне организма. Культивируемые клетки используются в различных областях биологии и медицины для создания диагностических препаратов и вакцин, для проведения диагностики вирусных инфекций, для разработки медицинских технологий заместительной терапии различных заболеваний человека, для изучения процессов клеточного деления, дифференцировки и регуляции экспрессии генов, для выявления молекулярных механизмов канцерогенеза и наследственных заболеваний человека, а также в качестве тест-объектов при испытании новых фармакологических, косметических средств и пищевых добавок.

Основные мировые коллекции культур клеток и их назначение. Для сбора клеточных линий, получения новых культур клеток, изучения их морфофункциональных свойств, накопления биомассы и хранения, а также для обеспечения клеточным материалом учреждений здравоохранения, научных лабораторий и других учреждений создаются Национальные коллекции клеточных культур. Наиболее крупными мировыми коллекциями являются: Американская коллекция типовых культур – ATCC (American Type Culture Collection) и Европейская коллекция подлинных клеточных культур – ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures). Существуют подобные коллекции во многих странах Европы (Германия, Великобритания, Россия и др.) и Азии (Япония, Китай).

Российская коллекция клеточных культур (РККК) была создана в 1978 г. Основоположником ее создания был д-р биол. наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации Георгий Петрович Пинаев. Головным учреждением был определен Институт цитологии АН СССР (сейчас Институт цитологии РАН). Главной задачей РККК является сбор и сохранение клеточных культур человека, животных и растений и обеспечение ими научных учреждений. Сейчас РККК человека, животных и растений состоит из 8 специализированных коллекций (www.incras.ru). В их число входят:

1. Коллекция культур клеток позвоночных (Центральный банк клеточных линий человека и животных. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

2. Коллекция клеточных линий человека и животных для исследований в области вирусологии (НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург).

3. Коллекция перевиваемых соматических клеток позвоночных (НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ, Москва).

4. Коллекция перевиваемых соматических клеток позвоночных медицинского назначения (Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций Роспотребнадзора МЗСР РФ, Екатеринбург).

5. Коллекция перевиваемых соматических клеток сельскохозяйственных и промысловых животных (Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко, РАСХН, Москва).

6. Всероссийская коллекция постоянных линий клеток беспозвоночных (Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко, РАСХН, Москва).

7. Всероссийская коллекция культур клеток высших растений (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, РАН, Москва).

8. Коллекция генетически-трансформированных pRi корней высших растений (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, РАН, Москва).

Дополнительно в сводный каталог РККК включен коллекционный фонд Белорусской коллекции культур клеток человека и животных (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ, Минск). Коллекция содержит клеточные линии человека и животных, которые используются для фундаментальных и прикладных исследований в разных областях биологии и медицины: вирусологии, биотехнологии, иммунологии и иммунофармакологии. Коллекционный фонд собирался на протяжении десятков лет, в настоящее время в нём паспортизовано и хранится 56 культур клеток человека и животных.

ATCC – это ведущая глобальная организация, цель которой состоит в приобретении, идентификации, производстве, сохранении, развитии и распространении стандартизированных эталонных штаммов микроорганизмов, клеточных линий и других биологических материалов, применяемых в различных областях естествознания. ATCC основана в 1925 г. с целью создать централизованную коллекцию микроорганизмов для нужд ученых всего мира. Штаб-квартира ATCC и производственные объекты располагаются в г. Мананнас, штат Вирджиния (США). Это полностью автономный комплекс зданий со своим энергообеспечением и охраной, хранилище включает 200 морозильных камер разных типов для хранения биоматериалов. В коллекции входят более чем 3 400 перевиваемых клеточных линий человека, животных и растений, опухолевые клетки, культуры стволовых клеток, более 18 000 штаммов бактерий, более 3 000 вирусов человека и животных, более 7 600 видов грибов и дрожжей и многое другое (www.lgcstandards-atcc.org).

Система здравоохранения Англии включает в себя 4 уникальные коллекции, одной из которых является ***ECACC***. Она была создана в 1985 г. как коллекция культур клеток для обслуживания научного сообщества, сейчас в ней содержится большое количество клеточных линий, представляющих 45 различных видов организмов и 50 типов тканей. Располагается коллекция в Портон-Даун – правительственном военном научном парке Великобритании, который является частью системы общественного здравоохранения Англии (www.phe-culturecollections.org.uk).

Как правило, Национальные коллекции получают целевое государственное финансирование или финансовую поддержку от крупных биотехнологических и фармацевтических компаний, использующих клеточные культуры для производства биологически-активных соединений.

Назначение и виды криобанков. Неотъемлемой частью коллекций является криобанк. Криобанки нашли широкое применение в различных областях медицины, экономики, сельского хозяйства и др. В зависимости от целевого назначения выделяют

криобанки клеточных культур и гибридом; костного мозга; крови и ее компонентов; тканей человека и животных; низших и высших грибов; микроорганизмов; половых продуктов человека и животных; вирусов; меристем растений; одноклеточных водорослей и др. Криобанки микроорганизмов создаются с целью хранения штаммов микроорганизмов, используемых в биотехнологии, генной инженерии, молекулярной биологии. Такие банки либо являются самостоятельной единицей, либо входят в состав коллекций культур клеток. Криобанки гибридом служат для хранения и сохранения продуктивности гибридом в течение неограниченного промежутка времени. Криобанки крови и ее компонентов, в том числе и пуповинной крови, организуются на станциях переливания крови в гематологических лечебных учреждениях. Образцы пуповинной крови, как правило, хранятся либо в частных коммерческих банках персонального хранения, где хранят кровь для аутологичного или внутрисемейного использования, либо в некоммерческих донорских банках, где родители сдают кровь своего ребенка в общественное пользование. Главными задачами такого банка являются хранение и использование клеток для целей клеточной терапии гематологических и негематологических заболеваний, тканевой инженерии, а также увеличения биомассы (экспансии) гемопоэтических стволовых клеток *ex vivo*. Криобанки тканей человека и животных служат для приготовления и хранения образцов тканей и целых органов для нужд трансплантационной медицины. Криобанки половых продуктов человека и животных создаются с целью лечения бесплодия у людей, повышения частоты беременности и упрощения процедуры осеменения у животных, сохранения половых продуктов редких и исчезающих видов животных, создания запасов половых продуктов высокопродуктивных пород сельскохозяйственных животных [1].

Криобанк клеточных культур. В процессе культивирования наблюдается выраженное изменение основных характеристик клеточных культур. Это может быть обусловлено составом и качеством питательных сред и сыворотки, условиями культивирования и т.д. Чаще всего эти изменение затрагивают культуральные свойства клеточных культур (падение пролиферативной активности клеток, увеличение сроков формирования монослоя), но могут происходить и более глубокие трансформации, такие как изменение кариотипа и контаминация культур клеток микроорганизмами. Именно поэтому важной задачей является сохранение первоначальных биологических характеристик культур клеток, стабильности морфофизиологических свойств и высокой чувствительности к вирусам. Выполнению этой задачи и служат криобанки клеточных культур человека и животных.

Депонированные в криобанк культуры должны быть паспортизованы, охарактеризованы кариологически; по культурально-морфологическим свойствам; по отсутствию контаминации бактериями, дрожжеподобными грибами, микоплазмами, вирусами; по чувствительности к вирусам; по продукции гормонов, ферментов и др.

Для хранения клеточного материала используют либо сосуды Дьюара различной емкости, либо специальные объемные криохранилища с автоматической подачей жидкого азота. Криогенное оборудование устанавливается в просторной, изолированной, хорошо вентилируемой комнате. Работа обязательно проводится в халатах, криоперчатках и очках для предотвращения попадания жидкого азота на кожу. Помимо основного хранилища клеток рекомендуется иметь резервное. В качестве резервного хранилища может выступать сосуд Дьюара, в котором хранятся по 1-2 ампуле каждой культуры и, в случае выхода из строя основного хранилища, можно будет возобновить весь банк. Все задействованное оборудование должно быть снабжено звуковыми оповещателями, предупреждающими как о выходе из строя оборудования, так и о изменении какого-либо параметра, важного в работе данного устройства (криохранилища, программируемого замораживателя и др.).

Для поддержания и контроля за стабильностью свойств культур в процессе длительного хранения в жидком азоте раз в несколько лет необходимо рекультивировать несколько ампул после размораживания. При этом определяют относительное число жизнеспособных клеток, пролиферативную и митотическую активность, модальный класс хромосом, проверяют отсутствие микроорганизмов-контаминантов.

При получении новой линии клеток она должна быть охарактеризована по вышеперечисленным показателям, накоплена и заморожена. Эти клетки будут составлять эталонный банк. Из ампулы эталонного банка накапливают и замораживают клетки для выдачи в другие учреждения и для проведения научно-экспериментальной работы. Эти клетки будут составлять рабочий банк. Таким образом, эталонный банк необходимо отделить от рабочего банка, что позволяет избежать проблем, связанных с генетической нестабильностью, старением, трансформацией клеточных культур.

В целях стандартизации условий для каждой стадии необходимо разработать стандартные операционные процедуры (СОП), такие как: восстановление культур клеток из низкотемпературных условий, культивирование клеток в пассажах, контроль качества клеточных культур, криоконсервация, паспортизация и каталогизация.

Также для каждой культуры должен быть разработан паспорт, в котором отражаются источник получения культуры, условия культивирования и криоконсервации, морфология, кариотип, иммунотип (для клеток крови), области применения и др. [2].

Криоконсервация культур клеток. Поступающие в криобанк новые культуры должны быть накоплены и заморожены. Хранящиеся культуры тоже периодически размораживают, накапливают в пассажах и замораживают для пополнения биомассы определенной культуры, израсходованной в научных или медицинских целях. Поэтому большое значение имеет разработка эффективных технологий низкотемпературного консервирования биологических образцов. Криоконсервация – заморозка биологических образцов с целью сохранения их биологических свойств для дальнейшего использования. В результате криоконсервации биологические объекты подвергаются действию различных физико-химических факторов, обусловленных изменениями температуры, состава и состояния компонентов системы. В процессе заморозки как в клетке, так и во внеклеточном пространстве образуются кристаллы льда, что может привести к повреждению клеток. Повреждения могут произойти в процессе кристаллизации воды из-за обезвоживания клеток при увеличении концентрации солей во внеклеточном пространстве, а также при механическом повреждении клеточных стенок кристаллами. Поэтому в процессе заморозки используют специальные криопротекторы, которые воздействуют на образование кристаллов льда и скорость транспорта воды. В настоящее время для криоконсервации клеток используются диметилсульфоксид (DMSO), полиэтиленоксид с молекулярным весом 400 (ПЭО-400), глицерин и др. Наибольшим повреждениям в результате заморозки подвержена плазматическая мембрана как первичная мишень криовоздействия. Под влиянием холода в плазматических мембранах происходит формирование микро- и макродефектов, размеры которых зависят от степени снижения температуры, фазово-структурных переходов липидов и уровня вымерзания воды в мембране. Поэтому разработаны программы криоконсервирования, которые обеспечивают высокую выживаемость клеток и их компонентов, а также сохранность биологически активных веществ в высоких концентрациях и оптимальных физиологических соотношениях. Для криоконсервации отбирают культуры в логарифмической фазе роста с сформированным монослоем, с характерной для данных культур морфологией. С целью сохранения наибольшей жизнеспособности клеток во время длительного хранения в жидком азоте в состав криосреды включают 8-10% высокоочищенного диметилсульфоксида, необходимую для конкретной культуры клеток питательную среду, а также большое содержание сыворотки эмбрионов коров, которое составляет 30-70%.

Концентрацию клеток доводят до 3-5 млн/мл и разливают в специальные пробирки (виалы), предназначенные для хранения клеток в жидком азоте. Криоконсервацию клеток осуществляют либо с помощью программируемого замораживателя, либо путем поэтапного замораживания, используя охлаждение и заморозку клеток до +4°С; до -25°С; до -90°С соответственно [3].

Криоустойчивость клеток в значительной степени зависит от морфофизиологических особенностей культур. В связи с этим для создания коллекции культур клеток необходимо использовать линии клеток, свободные от микроорганизмов-контаминантов. Выживаемость клеток при криоконсервации зависит от их исходных физиологических свойств, состава консервирующей среды, а также режима замораживания. После восстановления культур их ультраструктура отличается от культур, не подвергшихся замораживанию. Наблюдаются образование хлопьев хроматина на фоне просветленного матрикса ядра, расслоение ядерной мембраны, вакуолизация цитоплазмы, набухание рибосом, фрагментирование крист и др. Однако при пассировании эти явления исчезают и культуры 3-5 пассажей не отличимы от клеток исходной культуры. От пассажа к пассажу увеличивается и индекс пролиферации, пока не достигнет исходного уровня, характерного для данной культуры [4].

Контроль качества культур клеток. Длительное пассирование культур клеток приводит к изменению их основных характеристик. Такие модификации могут затрагивать как культуральные свойства клеточных линий, так и приводить к более глубоким трансформациям, характеризующимися изменением кариотипа и видовой принадлежности вследствие контаминации культур клеток. Поэтому одной из задач криобанков является сохранение культур с неизменными биологическими характеристиками. Стандартизация клеточных культур включает оптимизацию условий культивирования, разработку условий получения культур клеток, характеризующихся высокой стабильностью своих морфофизиологических свойств и чувствительностью к вирусам, разработка принципов паспортизации и создание каталога клеточных линий, накопление биомассы стабилизированных клеточных линий и их криоконсервация.

Одним из важных элементов стандартизации условий культивирования является использование лиофилизированной сыворотки или бессывороточных сред. Главными преимуществами бессывороточных сред являются селективность, то есть возможность подбора компонентов среды для индивидуальных типов клеток, а также регуляция пролиферации и дифференцировки путем изменения концентрации и типов различных индукторов роста и дифференцировки. Главными недостатками бессывороточных сред является появление сублиний, не являющихся типичными для основной популяции клеток; уменьшенная пролиферация клеток по сравнению с перевиваемыми культурами, выращиваемыми в присутствии эмбриональной телячьей сыворотки; высокая стоимость относительно традиционных сред.

Другим элементом, определяющим стабильность клеточных линий, является отсутствие контаминации микроорганизмами (бактериями, грибами, микоплазмами) и вирусами. Наиболее опасными контаминантами (из-за сложности их обнаружения) являются микоплазмы и вирусы. Микоплазменная инфекция поражает как первичные (около 4%), так и перевиваемые (до 57-92%) культуры клеток. Зачастую при контаминации микоплазмами не выявляются видимые морфологические изменения, но происходит замедление роста клеток и ухудшение их адгезивной способности. При остром течении микоплазменной инфекции происходит резкое закисление среды, раннее отторжение от стекла с образованием дефектов монослоя уже на 3-4 сутки роста. Также наблюдается изменение морфологии клеток: зернистость цитоплазмы, кареорексис и пикноз ядер.

Микоплазмы изменяют процессы клеточного деления, что, в свою очередь, отражается на процессах взаимодействия клеток с вирусами. Деконтаминация клеток от микоплазм возможна, но, как правило, затратная и не вполне эффективна. В культурах клеток микоплазмы выявляют с помощью гистохимических, иммунологических, биохимических, авторадиографических методов, а также методом электронной микроскопии. В последнее время хорошо зарекомендовал себя метод детекции микоплазм с помощью ПЦР в реальном времени [5].

Латентная вирусная инфекция в культурах клеток выявляется с трудом, для ее обнаружения применяют методику смешанного культивирования исследуемых клеток с клетками, чувствительными к различным вирусам. Кроме того, применяют реакцию гемадсорбции с эритроцитами кур, морской свинки и 0-группы человека; метод иммунофлуоресценции и электронной микроскопии в технике негативного контрастирования [6].

При изучении чувствительности культур клеток к вирусам и приготовлении различных медико-биологических препаратов необходимо использовать чистые, паспортизованные линии клеток и соблюдать оптимальную технологию их культивирования, а также использовать генетически однородную популяцию вирусов.

Перекрестная контаминация и неверная идентификации клеточных линий является серьезной проблемой, с которой, начиная с 60-х годов XX века и по настоящее время, сталкиваются исследователи при культивировании клеток млекопитающих. Согласно имеющимся данным доля кросс-контаминированных или неправильно идентифицированных культур в клеточных банках составляет от 15% до 36% [7, 8]. Периодическое проведение видовой идентификации с целью своевременного выявления контаминации клеточных культур рекомендовано Международным комитетом по идентификации клеточных линий и является обязательной практикой ведущих мировых коллекций: ATCC, ECACC, JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank), DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

Широкое распространение межвидовой и внутривидовой клеточной контаминации во многих лабораториях является основанием для постоянного совершенствования подходов к стандартизации клеточных линий и разработки для ее осуществления различных технологий: изоферментного анализа, кариотипирования, HLA-типирования, иммунофенотипирования. В настоящее время наиболее эффективными для решения данной проблемы признаны молекулярно-генетические методы, позволяющие проводить подтверждение подлинности на уровне ДНК [9]. В целях унификации методологии и подходов к ДНК-профилированию Американским национальным институтом стандартов (American National Standards Institute, ANSI) вместе с ATCC разработаны соответствующие международные документы, регламентирующие видоспецифическую ПЦР с последующим секвенированием генов митохондриальной ДНК (CO1) для установления видовой принадлежности клеточных культур и анализ профиля коротких тандемных повторов (STR – short terminal repeats) для аутентификации клеточных линий человека.

Таким образом, для формирования и поддержания собственного коллекционного, эталонного фонда клеточных линий, высокочувствительных к возбудителям инфекций человека (вирусам, бактериям, и др. микроорганизмам), с сохранением клетками первоначальных свойств необходима разработка системы постоянного контроля их качества, что требует наличия высококвалифицированного персонала и целевого финансирования.

Литература

1. Криобанки. Использование криоконсервированных биообъектов в медицине, ветеринарии и на этапах биотехнологии / А.А. Цуцаева [и др.] // Ветеринарная патология. – 2007. – Т. 20, № 1. – С. 17-19.

2. Колокольцова, Т.Д. Культуры клеток человека и животных: выделение, культивирование, криоконсервация и контроль / Т.Д. Колокольцова, И.Н. Сабурина, А.А. Кубатиев // Патогенез. – 2015. – Т. 13, № 2. – С. 50-65.

3. Cryopreservation and its clinical applications / T.H. Jang [et al.] // Integrative Medicine Research. – 2017. – Vol. 6, No. 1. – P. 12-18.

4. Использование криобанков клеточных культур в вирусологии и биотехнологии / Н.П. Глинских [и др.] // Ветеринарная патология. – 2007. – Т. 23, № 4. – С. 209-211.

5. Cell lines authentication and mycoplasma detection as minimun quality control of cell lines in biobanking / C. Corral-Vazquez [et al.] // Cell Tissue Bank. – 2017. – Vol. 18, No. 2. – P. 271-280.

6. Применение культур клеток для вирусологических исследований / Р.Я. Подчерняева [и др.] // Клеточные культуры. Информационный бюллетень / Ин-т цитологии РАН. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2014. – Вып. 30. – С. 56-71.

7. Capes-Davis, A.M. Authentication: a standard problem or a problem of Standards? / A.M. Capes-Davis, R.M. Neve // PLOS Biol. – 2016. – Vol. 16, No. 6. – P. 1-7.

8. Rizner, T.L. It is high time to discontinue use of misidentified and contaminated cells: Guidelines for description and authentication of cell lines / T.L. Rizner, J. Adamski // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2017. – Vol. 182, No. 12. – P. 1-10.

9. Nims, R.W. Best practices for authenticating cell lines / R.W. Nims, Y. Reid // In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal. – 2017. – Vol. 53, No. 12. – P. 880-887.

PRINCIPLES AND STRUCTURE OF THE HUMAN AND ANIMAL CELL CULTURE CRYOBANK ORGANIZATION

Koran S.V., Famina A.G.

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

The review article provides information on the main world collections of cell cultures, cryobank types, cryopreservation and quality control of cell cultures.

Keywords: cell culture, cryobank, cryopreservation, quality control.

Поступила 23.10.2020

Оригинальные исследования

РАЗРАБОТКА ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Бакаева Т.Н., Янович О.О., Титов Л.П.

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

Резюме. Разработан отечественный набор реагентов «LIST-ПЦР/РВ» с детекцией продуктов реакции методом ПЦР в режиме реального времени для выявления *Listeria monocytogenes* в клиническом материале от пациентов и пробах продуктов питания. Проведена оценка диагностических характеристик набора. Разработанный набор реагентов характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью, быстротой и надежностью исполнения. Набор реагентов «LIST-ПЦР/РВ» может применяться в качестве экспресс-теста в бактериологических лабораториях санитарно-эпидемиологического и ветеринарного надзора, в лабораториях ЛПУ как для целей диагностики, так и в качестве контроля за безопасностью продуктов питания.

Ключевые слова: листериоз, праймеры, ПЦР, набор реагентов.

Введение. Актуальной проблемой в борьбе с инфекционными заболеваниями человека и животных были и остаются вопросы своевременной и достоверной диагностики, важным критерием в которой является обнаружение возбудителя [1]. В лабораторной диагностике инфекционных заболеваний все чаще используется ПЦР в режиме реального времени, характеризующаяся высокой чувствительностью и специфичностью, а также значительным сокращением времени проведения. Важность ПЦР-диагностики особенно ярко проявляется при оппортунистических инфекциях, к которым относят и листериоз [2]. Разнообразие клинических признаков и степени тяжести протекания заболевания, а также бессимптомное носительство клинически здоровыми людьми и животными патогенных видов листерий, весьма усложняют диагностику последнего. Кроме того, листерии могут образовывать L-формы и переходить в некультивируемое состояние, для обнаружения которых использование традиционных бактериологических методов малоэффективно [4]. Эти трудности можно преодолеть при помощи полимеразной цепной реакции. Учитывая актуальность вышеизложенной проблемы, нами разработан набор реагентов для индикации генома возбудителя листериоза методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

Цель настоящего исследования – разработка и апробация набора реагентов для выявления ДНК *Listeria monocytogenes* методом ПЦР в режиме реального времени в клиническом материале и образцах продуктов питания.

Материалы и методы исследования. В работе использовали 78 штаммов *L. monocytogenes*, поступивших в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии из ЦГЭиОЗ: 12 штаммов были выделены из клинического материала (плацента, СМЖ, кровь, околоплодные воды, трахеальный аспират, ухо) от пациентов с диагнозом менингит, сепсис, внутриутробная инфекция; 66 штаммов из проб пищевых продуктов (мясо и мясные полуфабрикаты, рыба и рыбные полуфабрикаты). Исследовано 20 образцов биологического материала для обнаружения листерий от пациентов из лечебно-профилактических учреждений с диагнозом гнойный менингит, сепсис, а также было исследовано 8 проб продуктов мясного животноводства. В качестве контрольных

штаммов в исследование включены штаммы *L. innocua, L. ivanovii, L. weichimery, N. meningitidis, Kl. pneumoniae, E. coli, St. aureus, A. baumanii, Ps. aeroginosa.*

Поиск последовательностей генов для подбора универсальных праймеров проводился в международной базе данных GenBank. Анализ и выравнивание нуклеотидных последовательностей, поиск консервативных участков проводили с использованием программы MEGA 8. Специфические олигонуклеотидные праймеры, комплиментарные к регионам гена hly, подбирали с помощью программы Primer3. Для анализа свойств праймеров использовали программу OligoAnalyzer 3.1. Сравнительный анализ выбранных олигонуклеотидов проводили с помощью комплекса программ BLAST для исключения наличия областей гомологии с ДНК родственных и неродственных видов.

В качестве положительного контроля использовали образцы плазмидной ДНК, содержащей специфические участки ампликона гена мишени.

Выделение ДНК из биомассы бактерий и проб продуктов питания проводили с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-В». Выделение ДНК из образцов СМЖ и крови проводили коммерческим набором innuPREP Blood DNA Mini Kit (Analytic Jena, Германия) согласно инструкции производителя. Для проведения ПЦР в режиме реального времени был использован прибор Rotor-Gene 3000.

Результаты исследования и их обсуждение. В качестве генетических маркеров *L. monocytogenes* могут выступать различные гены: 16S и 23S рРНК, prs, gyrB, rpoB, hly, inlA и inlB, plcA, iap и др. [2-7]. В качестве идентифицирующего видоспецифичного гена для анализа с целью оценки возможного использования в разрабатываемой тест-системе был выбран ген hly A, кодирующий порообразующий цитолизин листериолизин O (LLO). Он является главным фактором вирулентности, необходимым для инвазии *L. monocytogenes* [4-6].

С помощью программы Primer3, OligoAnalyzer 3.1, алгоритма BLAST, базы данных GenBank подобраны 3 пары олигонуклеоидов. Эмпирическим путем была определена наиболее подходящая пара праймеров, обладающая наибольшей аналитической чувствительностью и 100%-ной специфичностью к гену hlyA *L. monocytogenes* и не было обнаружено их значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями других бактерий. Таким образом, была подобрана пара специфических праймеров HLY1, амплифицирующая участок длиной 183 п.н., характерный только для *L. monocytogenes* и олигонуклеотидный зонд с включением флуоресцентной метки. Флуоресцентный сигнал, свидетельствующий об амплификации специфического фрагмента генома L. monocytogenes, детектируется по каналу FAM. Характеристика подобранных праймеров и зонда представлена в таблице 1.

Таблица 1. – Олигонуклеотидные последовательности праймеров и зонда для видоспецифической идентификации *L. monocytogenes*

Праймеры	*Длина, п.н*	*Tm*	*GC%*	*Последовательность 5′ – 3′*	*ПЦР продукт*
HLY 1F	21	61,58	47,6	TCGAAAAGAAACACGCGGATG	183
HLY 1R	26	58,11	30,77	CTGCATTATTTTGATTGATGGATTTC	
HLY1P	22	67,90	54,5	TGCAGTGACAAATGTGCCGCCA	

Представленные характеристики праймеров полностью соответствуют требуемым параметрам олигонуклеотидов, необходимых для постановки ПЦР:

- температура плавления Tm праймеров не отличается более чем на 2-4ºС, при этом температура плавления зонда на 5-10ºС выше, чем праймеров;
- содержание G+C варьирует в пределах 30-50%;

- в праймерах нет более 4 повторяющихся подряд однотипных нуклеотидов;

- длина праймера в пределах 20-30 п.н, размер амплифицируемого продукта от 50 до 200 оснований – 183 п.о.

- праймеры не образуют вторичных структур и димеров.

Следующим этапом работы являлась оптимизация условий амплификации с выбранными праймерами. При выборе оптимальных параметров проведения ПЦР-РВ температуру гибридизации праймеров изменяли в диапазоне 53-60ºС. Сконструированные специфические праймеры показали высокую эффективность при тестировании в оптимизированных температурно-временных параметрах ПЦР при 53ºС 15 сек. Время проведения анализа составляет не более 1,5 ч. Протокол проведения ПЦР-РВ представлен в таблице 2.

Таблица 2. – Оптимальный протокол проведения ПЦР-РВ

Этап ПЦР-РВ	*Температура*	*Время*	*Количество циклов*
Предварительная денатурация	94ºС	3 мин	1
Денатурация ДНК Отжиг праймеров (детекция на канале FAM)	94ºС 53ºС	15 с 15 с	40

Условия проведения амплификации оптимизировались также по параметрам: концентрации ионов магния, Taq ДНК полимеразы, концентрации dNTP, праймеров и зондов в реакционной смеси. Рекомендуемая концентрация $MgCl_2$ составляет 1–4 мМ. В экспериментах мы испытывали концентраций $MgCl_2$ от 1,0 до 2,5 мМ. Нами было установлено, что оптимальной является концентрация 2 мМ $MgCl_2$. Оптимальная концентрация dNTP обычно составляет 0,2 мМ. Для оптимизации данного параметра мы испытывали концентрации dNTP в пределах от 0,1 до 0,5 мМ.

Оптимизированный состав реакционной смеси приведен в таблице 3.

Таблица 3. – Состав реакционной смеси

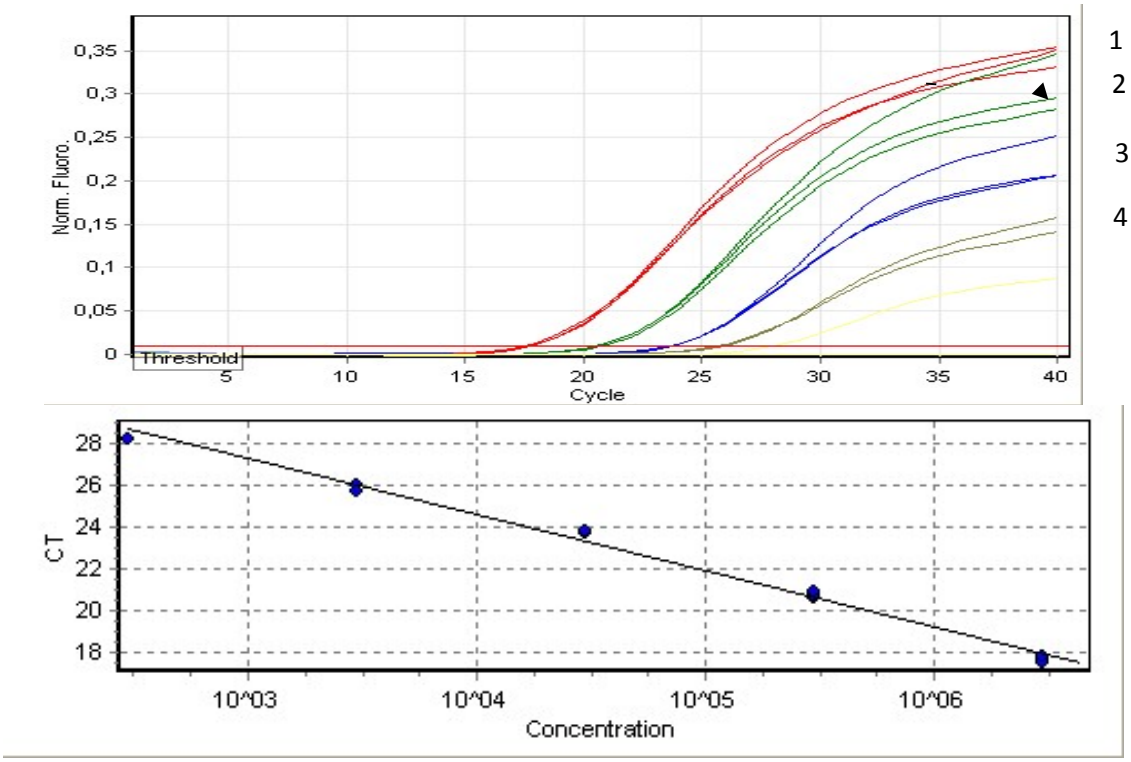
Компонент реакционной смеси	*Количество компонента на одну пробу (V=25 мкл), мкл*
Исследуемый образец ДНК	3
10 х ПЦР-буфер	2,5
Раствор MgCl2 (50мМ)	1
Раствор dNTP (10мМ)	0,5
Taq ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	0,2
Праймер прямой 10 пмоль hly	1
Праймер обратный 10 пмоль hly	1
Праймер прямой (ВКО) 10 пмоль	1
Праймер прямой (ВКО) 10 пмоль	1
Флуоресцентный зонд 10 пмоль	0,7
Флуоресцентный зонд (ВКО) 7 пмоль	1
Вода для ПЦР (деионизированная)	12,1

При проведении ПЦР-РВ для получения достоверных результатов, а также для стандартизации диагностических наборов в целом необходимо наличие ряда контролей для исключения ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

На этапе экстракции ДНК в каждую исследуемую пробу вносится внутренний контрольный образец (ВКО), который позволяет контролировать не только стадии ре-

акции, но и ход амплификации в каждой индивидуальной пробирке с реакционной смесью. В качестве ВКО использовали образцы плазмидной ДНК, содержащей специфические участки гена ApMSP. Детекция продукта амплификации ДНК ВКО проводится по каналу ROX. Положительный контрольный образец (ПКО), также как и отрицательный (ОКО), анализируются при анализе каждой серии образцов и контролируют этапы ПЦР РВ. В качестве положительного контроля этапа амплификации использовали образец, содержащий генно-инженерные конструкции на основе плазмиды pXcmkn12, несущей участок гена-мишени *L. monocytogenes*.

При определении основных диагностических характеристик тест-системы оценивали аналитическую и диагностическую чувствительность и специфичность. Для оценки аналитической чувствительности тест-системы был использован образец ДНК известной концентрации, полученный при выделении ДНК из чистой культы *L. monocytogenes* с определением концентрации спектрофотометрически. Из данного образца было приготовлено четыре десятикратных разведений ДНК в ТЕ-буфере от 10^6 до 10^3. Каждая концентрация была проанализирована в 3-х повторах. Результаты ПЦР-РВ для серии разведений представлены на рисунке 1. Было определено минимальное количество копий ДНК, детектируемое с применением синтезированных праймеров и зондов, после оптимизации условий проведения реакции, выраженное в ГЭ (геномных эквивалентах). Аналитическая чувствительность тест-системы, определенная на основании полученных экспериментальных данных, составила 10^3 ГЭ ДНК *L. monocytogenes* в 1 мл.



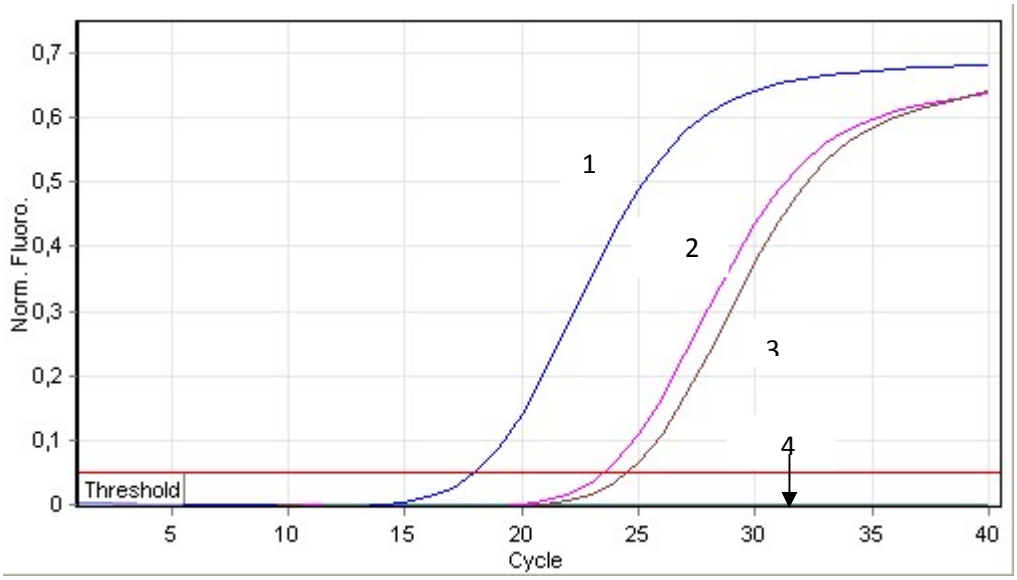
1 – 10^6 концентрация ДНК *L. monocytogenes;* 2 – 10^5; 3 – 10^4; 4 – 10^3

Рисунок 1. – Кривые амплификации и график функций линейной регрессии

Специфичность разработанных праймеров была протестирована в эксперименте с использованием штаммов бактерий *L. innocua, L. ivanovii, L. weichimery*, а также бактерий *St. aureus, E. coli, N. meningitidis, Kl. pneumoniae, Ps. aeroginosa, A. baumanii*. На

наличие ДНК *L. monocytogenes* с помощью экспериментального набора было исследовано 10 штаммов *L. monocytogenes*.

Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла Ct в соответствующей графе, результаты отражены в таблице 4. Результат считали положительным в случае, если кривая накопления флуоресценции для соответствующего образца имела характерную «сигмовидную» форму и пересекала пороговую линию. При этом значение Ct<35. Результаты представлены на рисунке 2.



1 – ПКО; 2 – *L. monocytogenes* 975; 3 – *L. monocytogenes* 259; 4 – ОКО

Рисунок 2. – Кривая роста флуоресцентного сигнала по каналу FAM

Результаты обработки данных экспоненциального роста флуоресценции по каналу FAM/ROX отражены в таблице 4.

Таблица 4. – Ct FAM/ROX при ПЦР-РВ исследуемых проб

№	Образец	Значение Ct по каналу FAM	Значение Ct по каналу ROX
1	*L. innocua* 20	не определяется	26,00
2	*L. innocua* 21	не определяется	23,00
3	*L. innocua 317*	не определяется	21,2
4	*L. ivanovii 1119*	не определяется	25,32
5	*L. weichimery 347*	не определяется	25,48
6	*L. monocytogenes 975*	14,16	25,09
7	*L. monocytogenes 1675*	16,78	23,16
8	*L. monocytogenes 445*	17,87	22,77
9	*L. monocytogenes 259*	15,23	23,12
10	*L. monocytogenes 124*	18,9	26,33
11	*L. monocytogenes 1400*	21,33	33,0
12	*L. monocytogenes 3125*	14,5	27,47
13	*L. monocytogenes 17*	21,17	30,00
14	*L. monocytogenes 94*	23,5	28,00
15	*L. monocytogenes 5760*	21,6	28,5
16	*E. coli 234*	не определяется	25,63

			Продолжение таблицы 4
17	*N. meningitidis 084*	не определяется	21,18
18	*Kl. pneumoniae 1277*	не определяется	19,83
19	*Acinetobacter baumanii 438*	не определяется	20,51
20	*Pseudomonas aeroginosa1239*	не определяется	21,34
21	*St. aureus 2347*	не определяется	25,77
22	*St. aureus 321*	не определяется	23,4
23	ПКО	26,0	
24	ОКО	не определяется	

Все штаммы *L. monocytogenes* в ПЦР-РВ с разработанным набором были определены как положительные. Не было зафиксировано ни одного ложноположительного результата среди 12 штаммов, не принадлежащих к виду *L. monocytogenes*. Таким образом, диагностическая чувствительность медицинского изделия набора реагентов «List-ПЦР/РВ» с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени составила 100%, а диагностическая специфичность 100%.

После проведения клинических испытаний Министерством здравоохранения Республики Беларусь был зарегистрирован «Набор реагентов «List-ПЦР/РВ» с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени» (рег. уд. № 1341817124 от 28.11.2018).

Заключение. Разработан отечественный набор реагентов «List-ПЦР/РВ» с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени, позволяющий провести индикацию ДНК *L. monocytogenes* в клинических образцах (кровь, ликвор, амниотическая жидкость), а также в образцах пищевых продуктов после этапа предобогащения, методом ПЦР. Набор также может использоваться для идентификации выделенных бактериологическим методом культур листерий. Данный набор апробирован на 78 штаммах *Listeria monocytogenes*, 5 штаммах других видов листерий, 10 штаммах грамотрицательных и грамположительных бактерий. Кроме того, выявлена ДНК *Listeria monocytogenes* в 2 случаях в ликворе пациентов, когда при бактериологическом исследовании возбудитель не обнаружен. При исследовании данным набором 8 проб пищевых продуктов в 2 случаях установлено наличие ДНК *Listeria monocytogenes*, что подтверждено бактериологическим исследованием. Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что разработанный набор реагентов характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью. Разработанный набор реагентов «LIST-ПЦР/РВ» с детекцией продуктов реакции методом ПЦР в режиме реального времени для выявления *L. monocytogenes* может применяться в качестве экспресс-теста в бактериологических лабораториях санитарно-эпидемиологического и ветеринарного надзора, в лабораториях ЛПУ как для целей диагностики, так и в качестве контроля за безопасностью продуктов питания.

Литература

1. Opportunistic infections due to inflammatory bowel disease / D. Maneesh [et al.] // Inflamm. Bowel Dis. – 2014. – Vol. 20. – P. 196-212.

2. Chakraborty, T. Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in Listeria species / T. Chakraborty, T. Hain, E. Domann // Int. J. Med. Microbiol. – 2000. – Vol. 290, No. 2. – P. 167-174.

3. *Listeria monocytogenes* meningitis in adults / O. Dzupova [et al.] // BioMed. Res. Int. – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 846186.

4. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution / M. Ragon [et al.] // PLoS Pathog. – 2008. – Vol. 4, No. 9. – e1000146. doi: 10.1371/journal.ppat.1000146

5. Orsi, R.H. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics / R.H. Orsi, H.C. den Bakker, M. Wiedmann // Int. J. Med. Microbiol. – 2011. – Vol. 301. – P. 79-96. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.05.002

6. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: The Monalisa national prospective cohort study / C. Charlier [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2017. – Vol. 17. – P. 510-519. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30521-7

7. Hof, H. Listeria infections of the eye / H. Hof // Eur. J. Ophthalmol. – 2017. – Vol. 27. – P. 115-121. doi: 10.5301/ejo.5000884

IDENTIFICATION AND INDICATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* BY PCR IN REAL TIME

Bakaeva T.N., Yanovich O.O., Titov L.P.

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

A domestic set of reagents "LIST-PCR / RT" with the detection of reaction products by the PCR method in real time for the detection of *L. monocytogenes* in clinical material from patients and food samples has been developed. The diagnostic characteristics of the kit were evaluated. The developed set of reagents is characterized by high specificity and sensitivity, fast and reliable performance. The set of reagents "LIST-PCR / RT" can be used as an express test in bacteriological laboratories of sanitary-epidemiological and veterinary surveillance, in laboratories of medical institutions, both for diagnostics purposes and as food safety control.

Keywords: listeriosis, primers, PCR, reagent kit.

Поступила 06.11.2020

ОВОЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ «КЛИНСТАР ХЛОР» И «КЛИНСТАР ХЛОР АКТИВ»

[1]Карамышева Ю.С., [1]Гудков В.Г., [2]Ладутько В.А., [2]Науменко А.И., [2]Рогова К.К., [1]Горбунов В.А.

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

[2]Закрытое акционерное общество «Санитарная оборона», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Изучена овоцидная активность дезинфицирующего средства «Клинстар хлор актив» и дезинфицирующего средства с моющим эффектом «Клинстар хлор» производства ЗАО «Санитарная оборона» (Республика Беларусь). Оба испытанных средства проявляют выраженную овоцидную активность в отношении яиц *Ascaris lumbricoides*. Максимальный эффект отмечался у дезинфицирующего средства с моющим эффектом «Клинстар Хлор»: в концентрации 1,0% при экспозиции 30 мин жизнеспособность терялась у 99,6±0,2% яиц аскарид.

Ключевые слова: дезинфицирующее средство, овоцидная активность, аскариды.

Введение. По данным ВОЗ в мире гельминтами, передающимися через почву (геогельминтами), заражено около 1,5 миллиарда человек, или 24% мирового населения. Более 267 миллионов детей дошкольного возраста и более 568 миллионов детей школьного возраста проживают в районах с интенсивной передачей этих паразитов и нуждаются в лечении и профилактике [1].

В Республике Беларусь заболевания гельминтозами чаще всего вызывают представители класса круглых червей — нематод: острицы (*Enterobius vermicularis*), аскариды (*Ascaris lumbricoides*), власоглавы (*Trichuris trichiura*). Согласно официальной статистике в 2019 г. заболеваемость аскаридозом в республике составляла 17,4, трихоцефалезом – 1,4 случаев на 100 тысяч населения. Аналогичный показатель заболеваемости контактным гельминтозом – энтеробиозом за этот же период достиг величины 249,1.

Важным элементом комплекса мероприятий по борьбе с гельминтозами является дегельминтизация объектов внешней среды, направленная на прерывание путей распространения возбудителей и профилактику инвазированности населения и домашних животных. При этом следует отметить, что яйца гельминтов, в частности аскарид (*Ascaris lumbricoides*), в силу своей структуры при благоприятных условиях внешней среды могут сохранять жизнеспособность в течение 7 лет и достаточно устойчивы к дезинфицирующим средствам, выдерживая, например, воздействие хлора в концентрации 500 мг/литр воды [2].

Для уничтожения яиц гельминтов может использоваться ряд химических веществ, например, серная, соляная, азотная, карболовая кислота, креолин, хлорная известь, дихлорэтан, крезол и др. Однако они не являются достаточно эффективными, а их применение небезопасно для людей, животных и внешней среды [3]. Эти обстоятельства обусловили целесообразность разработки новых эффективных дезинфицирующих средств и методов обеззараживания объектов окружающей среды от возбудителей паразитарных заболеваний. Следует также отметить, что разрабатываемые в последние годы дезинфицирующие средства нередко обладают универсальным воздействием на различные типы инфекционных агентов (бактерии, вирусы, гельминты, простейшие), что предполагает изучение эффективности новых дезинфицирующих средств в отношении каждого из них.

Цель исследования: изучение овоцидной активности новых дезинфицирующих средств «Клинстар Хлор» и «Клинстар Хлор Актив» в лабораторных условиях.

Материалы и методы исследования. В работе использовались следующие материалы и методы исследования.

Испытуемые дезинфицирующие средства (изготовитель: ЗАО «Санитарная оборона», Республика Беларусь):

1. Средство, дезинфицирующее «Клинстар хлор актив», ТУ BY 692127919.028-2020, РЦ BY 692127919.048-2020, номер серии А040010420, дата изготовления 04.2020, срок годности – 1 год от даты изготовления.

2. Средство, дезинфицирующее с моющим эффектом «Клинстар хлор», ТУ BY 692127919.028-2020, РЦ BY 692127919.049-2020, номер серии А040010420, дата изготовления 04.2020, срок годности – 1 год от даты изготовления.

Тест-объект патогенного биологического агента (ПБА). Яйца аскариды были получены при препарировании самки аскариды. Незрелые оплодотворенные яйца поместили в 3%-ный раствор формалина в изотоническом растворе натрия хлорида и инкубировали при температуре 27ºС до получения взвеси зрелых яиц аскариды, которая затем использовалась в качестве тест-объекта ПБА. Концентрацию яиц во взвеси определяли с помощью камеры Горяева.

Определение овоцидной активности дезинфицирующих средств проводили в суспензионном тесте (смешивание в соотношении 1:1 суспензии тест-объекта и рабочего раствора дезинфектанта, экспозиция в заданных режимах).

В стерильные стеклянные градуированные центрифужные пробирки отбирали по 5,0 мл рабочей взвеси тест-объекта ПБА, содержащей яйца аскарид в концентрации 2000±50 яиц/мл.

Затем в пробирки добавляли по 5,0 мл раствора на водопроводной питьевой воде дезинфицирующих средств «Клинстар хлор» и «Клинстар хлор актив», в конечной (рабочей) концентрации 0,5% и 1,0%. Содержимое пробирок тщательно суспендировали и оставляли на время экспозиции (45 мин и 30 мин соответственно) при температуре 21-22ºС. По истечении времени экспозиции пробирки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 мин.

Осадок после центрифугирования наносили на предметное стекло, окрашивали раствором метиленового синего (разведение 1:3) и накрывали покровным стеклом.

Соответствующими контролями опытов служили тест-объекты ПБА, содержащие яйца аскарид, к котором вместо рабочего раствора дезинфицирующих средств добавлялся аналогичный объем водопроводной питьевой воды.

Учитывали количественное соотношение и морфологию яиц аскарид в параллельных пробах с использованием дезинфицирующих средств (опытные пробы) и без них (контрольные пробы).

Морфология яиц *Ascaris lumbricoides* в нативных и окрашенных раствором метиленового синего микропрепаратах была исследована методом световой микроскопии (объектив ×8 или ×10, окуляр ×7 или ×10, для детального изучения морфологической структуры использовался объектив ×40). Количество яиц гельминтов подсчитывалось в камере Горяева.

Овоцидную эффективность дезинфицирующих средств рассчитывали по формуле:

$$ОЭ = 100 - \frac{a1\ x\ c1}{a2\ x\ c2}\ x100 - \frac{(P1 - P2)}{n},$$

где:

ОЭ – овоцидная эффективность препарата (%);

а1 – количество живых яиц гельминтов простейших в опыте;

а2 – количество живых яиц гельминтов простейших в контроле;

с1 – количество живых яиц гельминтов, взятых для определения их жизнеспособности, в опыте;

c2 – количество живых яиц гельминтов, взятых для определения их жизнеспособности, в контроле;

P1 – процент погибших яиц гельминтов в опыте;

P2 – процент живых яиц гельминтов в опыте;

n – количество яиц гельминтов, взятых для определения их жизнеспособности в опыте [4].

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты изучения овоцидной активности средства дезинфицирующего с моющим эффектом «Клинстар хлор» и средства дезинфицирующего «Клинстар хлор актив» представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. – Результаты изучения овоцидной активности средства дезинфицирующего с моющим эффектом «Клинстар хлор» (0,5% – 45 мин, 1,0% – 30 мин)

Экспериментальная группа	*Концентрация – экспозиция «Клинстар хлор»*	*Результат исследования (морфологическая идентификация)*
Контроль № 1 (яйца *Ascaris lumbricoides)*	Не применялось	Оболочка яиц двойная, контуры чёткие, без видимых повреждений, внутренняя структура характерна для оплодотворённого яйца аскариды (личинка визуализируется)
Опыт № 1 (яйца *Ascaris lumbricoides)*	0,5% – 45 мин	У 90,1±1,4% яиц оболочка истончённая, разорвана, плазма мутная, разрыхлена. Личинки мертвых яиц и внутреннее содержимое окрашены в синий цвет
Контроль № 2 (яйца *Ascaris lumbricoides)*	Не применялось	Оболочка яиц двойная, контуры чёткие, без видимых повреждений, внутренняя структура характерна для оплодотворённого яйца аскариды (личинка визуализируется)
Опыт № 2 (яйца *Ascaris lumbricoides)*	1,0% – 30 мин	У 99,6±0,2% яиц оболочка истончённая, разорвана, плазма мутная, разрыхлена. Личинки мертвых яиц и внутреннее содержимое окрашены в синий цвет

Приведенные в таблицах 1 и 2 данные свидетельствуют, что оба испытанных средства проявляют овоцидную активность в отношении яиц *Ascaris lumbricoides,* однако степень этой активности различается как в зависимости от применяемого средства, так и режима его применения. Более высокая овоцидная активность выявлена у средства дезинфицирующего с моющим эффектом «Клинстар хлор», оно приводило к гибели 90,1±1,4% и 99,6±0,2% яиц аскарид, в то время как средство дезинфицирующее «Клинстар хлор актив» оказывало аналогичный эффект только на 51,6±4,3% и 78,3±6,4% яиц аскарид в зависимости от режима их применения.

Анализируя результаты исследования можно отметить, что испытанные средства «Клинстар хлор» и «Клинстар хлор актив» имеют существенные общие физико-химические свойства, являясь концентрированными жидкостями от светло желтого до желто-коричневого цвета с запахом хлора, активно действующее вещество (АДВ) у которых гипохлорит натрия (3,5%±1,0% в пересчете на активный хлор). Вместе с тем, в составе дезинфицирующего средства с моющим эффектом «Клинстар хлор» в качестве добавки содержится поверхностно-активное вещество (ПАВ), которое отсутствует в дезинфицирующем средстве «Клинстар хлор актив». Вероятно, именно комбинация АДВ с ПАВ

обуславливает более высокую овоцидную активность средства «Клинстар хлор», по-видимому, вызывая деструкцию внутренней липидсодержащей оболочки яиц аскарид.

Таблица 2. – Результаты изучения овоцидной активности средства дезинфицирующего «Клинстар хлор актив» (0,5% – 45 мин, 1,0% – 30 мин)

Экспериментальная группа	*Концентрация – экспозиция «Клинстар хлор актив»*	*Результат исследования (морфологическая идентификация)*
Контроль № 3 (яйца *Ascaris lumbricoides)*	Не применялось	Оболочка яиц двойная, контуры чёткие, без видимых повреждений, внутренняя структура характерна для оплодотворённого яйца аскариды (личинка визуализируется)
Опыт № 3 (яйца *Ascaris lumbricoides)*	0,5% – 45 мин	У 51,6±4,3% яиц оболочка истончённая, разорвана, плазма мутная, разрыхлена. Личинки мертвых яиц и внутреннее содержимое окрашены в синий цвет
Контроль № 4 (яйца *Ascaris lumbricoides)*	Не применялось	Оболочка яиц двойная, контуры чёткие, без видимых повреждений, внутренняя структура характерна для оплодотворённого яйца аскариды (личинка визуализируется)
Опыт № 4 (яйца *Ascaris lumbricoides)*	1,0% – 30 мин	У 78,3±6,4% яиц оболочка истончённая, разорвана, плазма мутная, разрыхлена. Личинки мертвых яиц и внутреннее содержимое окрашены в синий цвет

Заключение. Проведены испытания овоцидной активности в суспензионном тесте с использованием ряда режимов применения дезинфицирующего средства «Клинстар хлор актив» и дезинфицирующего средства с моющим эффектом «Клинстар хлор» производства ЗАО «Санитарная оборона» (Республика Беларусь).

Установлено, что оба испытанных средства проявляют выраженную овоцидную активность в отношении яиц *Ascaris lumbricoides* во всех использованных режимах.

Показано что наиболее высокая овоцидная эффективность дезинфицирующего средства «Клинстар хлор актив» достигается при рабочей концентрации 1,0% и экспозиции 30 мин, при этом жизнеспособность теряется у 78,3±6,4% яиц гельминтов.

Наиболее высокая овоцидная активность дезинфицирующего средства с моющим эффектом «Клинстар хлор» проявляется в рабочей концентрации 1,0% и экспозиции 30 мин, при этом жизнеспособность терялась у 99,6±0,2% яиц гельминтов.

Результаты проведенных испытаний указывают на перспективу использования новых отечественных дезинфектантов – дезинфицирующего средства «Клинстар хлор актив» и дезинфицирующего средства с моющим эффектом «Клинстар хлор» при дезинвазионных мероприятиях.

Литература

1. Гельминтные инфекции, передающиеся через почву: информ. бюллетень ВОЗ, 2 марта 2020 г. [Электронный ресурс]. – 2020. – Режим доступа: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections. – Дата доступа: 01.12.2020.

2. Первомайский, Г.С. Паразитология человека / Г.С. Первомайский, В.Я. Подолян. – М.: Медицина, 1974. – 250 с.

3. Новиков, Н.Л. Разработка средств и методов обеззараживания животноводческих помещений от возбудителей инвазионных и инфекционных заболеваний: автореф. дис. … канд. вет. наук: 03.00.19 / Н.Л. Новиков. – М., 2004. – 20 с.

4. Методы санитарно-паразитологических исследований: методические указания: утв. Гл. гос. санитар. врачом Рос. Федерации 23.07.2010, МУК 4.2.2661-10. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 63 с.

OVOCIDAL ACTIVITY OF NEW DISINFECTANTS «KLINSTAR CHLOR» AND «KLINSTAR CHLOR ACTIVE»

[1]Karamyshava Y.S., [1]Gudkov V.G., [2]Ladutska V.A., [2]Naumenko A.I., [2]Rogova K.K., [1]Gorbunov V.A.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

[2]Company "Sanitarnaya Oborona", Minsk, Republic of Belarus

The ovocidal activity of the disinfectant "Klinstar chlorine active" and the disinfectant with a washing effect "Klinstar chlorine" produced by Closed joint stock company "Sanitarnaya Oborona" ("Sanitary Defense"), Republic of Belarus, has been studied. Both tested disinfectants exhibit a pronounced ovocidal activity against *Ascaris lumbricoides* eggs. The maximum effect was observed in the disinfectant with the cleaning effect "Klinstar chlorine": at a concentration of 1.0% at an exposure of 30 min, the viability was lost in 99.6±0.2% of Ascaris eggs.

Keywords: disinfectant, ovocidal activity, ascaris.

Поступила 03.12.2020

БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ОТИТАМИ И СИНУСИТАМИ

[1]Таланкина А.С., [2]Еременко Ю.Е., [1]Титов Л.П.

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

Резюме. Формирование бактериальных пленок микроорганизмами играет важную роль в развитии инфекционного процесса. Анатомия ЛОР-органов благоприятна для развития биопленки, и почти в 60% случаев инфекций характеризуются ее присутствием. Цель исследования – охарактеризовать способность к формированию биоплёнок бактерий, выделенных от пациентов с острыми и хроническими отитами и синуситами. Способность 199 штаммов микроорганизмов к формированию биоплёнок исследована с помощью стандартной методики. Среди всех выделенных микроорганизмов, преобладали изоляты *Staphylococcus aureus* (n=54, 27%) и *S. pneumoniae* (n=27, 13,6%). 56,8% приходилось на долю грамположительных бактерий, 43,2% – на долю грамотрицательных микроорганизмов. 181 исследованный штамм способен к образованию биоплёнок с различной способностью: 22 – слабая, 69 – умеренная, 90 – выраженная способность. Результаты исследования свидетельствуют о наличии способности к формированию биопленок у большинства микроорганизмов, выявляемых у пациентов с данными патологиями. Способность микроорганизмов к формированию биоплёнок необходимо учитывать при составлении протокола лечения риносинуситов и отитов.

Ключевые слова: острые отиты, хронические отиты, острые риносинуситы, хронические риносинуситы, биопленки.

Введение. Формирование бактериальных пленок (БП) микроорганизмами играет важную роль в развитии инфекционного процесса. По данным литературы, более 70% инфекций человека (как правило) вызывается бактериями, образующими биопленки [1, 2]. Биопленка представляет собой особый фенотип бактерий, а именно сообщество бактерий, встроенных в матрицу, которую они сами и производят. Бактерии прикреплены друг к другу или к поверхности, на которой паразитирует микроб. Сутью существования биопленки является защита находящихся в ней микроорганизмов от неблагоприятных физических, химических и биологических факторов внешней среды, к которым относятся температурное воздействие, высушивание, ультрафиолетовое излучение, всевозможные химикаты, гуморальные и клеточные факторы иммунной системы [3-5]. Кроме того, биоплёнка служит идеальной средой для обмена генетической информацией между бактериями, включая гены, ответственные за вирулентность и резистентность к антибиотикам. Таким образом, бактерии, находящиеся в биопленках, проявляют более высокую устойчивость и способны выживать и размножаться в период проведения антибактериальной терапии [2].

Анатомия ЛОР-органов благоприятна для развития биопленки, и почти в 60% случаев инфекций характеризуются ее присутствием [6]. Способность к биопленочному процессу наиболее характерна для неинвазивных пневмококковых штаммов, склонных к местной инфекции. Через евстахиеву трубу они могут попадать в среднее ухо, вызывая средний отит. Во всех случаях пневмококковая инфекция сопровождается формированием биопленок. *Staphylococcus spp.,* включая *S. aureus*, вызывают инфекции, связанные с развитием биопленки у пациентов с ослабленным иммунитетом, а также у пациентов с диагнозами средний отит и риносинусит. *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* и *S. saprophyticus* также способны к биопленкообразованию и могут вы-

зывать отиты, особенно в виде микстинфекции. *P. aeruginosa* часто является причиной инфекционной патологии, в том числе и хронических отитов, однако здесь инфицирование происходит, преимущественно, из экзогенных источников. *Haemophilus influenzae* способна вызывать биопленочные инфекции при отитах, однако по некоторым литературным данным, *H. influenzae* отличаются низкой адгезивной способностью. Среди представителей семейства энтеробактерий, вызывающих отиты, способностью к биопленкообразованию обладают *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis* [7-9].

Формирование биопленок в очаге воспаления способствует хронизации инфекционного процесса и сопровождается неудовлетворительными результатами антибиотикотерапии. Предполагается, что даже в фазе биоплёнки, микроорганизмы способны выделять эндотоксины, что усиливает воспаление, а высвобождение из биоплёнки свободных форм бактерий взаимосвязано с периодическими обострениями и рецидивами хронического процесса и также сопровождается неудовлетворительными результатами антибиотикотерапии [10, 11].

Целью исследования является охарактеризовать способность к формированию биоплёнок Грам (+) и Грам (−) бактериями, выделенными от пациентов с острыми и хроническими отитами и синуситами.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования являлось содержимое верхнечелюстных пазух, полученное от 165 пациентов с острыми и хроническими риносинуситами и острыми и хроническими отитами. Забор материала осуществлялся в учреждении здравоохранения «Республиканский научно-практический центр оториноларингологии» в соответствии с инструкцией по применению «Организация микробиологических исследований при внебольничных инфекциях», утвержденной Минздравом Республики Беларусь от 18 ноября 2011 г. № 082-0811. Содержимое в/ч пазух было получено посредством пункции с помощью иглы Куликовского. Нативный материал доставляли в лабораторию в максимально короткие сроки (не позднее 1,5-2 ч после их получения) при комнатной температуре 20-25ºС [12]. Все пациенты до забора материала антибактериальные препараты не применяли.

Количество посевного материала определяли в зависимости от результатов микроскопии. Если в окрашенном по Граму мазке наблюдалось очень большое число микроорганизмов, исследуемый материал перед посевом на плотные питательные среды разводили в соотношении 1:10, 1:100, 1:1000 и 1:10000 с последующим высевом по 100 мкл на сектора питательных сред. Независимо от результатов микроскопического исследования все пробы гноя или экссудата высевались штриховым методом на шоколадный агар для выделения широкого спектра микроорганизмов. Дополнительно производился посев на среду Сабуро для культивирования *Candida spp*. (Химмедсинтез, РБ), среду Эндо для выделения энтеробактерий (HiMedia, Индия) и среду Энтерококк агар для культивирования *Enterococcuss pp*. (HiMedia, Индия), предназначенную для выделения и дифференциации патогенных и условно-патогенных бактерий из различных клинических источников, в том числе и содержимого, полученного из ОНП. Инкубацию проводили в CO_2-инкубаторе в течение 20-24 ч при температуре 35-37ºС при содержании 5% CO_2. Окончательная идентификация микроорганизмов проводилась с помощью бактериологического анализатора Vitek 2 Compact (Biomerieux, Франция) [13].

Для реализации цели настоящего исследования использована методика оценки способности микроорганизмов к формированию БП при помощи 96-луночных полистироловых планшетов и раствора генцианвиолета [1, 3]. Измерение оптической плотности элюированного этанолом красителя осуществлялось на планшетном ридере Bio-Tek EL 800 (Bio-Tek Instruments, США) при длине волны 540 нм. Математическая и статистическая обработка результатов выполнялась средствами Microsoft Excel 2010.

Результаты исследования и их обсуждение. Из 165 пациентов 20,6% (n=34) приходится на острые отиты, 21,2% (n=35) – на хронические отиты, 26,6% (n=44) – на острые риносинуситы, 31,5% (n=52) – на хронические риносинуситы. Всего был определен 31 вид бактерий. Среди исследованных 199 штаммов бактерий, выделенных от пациентов с отитами и синуситами, сильной способностью к биопленкообразованию обладали преимущественно грамположительные бактерии (n=54, 27%). 23 штамма (11,5%) оказались не способны к формированию БП, у 26 штаммов (13%) выявлена слабая, а у 17 (8,5%) штаммов – умеренная способность к формированию биоплёнок. Среди всех микроорганизмов, выделенных от пациентов с отитами и синуситами, преобладали изоляты *S. aureus* (n=54, 27%) и *S. pneumoniae* (n=27, 13,6%). Из всех изолятов, выделенных от пациентов с острыми отитами (n=36, 18%) преобладающими штаммами являлись *S. pneumoniae* (n=20, 55%) и *Pseudomonas aeruginosa* (n=7, 19%). Преобладающими изолятами, выделенными от пациентов с хроническими отитами (n=40, 20,1%) являлись *S. aureus* (n=20, 50%) и *P. aeruginosa* (n=6, 15%). У изолятов, выделенных от пациентов с острыми (n=57, 28,6%) и хроническими (n=66, 33%) риносинуситами преобладающими микроорганизмами являлись *S. aureus* (n=10, 17,5%), *S. epidermidis* (n=9, 15,7%), *K. pneumoniae* (n=5, 8,8%) и *S. aureus* (n=21, 31,8%), *P. aeruginosa* (n=4, 6,1%), *K. oxytoca* (n=4, 6,1%), *E. coli* (n=4, 6,1%) соответственно.

У 181 (88,4%) из исследованных 199 штаммов микроорганизмов выявлена способность к формированию биопленок, в том числе у 90 штаммов (49,7%) выявлена слабая, у 69 (38,1%) – умеренная, а у 22 (12,2%) – выраженная способность. Информация о распределении изолятов, не формирующих биопленки, и формирующих биопленки разной степени выраженности, в зависимости от вида патологии пациентов, от которых они были выделены, представлена в таблице 1.

Таблица 1. – Распределение штаммов бактерий от пациентов с отитами и риносинуситами по способности к формированию биопленки

Патология	Всего изолятов (n)	Способность		S		M		W		N	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Отиты											
Острые отиты	36	32	89	19	53	10	28	3	8	4	11
Хронические отиты	40	33	83	20	50	25	25	3	8	7	18
Синуситы											
Острые риносинуситы	57	50	88	17	34	23	46	10	20	7	14
Хронические риносинуситы	66	61	92	44	72	11	18	6	10	2	8

Примечание: S (strong) – сильное биопленкообразование, M (medium) – среднее биопленкообразование, W (weak) – слабое биопленкообразование, N (negative) – отсутствие биопленкообразования.

Распределение штаммов бактерий от пациентов с отитами и риносинуситами по способности к формированию биопленок представлено на рисунке.

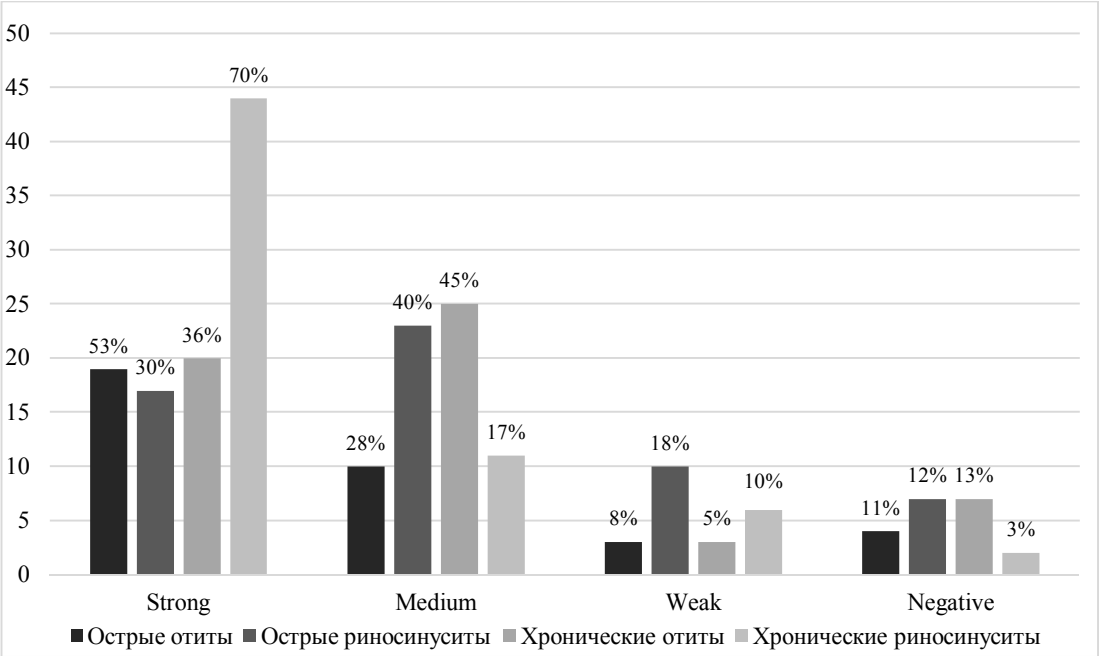


Рисунок. – Распределение штаммов бактерий от пациентов с отитами и риносинуситами по способности к формированию биопленок

Как видно из рисунка, большинство изолятов, выделенных от пациентов с острым отитом, имели сильную способность к биопленкообразованию (n=19, 52,8%), тогда как изоляты, выделенные от пациентов с хроническими отитами в большинстве случаев имели среднюю способность к биопленкообразованию (n=25, 62,5%). Одинаковое количество изолятов имело слабую способность к биопленкообразованию. Большинство изолятов (n=44), выделенных от пациентов с хроническим риносинуситом имели более высокую способность к биопленкообразованию, тогда как изоляты, выделенные от пациентов с острыми риносинуситами в большинстве случаев (n=23, 40,3%) имели среднюю способность к биопленкообразованию. Также, большинство микроорганизмов не являлись биопленкообразователями, а самыми сильными биопленкообразователями являлись изоляты, выделенные от пациентов с хроническим риносинуситом.

В структуре исследованных микроорганизмов 56,8% (n=67) приходилось на долю грамположительных бактерий, 43,2% (n=52) – на долю грамотрицательных микроорганизмов. У острых и хронических отитов (n=76) преобладают грамположительные бактерии в количестве n=50 (65,8%), грамотрицательных бактерий n=26 (34,2%). В риносинуситах доли грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов примерно одинаковые: n=63 (51,2%) и n=60 (48,8%) соответственно.

Среди грамположительных штаммов, выделенных от пациентов с острым отитом (n=24, 66,67%) преобладающим микроорганизмом являлись S. *pneumoniae* (n=20, 83,3%), среди грамотрицательных (n=12, 50%) − *P. aeruginosa* (n=7, 58,3%). Преобладающим грамположительным микроорганизмом, выделенным от пациентов с хроническим отитом (n=26, 65%), являлся *S. aureus* (n=20, 76,9%), а грамотрицательным (n=14, 35%) − *P. aeruginosa* (n=6, 42,86%).

Из всех грамположительных изолятов, выделенных от пациентов с острым риносинуситом (n=30, 52,6%) доминирующими микроорганизмами являлись *S. aureus* (n=10, 33,33%) и *S. epidermidis* (n=9, 30%), а из грамотрицательных (n=27, 47,4%) − *K. pneumoniae* (n=5, 18,5%) и *P. mirabilis* (n=4, 14,8%). У грамположительных изолятов, выделенных от пациентов с хроническими риносинуситами (n=33, 50%) преобладаю-

щими микроорганизмами являлись *S. aureus* (n=21, 63,6%), а у грамотрицательных (n=33, 50%) − *P. aeruginosa* (n=4, 12,1%), *K. oxytoca* (n=4, 12,1%) и *E. coli* (n=4, 12,1%).

Информация о вкладе грамположительных, грамотрицательных бактерий в структуру групп микроорганизмов с разной способностью к формированию биопленок представлена в таблице 2.

Таблица 2. – Распределение выделенных штаммов от пациентов с отитами и риносинуситами штаммов микроорганизмов по способности к формированию биопленок

Патология	Окраска по Граму	Всего изолятов (n)	Способность		S[1]		M[2]		W[3]		N[4]	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Отиты												
Острые отиты	+	24	21	88	13	54	5	21	3	13	3	13
	−	12	11	92	6	50	5	42	0	0	1	0
Хронические отиты	+	26	20	77	12	46	6	23	2	8	6	23
	−	14	13	93	8	57	4	29	1	7	1	7
Синуситы												
Острые риносинуситы	+	30	25	83	7	23	11	37	7	23	5	17
	−	27	25	93	10	37	12	44	3	11	2	7
Хронические риносинуситы	+	33	31	94	22	67	4	12	5	15	2	6
	−	33	30	91	22	67	7	21	1	3	3	9

Как видно из таблицы 2, из всех изолятов, выделенных от пациентов с отитами, сильные биопленкообразователи являются как грамположительными, так грамотрицательными микроорганизмами, тогда как у риносинуситов преобладают грамотрицательные микроорганизмы. Все изоляты, которые были выделены от пациентов с острыми отитами и не имели способности образовывать биопленки являлись грамположительными, в то время как у хронических отитов количество грамотрицательных не образующих биопленки микроорганизмов n=1 (7%). У хронических риносинуситов доли Грам (+) и Грам (−) изолятов, которые являются сильными биопленкообразователями, равны, тогда как у острых риносинуситов преобладают грамотрицательные микроорганизмы.

Выводы. Результаты исследования свидетельствуют о наличии способности к формированию БП у большинства микроорганизмов, выявляемых у пациентов отитами и риносинуситами. Среди всех микроорганизмов, выделенных от пациентов с отитами и синуситами, преобладали изоляты *S. aureus* и *S. pneumoniae*. В структуре исследованных микроорганизмов 56,8% приходилось на долю грамположительных бактерий, 43,2% – на долю грамотрицательных микроорганизмов. У острых и хронических отитов преобладают грамположительные бактерии (65,8%), грамотрицательных бактерий (34,2%). В риносинуситах доли грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов примерно одинаковые: 51,2% и 48,8% соответственно.

У 181 из исследованных 199 штаммов микроорганизмов выявлена способность к формированию биопленок, в том числе у 90 штаммов выявлена слабая, у 69 – умеренная, а у 22 – выраженная способность. 52,8% изолятов, выделенных от пациентов с острым отитом имели сильную способность к биопленкообразованию, тогда как изоляты, выделенные от пациентов с хроническими отитами в большинстве случаев имели среднюю способность к биопленкообразованию (62,5%). 72% изолятов, выделенных от пациентов с хроническим риносинуситом имели более высокую способность к биопленкообразованию, тогда как изоляты, выделенные от пациентов с острыми риносинуситами в 40,3% случаев имели среднюю способность к биопленкообразованию.

Литература

1. Карпова, Е.П. Бактериальные биопленки в оториноларингологии / Е.П. Карпова, Д.А. Тулупов // Педиатрия. – 2012. – № 1. – С. 6-9.

2. Тец, Г.В. Микробные биоплёнки и проблемы антибиотикотерапии / Г.В. Тец // Практическая пульмонология. – 2013. – № 4. – С. 60-64.

3. Смирнова, Т.А. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок / Т.А. Смирнова // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 4. – С. 435-446.

4. Соколова, Т.Н. Микробные биопленки и способы их обнаружения / Т.Н. Соколова // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2014. – № 4. – С. 12-15.

5. Леонов, В.В. Количественная оценка способности условно-патогенных микроорганизмов к образованию биопленки в эксперименте / В.В. Леонов // Клинич. лабораторная диагностика. – 2012. – № 10. – С. 57-59.

6. Свистушкин, В.М. Острый риносинусит – современный взгляд на проблему / В.М. Свистушкин, Е.А. Шевчик // Русский мед. журн. – 2015. – № 9. – С. 643-545.

7. Сакович, А.Р. Риносинуситы / А.Р. Сакович, И.В. Долина. – Минск: БГМУ, 2018. – 24 с.

8. Вознесенский, Н.А. Биопленки – терапевтическая мишень при хронических инфекциях / Н.А. Вознесенский // Пульмонология и аллергология. – 2008. – № 3. – С. 43-44.

9. O'Toole, G.A. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development / G.A. O'Toole, R. Kolter // Mol. Microbiol. – 1998. – Vol. 30, No. 2. – P. 295-304.

10. Donlan, R.M. Biofilms and device-associated infections / R.M. Donlan // Emerg. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 7, No. 2. – P. 277-281.

11. 9. Глушанова, Н.А. Бактериальные пленки в инфекционной патологии человека / Н.А. Глушанова, А.И. Блинов, Н.Б. Алексеева // Клинические и диагностические особенности ведения пациентов, относящихся к контингенту особого внимания. – 2015. – № 2. – С. 30-35;

12. Лобзин, Ю.В. Практика лабораторных исследований при инфекционных заболеваниях / Ю.В. Лобзин. – СПб.: Элби-СПб, 2005. – 275 с;

13. Оториноларингология. Национальное руководство / Ассоц. мед. о-в по качеству, Рос. о-во оториноларингологов; гл. ред. В.Т. Пальчун. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 1024 с.

BIOFILM DEVELOPMENT OF BACTERIA ISOLATED FROM PATIENTS WITH OTITIS AND SINUSITIS

[1]Talankina A.S., [2]Eremenko Yu.E., [1]Titov L.P.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

[2]Republican Center for Research and Practice in Otolaryngology, Minsk, Republic of Belarus

The formation of bacterial films by microorganisms plays an important role in the development of the infectious process. The anatomy of the ENT organs is favorable for the biofilm development, and almost 60% of infections are characterized by its presence. The aim of the study is to characterize the ability to form biofilms of bacteria isolated from patients with acute and chronic otitis and sinusitis. The ability of 199 strains of microorganisms to form biofilms was investigated using a standard technique. Among all isolated microorganisms, *Staphylococcus aureus* (n=54, 27%) and *S. pneumoniae* (n=27, 13.6%) isolates prevailed. 56.8% accounted for gram-positive bacteria, 43.2% - for gram-negative microorganisms. The following different abilities to form biofilms were found in 181 studied strains: 22 – weak, 69 – moderate, 90 – pronounced ability. The results of the study indicate the presence of the ability to form biofilms in most microorganisms detected in patients with these pathologies. The ability of microorganisms to form biofilms must be taken into account when drawing up a protocol for the treatment of rhinosinusitis and otitis.

Keywords: acute otitis, chronic otitis, acute rhinosinusitis, chronic rhinosinusitis, biofilms.

Поступила 22.10.2020

ДОМИНИРУЮЩАЯ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНАЯ РАНЕВАЯ МИКРОФЛОРА И ЕЕ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К КАРБАПЕНЕМАМ И ФТОРХИНОЛОНАМ: РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА 2012-2019 гг.

[1]Титов Л.П., [1]Хархаль А.Н., [1]Горбунов В.А., [2]Левшина Н.Н., [3]Блыга Е.Г., [4]Рябова Г.И., [5]Бонда Н.В., [6]Удовиченко Н.В., [7]Судак С.Ю., [8]Михалюк А.И., [9]Ершова М.В., [10]Буханцова А.Н., [11]Войтик С.Б., [12]Ткач Л.М.

[1]Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

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

[3]Городская клиническая больница скорой медицинской помощи, Минск, Республика Беларусь

[4]Бобруйский зональный центр гигиены и эпидемиологии, Бобруйск, Республика Беларусь

[5]Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Гомель, Республика Беларусь

[6]Витебская городская клиническая больница скорой медицинской помощи, Витебск, Республика Беларусь

[7]Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Брест, Республика Беларусь

[8]Брестский областной противотуберкулёзный диспансер, Брест, Республика Беларусь

[9]Гродненская университетская клиника, Гродно, Республика Беларусь

[10]Витебский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Витебск, Республика Беларусь

[11]Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Республика Беларусь

[12]Гродненский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Гродно, Республика Беларусь

Резюме. В период 2012-2019 гг. из раневого отделяемого выделено 106 836 изолятов бактерий, отмечено увеличение доли грамотрицательной микрофлоры (*Enterobacterales* – 30,6%, *Pseudomonas sp*. – 10,8%, *Acinetobacter sp*. – 7,6%, *Proteus sp*. – 5,7%, *Enterobacter sp.* – 2,8%). Имеет место стабильный рост резистентности к карбапенемам у *A. baumanii* (до 93%), *P. aeruginosa* (до 83%)и *K. pneumoniae* (до 77%). Уровни резистентности к фторхинолонам в наблюдаемый период были экстремально высокими у *A. baumanii* (до 96%), *P. aeruginosa* (до 86%) и *K. pneumoniae* (до 83%). Уровни резистентности *E.coli* из исследуемой группы наименьшие как к карбапенемам (до 50%), так и к фторхинолонам (до 36%).

Ключевые слова: раневая инфекция, грамотрицательная микрофлора, резистентность, карбапенемы, фторхинолоны.

Введение. Раневая инфекция характеризуется развитием определенной клинической картины с проявлением изменений в организме как на местном, так и системном уровне. Большинство видов бактерий, вызывающих раневую инфекцию, являются частью нормальной микрофлоры человека и образуют биопленки [1]. В конце 70-х, начале 80-х годов основная роль в микробиоме раневой инфекции принадлежала грамотрицательным бактериям, однако с конца 80-х и по настоящее время грамположительная флора преобладает [2]. Вместе с тем проблема антибиотикорезистентности как среди грамположительных, так и грамотрицательных бактерий не теряет актуальности. Чрезмерное использование антибиотиков в стационарах вызвало накопление их в природе, формируя резервуары мультирезистентных к антибиотикам бактерий в окружающей среде вне медицинских учреждений [3]. В феврале 2017 г. Всемирная организация здравоохранения опубликовала глобальный список бактерий с определённым профилем резистентности (Global priority pathogens list, global PPL), исследование которых является

приоритетным направлением в планировании научных исследований и создания новых антибиотиков [4]. В список вошли представители 18 родов бактерий, 15 из которых (83%) являются грамотрицательными. Приоритетными являются грамотрицательные бактерии, резистентные к карбапенемам, фторхинолонам, цефалоспоринам 3-го поколения, кларитромицину [4]. Глобальный рост резистентности к карбапенемам связан с распространением штаммов, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра [5] и карбапенемазы (KPC, NDM, OXA-48). Резистентность к фторхинолонам опосредуется мутациями в генах ДНК-гиразы и ДНК-топоизомеразы IV, которые являются мишенью для ципрофлоксацина [6].

Цель работы: оценить роль грамотрицательной микрофлоры в развитии раневой инфекции в хирургических отделениях учреждений здравоохранения Республики Беларусь; определить тренды резистентности *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* и *A. baumanii* к карбапенемам и фторхинолонам.

Материалы и методы исследования. После внедрения в практику здравоохранения программы WHONET для сбора информации и анализа результатов тестирования бактерий к антибиотикам (Приказ МЗ РБ от 16.03.2012 №292) в стране функционирует сеть лабораторий эпиднадзора за УПП [7, 8]. Формирование базы данных на республиканском уровне, контроль и анализ осуществляется в референс-центре мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Материалом для исследования явились изоляты микроорганизмов, полученные в хирургических отделениях учреждений здравоохранения из раневого отделяемого в период 2012-2019 гг. (база данных WHONET, республиканский уровень): 2012 г. – 8 538 изолятов, 2013 г. – 10 776, 2014 г. – 10 696, 2015 г. – 11 250, 2016 г. – 12 378, 2017 г. – 16 935, 2018 г. – 17 721, 2019 г. – 18 542. Для определения процента нечувствительности к антибиотикам учитывались изоляты со значениями, интерпретируемыми как резистентные (R) и умеренно-резистентные (I). Статистическая обработка производилась в программе Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждение.

1. Состав грамотрицательной флоры раневого отделяемого. В период 2012-2019 гг. было выделено 106 836 изолятов бактерий (таблица). Среди грамотрицательной микрофлоры преобладали представители семейства *Enterobacterales* (30,6% от всех выделенных изолятов), *Pseudomonas sp*. (10,8%), *Acinetobacter sp*. (7,6%), *Proteus sp*. (5,7%) и *Enterobacter sp.* (2,8%). За восьмилетний период наблюдения отмечена тенденция к увеличению доли *E. coli* и *K. pneumoniae*, выделяемых из раневого отделяемого с 6,6% в 2012 г. до 12,2% в 2019 г. (*E. coli*) и с 4,1% до 10,1% (*K. pneumoniae*). В то же время наблюдался рост доли *P. aeruginosa* с 9,4% в 2012 г. до 12,3% в 2015 г. с последующим снижением до 8,5% в 2019 г. Доля *A. baumanii* практически не изменилась, в среднем составляя 6,9%. *P. aeruginosa* и *A. baumanii* чаще ответственны за развитие инфекционных осложнений у пациентов на фоне сопутствующих заболеваний (диабет, атеросклероз) [9], при тяжёлых термических травмах [5].

2. Резистентность к карбапенемам. В соответствии с global PPL [4], карбапенем-резистентные *Enterobacterales sp.*, *A. baumanii* и *P. aeruginosa* входят в список 1 – критический уровень. На рисунке 1 представлены уровни резистентности грамотрицательных бактерий, выделенных из раневого отделяемого, к меропенему и имипенему. Наблюдались высокие уровни резистентности *A.baumanii* к карбапенемам с тенденцией к росту для меропенема и с незначительным снижением (до 75%) в 2015-2016 гг. к имипенему. Наиболее частым механизмом формирования резистентности к карбапенемам у *P.aeruginosa* является утрата порина OprD внешней мембраны в связи с мутациями в соответствующем гене [7] и продукция метало-β-лактамаз [5]. Уровни резистентности *P.aeruginosa* к карбапенемам высокие, к меропенему незначительно выше, чем к имипенему –

от 70% и 60% соответственно. *K.pneumoniae* способна продуцировать широкий спектр различных β-лактамаз, что объясняет резистентность к β-лактамам, в т.ч. карбапенемам [5]. С 2014 г. отмечено резкое увеличение уровня резистентности *K.pneumoniae* к карбапенемам, в то время как резистентность *E.coli* существенно упала в период 2012-2016 гг. с последующим подъёмом к 2018 г. и падению в 2019 г. Таким образом, резистентными к карбапенемам явились лишь менее трети изолятов *E.coli.*

Таблица. – Состав грамотрицательной раневой микрофлоры хирургических отделений Республики Беларусь в 2012-2019 гг.

Вид бактерии	**Годы наблюдения**								**Итого**
	2012	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**	**2019**	
Pseudomonas aeruginosa	805 9,4%	1240 11,5%	1167 10,9%	1384 12,3%	1422 11,5%	1840 10,9%	1833 10,3%	1576 8,5%	*11267* *10,5%*
Escherichia coli	564 6,6%	896 8,3%	1027 9,6%	969 8,6%	1188 9,6%	1989 11,7%	2242 12,7%	2261 12,2%	*11136* *10,4%*
Klebsiella pneumoniae	353 4,1%	517 4,8%	636 5,9%	730 6,5%	1050 8,5%	1658 9,8%	1829 10,3%	1878 10,1%	*8651* *8,1%*
Acinetobacter baumanii	556 6,5%	718 6,7%	770 7,2%	834 7,4%	882 7,1%	1032 6,1%	1252 7,1%	1330 7,2%	*7374* *6,9%*
Proteus mirabilis	314 3,7%	469 4,4%	491 4,6%	468 4,2%	562 4,5%	805 4,8%	800 4,5%	1103 5,9%	*5012* *4,7%*
Enterobacter cloacae	384 4,5%	296 2,7%	253 2,4%	263 2,3%	255 2,1%	285 1,7%	238 1,3%	380 2,0%	*2354* *2,2%*
ИТОГО:	**8 538**	**10 776**	**10 696**	**11 250**	**12 378**	**16 935**	**17 721**	**18 542**	**106 836**

3. Резистентность к фторхинолонам. В соответствии с клиническим протоколом диагностики и лечения пациентов с хирургической инфекцией кожи и мягких тканей в амбулаторных условиях (Приказ МЗ РБ от 28.06.2013 №749) фторхинолоны применяют для лечения нозологических форм инфекций L02, L03, L05, L73, L98 (МКБ-10). На рисунке 2 представлены уровни резистентности грамотрицательных бактерий, выделенных из раневого отделяемого, к ципрофлоксацину и левофлоксацину. Наблюдались крайне высокие уровни резистентности *A. baumanii* к фторхинолонам от 89% к ципрофлоксацину в 2013 г. и 2015 г. и от 84% к левофлоксацину в 2012 г. Уровни резистентности *P. aeruginosa* к фторхинолонам высокие – до 86% к левофлоксацину (2018 г.) и до 79% к ципрофлоксацину (2015 г.). Резистентность *K. pneumoniae* стабильно высокая с 2012 г. к ципрофлоксацину (в среднем 72%) и годом позже к левофлоксацину (75%). Среди грамотрицательной микрофлоры раневого отделяемого резистентность *E. coli* к фторхинолонам существенно ниже – в среднем 29% к ципрофлоксацину и 28% к левофлоксацину.

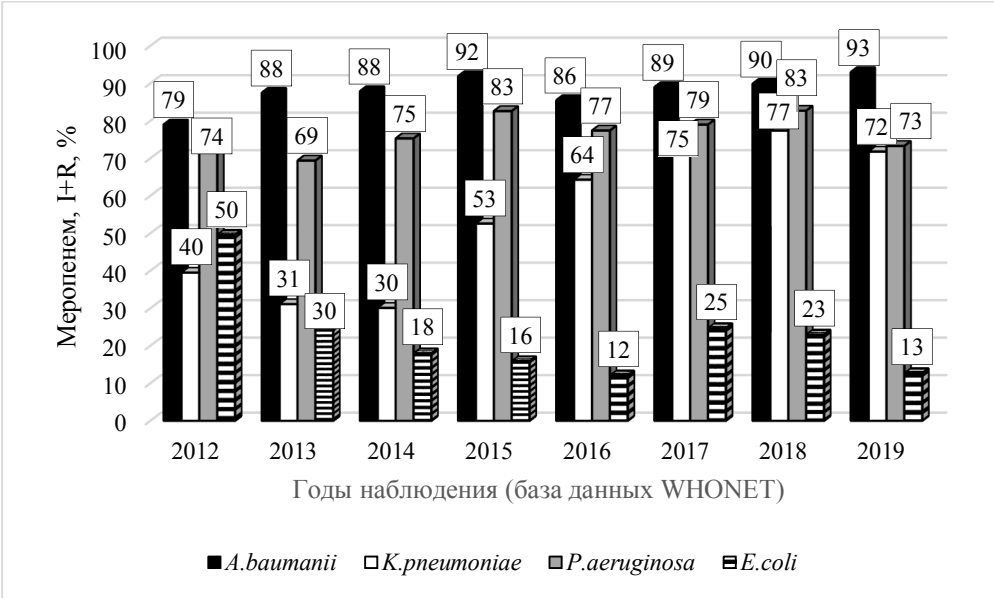
Выводы.

1. За анализируемый период отмечено прогрессивное увеличение доли представителей грамотрицательной микрофлоры (*Enterobacterales sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*) в этиологии раневой инфекции с 40,5% в 2012 г. до 52,7% в 2019 г.

2. Имеет место стабильный рост резистентности к карбапенемам у *A. baumanii* (от 75% к имипенему в 2015 г. до 93% к меропенему и имипенему в 2019 г.) и *P. aeruginosa* (от 61% к имипенему в 2016 г. до 83% к меропенему в 2015 и 2018 гг.). Уровень резистентности *K. pneumoniae* к карбапенемам резко увеличился с 30-40% в 2012-2014 гг. до 70-80% в 2015-2019 гг., в то время как резистентными к карбапенемам явились лишь менее трети изолятов *E. coli.*

3. Уровни резистентности *A. baumanii* к фторхинолонам в наблюдаемый период были экстремально высокими и находятся в пределах 84-95%, *P. aeruginosa* – 69-86%, *K. pneumoniae* – 45-83%. Наименьшие уровни резистентности для *E. coli* находились в пределах 14-35%.

А.



Б.

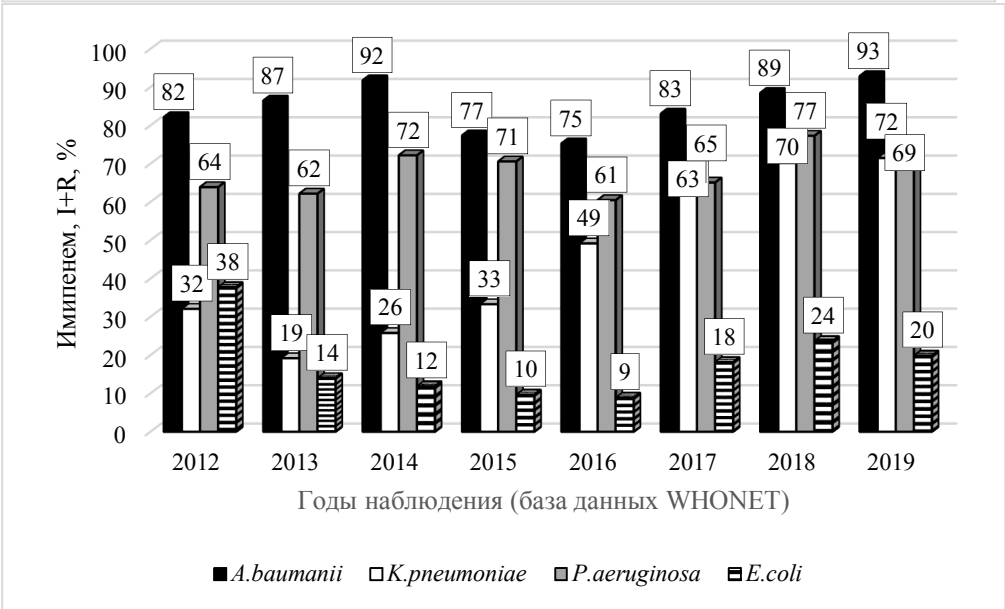
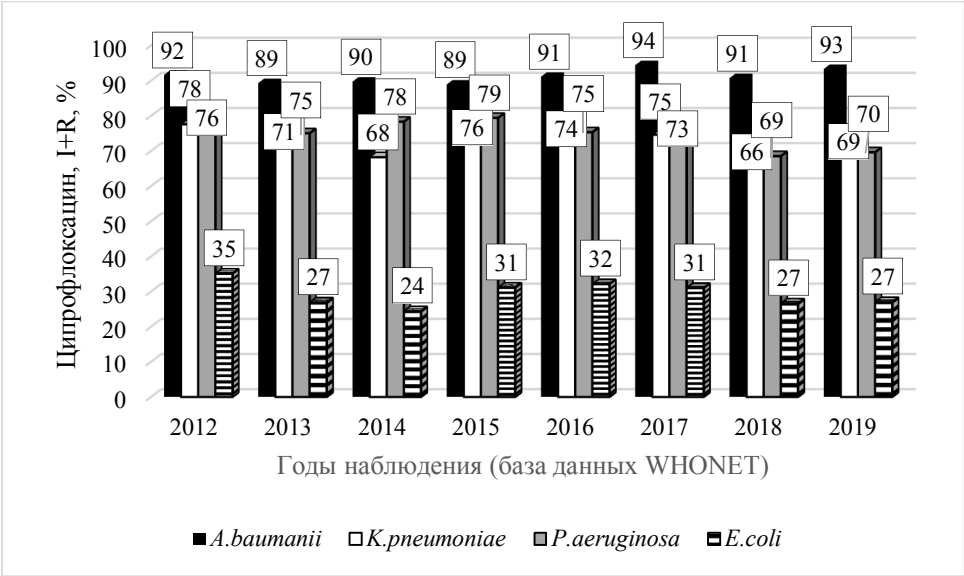


Рисунок 1. – Резистентность грамотрицательных микроорганизмов, выделенных из раневого отделяемого, к карбапенемам (А. – меропенем, Б. – имипенем)

А.



Б.

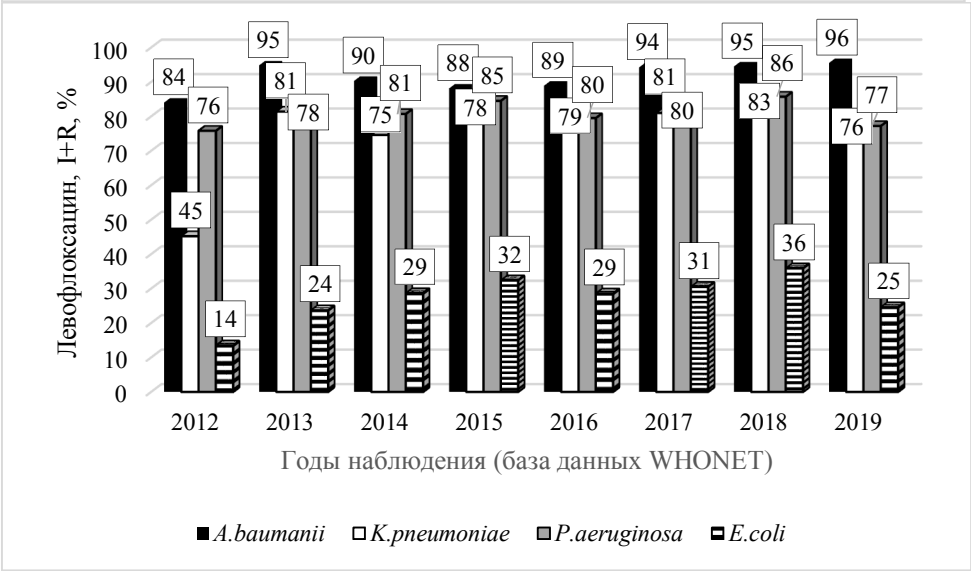


Рисунок 2. – Резистентность грамотрицательных микроорганизмов, выделенных из раневого отделяемого, к фторхинолонам (А. – ципрофлоксацин, Б. – левофлоксацин)

Литература

1. Skin microbiota in obese women at risk for surgical site infection after cesarean delivery / K.M. Rood [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8, No. 1. – P. 1–8.

2. Федянин, С.Д. Мониторинг этиологической структуры возбудителей у пациентов с гнойными ранами / С.Д. Федянин // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2020. – Т. 19, № 4. – С. 40-45.

3. Антибиотикорезистентность энтеробактерий водных экосистем / А.В. Тришина [и др.] // Вода: химия и экология. – 2019. – № 1-2. – С. 120-125.

4. WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Electronic resource] / WHO. – Mode of access: http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/. – Date of access: 07.10.2020.

5. Гординская, Н.А. Карбапенемрезистентные грамотрицательные бактерии в структуре раневой ожоговой микрофлоры / Н.А. Гординская, Е.В. Сабирова, Н.В. Абрамова // Медицинский альманах. – 2018. – Т. 55, № 4. – С. 34-37.

6. Bhatnagar, K. The mutational landscape of quinolone resistance in *Escherichia coli* / K. Bhatnagar, A. Wong // PloS One. – 2019. – Vol. 14, No. 11. – P. e0224650.

7. Тренды резистентности к антибиотикам возбудителей инвазивных бактериальных заболеваний: микробиологический мониторинг 2012-2017 гг. / Л. Титов [и др.] // Здравоохранение. – 2019. – № 7. – С. 5-16.

8. Микрофлора нижних отделов дыхательных путей и резистентность к антибиотикам у детей: результаты мониторинга 2016-2017 гг. / Л.П. Титов [и др.] // Здравоохранение. – 2020. – № 5. – С. 5-16.

9. Павленко, И.В. Результаты мониторинга динамики и антибиотикорезистентности микрофлоры при выполнении свободной кожной пластики в общехирургическом стационаре / И.В. Павленко, В.В. Кичин, А.В. Шахов // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2019. – Т. 70, № 2. – С. 126-129.

DOMINANT GRAM-NEGATIVE WOUND MICROFLORA AND ITS RESISTANCE TO CARBAPENEMS AND FLUOROQUINOLONES: MONITORING RESULTS FOR 2012-2019

[1]Titov L.P., [1]Kharkhal H.N., [1]Gorbunov V.A., [2]Levshina N.N., [3]Blyga E.G., [4]Ryabova G.I., [5]Bonda N.V., [6]Udovichenko N.V., [7]Sudak S.Yu., [8]Mikhalyik A.I., [9]Ershova M.V., [10]Bukhantseva A.N., [11]Voitik S.B., [12]Tkach L.M.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

[2] Minsk City Center for Hygiene and Epidemiology, Minsk, Republic of Belarus

[3]City Clinical Emergency Hospital, Minsk, Republic of Belarus

[4]Bobruisk Zonal Center for Hygiene and Epidemiology, Bobruisk, Republic of Belarus

[5]Gomel Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Gomel, Republic of Belarus

[6]Vitebsk City Clinical Hospital of Emergency Care, Vitebsk, Republic of Belarus

[7]Brest Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Brest, Republic of Belarus

[8]Brest Regional Tuberculosis Dispensary, Brest, Republic of Belarus

[9]Grodno University Hospital, Grodno, Republic of Belarus

[10]Vitebsk Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Vitebsk, Republic of Belarus

[11]Minsk Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus

[12]Grodno Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Grodno, Republic of Belarus

For the period of 2012-2019 106 836 bacterial isolates were isolated from the wound discharge from surgery departments in Belarus. An increase in the proportion of gram-negative microflora was noted (*Enterobacterales* – 30.6%, *Pseudomonas sp.* – 10.8%, *Acinetobacter sp.* – 7.6%, *Proteus sp.* – 5.7%, *Enterobacter sp.* – 2.8%). There is a stable increase in resistance to carbapenems in *A. baumanii* (up to 93%), *P. aeruginosa* (up to 83%), and *K. pneumoniae* (up to 77%). The levels of resistance to fluoroquinolones during the observed period were extremely high in *A. baumanii* (up to 96%), *P. aeruginosa* (up to 86%), and *K. pneumoniae* (up to 83%). The levels of resistance of *E.coli* from the study group are the lowest to carbapenems (up to 50%) and fluoroquinolones (up to 36%).

Keywords: wound infection, gram-negative microflora, antimicrobial resistance, carbapenems, fluoroquinolones.

Поступила 12.10.2020

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРА ВОСПАЛЕНИЯ TREM-1 МОНОЦИТАМИ ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ И СЕПТИЧЕСКИМ ШОКОМ

[1]Трусевич М.О., [1]Титов Л.П, [2]Горбич Ю.Л., [3]Сирош Ю.А.

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

[2]Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

[3]Учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Изучен характер экспрессии триггерных рецепторов TREM-1 на поверхности моноцитов и на уровне генов, дана оценка корреляции с уровнем растворимой формы TREM-1 в сыворотки крови пациентов с сепсисом и септическим шоком. Выявлено достоверное снижение процентного содержания TREM-1 на моноцитах, индекса MFI и экспрессия гена у пациентов с сепсисом и септическим шоком. Показано достоверное увеличение sTREM-1 в сыворотке крови пациентов с сепсисом и септическим шоком. Значения уровня sTREM-1 обратно коррелировали с показателями %TREM-1 на моноцитах и индексом MFI ($p<0,05$) у пациентов с сепсисом.

Ключевые слова: моноциты, TREM1, sTREM1, проточная цитометрия, экспрессия гена

Введение. Сепсис – серьезная проблема здравоохранения. На сепсис приходится большая часть госпитализаций пациентов в отделения интенсивной терапии и, соответственно, финансовых затрат. Несмотря на использование новейших методов лечения данного заболевания уровень смертности по-прежнему высок и составляет 25% и 50% при тяжелом сепсисе и септическом шоке соответственно [1]. Факторы, способствующие увеличению числа случаев сепсиса, включают пожилой возраст, нарушения функции иммунной системы, расширение выполнения инвазивных процедур, множественные сопутствующие хронические заболевания пациента и антибиотикорезистентность патогенов. Ранняя диагностика сепсиса и оценка степени тяжести пациента являются важными составляющими для своевременного начала комплексного лечения, тем самым снижая тяжесть заболеваемости и смертность от сепсиса. Поэтому актуальным остаются вопросы по выявлению сепсис-ассоциированных биомаркеров. Наиболее часто используемыми и широко доступными биомаркерами сепсиса являются С-реактивный белок и прокальцитонин. Концентрация С-реактивного белка в сыворотке крови свыше 87 мг/л указывает на наличие инфекции с чувствительностью 93,4% и специфичностью 86,1%, а ее комбинация с лихорадкой более 38,2ºС повышает специфичность до 100%. Повышение уровня прокальцитонина свыше 0,25 мкг/л указывает на развитие инфекционного процесса [2].

В последнее время в проблеме патофизиологии сепсиса особое внимание уделяется изучению семейства триггерных рецепторов, экспрессируемых на миелоидных клетках (TREM). Эти рецепторы экспрессируются на плазматической мембране миелоидных клеток, включая нейтрофилы, моноциты, макрофаги, остеокласты и дендритные клетки, а также на мегакариоцитах и тромбоцитах [3]. Данное семейство составляют непосредственно TREM (TREM-1-4, pDC-TREM) и TREM-подобные транскрипты (TREML-1-4), кодируемые генами, расположенными на 6p21.1 хромосоме человека [4]. TREM представляют собой типичные мембранные белки с одним внеклеточным Ig-подобным доменом V-типа, трансмембранной областью, содержащей заряженные остатки лизина, и коротким цитоплазматическим хвостом, лишенным сигнальных мотивов. В отличие от TREM, TREML обладают иммунорецепторным доменом внутри

внутриклеточного хвоста, состоящим из ингибиторного мотива на основе тирозина (ITIM), который является ингибиторным членом семейства TREM [4, 5].

TREM-1 (CD354) – первый идентифицированный и наиболее хорошо охарактеризованный член семейства TREM и важный регулятор иммунных ответов миелоидных клеток. Различают две формы этого белка – мембраносвязанную и растворимую (sTREM-1). TREM-1 является ключевым модулятором многих факторов врожденного иммунитета и может усиливать инициируемые толл-подобными рецепторами ответы на микробные стимулы, усиливая воспалительный ответ за счет взаимодействия с адаптерным белком, ДНКХ-активирующим белком 12 кДа (DAP12) [6]. Из-за его ключевой роли в усилении воспалительного ответа, TREM-1 был признан в качестве важного регулятора врожденного иммунитета при сепсисе, септическом шоке, аутоиммунном артрите, хронических воспалительных заболеваниях и воспалительных заболеваниях кишечника [4-6].

Растворимая форма TREM-1 (sTREM-1) представляет собой гликозилированный пептид массой 27 кДа, который рассматривается как маркер, с помощью которого можно дифференцировать инфекционный системный воспалительный ответ от неинфекционного, особенно когда это связано с бактериемией [4]. Клиническая значимость sTREM-1 была подтверждена в нескольких исследованиях, в которых sTREM-1 был обнаружен у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, язвенной болезнью, тяжелым сепсисом, септическим шоком [1, 6]. В настоящее время sTREM-1 рассматривается в качестве диагностического и прогностического биомаркера у пациентов с септическим шоком и неонатальным сепсисом.

Современная концепция сепсиса выделяет две стадии заболевания: состояние избыточной активации («фаза гипервоспаления») и состояние иммунодефицита («фаза иммунопаралича»). Роль TREM-1 хорошо описана при начальной стадии септического состояния пациентов и весьма мало данных о функции этого рецептора на стадии иммунопаралича. Поэтому **целью работы** было изучить характер экспрессии молекулы TREM-1 как на поверхности моноцитов, так и на уровне генов, и дать оценку корреляции с уровнем растворимой формы TREM-1 в сыворотки крови пациентов с сепсисом и септическим шоком на 3-4 день заболевания.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования была кровь донорская неопробированная (ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий») и кровь от пациентов с диагнозом сепсис и септическим шоком (УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи» и УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска). Всего было получено 65 образцов периферической крови: 28 образцов крови от доноров, 31 образец крови от пациентов с диагнозом сепсис и 6 образцов крови от пациентов с диагнозом септический шок.

Уровень экспрессии TREM-1 на моноцитах и среднюю интенсивность флюоресценции (MFI) определяли методом проточной цитометрии по стандартной методике. Цельную кровь окрашивали моноклональным антителом anti-human CD354-APC (TREM1) клон TREM-26 (BioLegend, США). После инкубации в течение 15 минут образец лизировали лизирующим раствором RBC Lysis Buffer (BioLegend, США). Оставшиеся лейкоциты промывали после лизиса фосфатно-солевым буфером (ФСБ), pH 7,2 (Capricorn Scientific GmbH, Германия). После восстановления в ФСБ клетки анализировали с помощью проточного цитофлюориметра FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с гейтингом для моноцитов на основе их характерного прямого и бокового светорассеяния. Для корректной настройки параметров компенсации для каждой группы образцов готовили single-stained контроли. Данные анализировали при помощи программы FACSDiva версии 7.

Экспрессию гена TREM1 определяли методом ПЦР в режиме реального времени. Венозную кровь с ЭДТА наслаивали на градиент плотности Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, США) и центрифугировали в течение 20 минут при 400 g. Четко обозначенное кольцо мононуклеаров отбирали на границе раздела слоев градиента и клетки дважды отмывали ФСБ. Разделение лимфоцитов и моноцитов проводили по способности клеток моноцитарно-макрофагального ряда прилипать к пластику. Для этого суспензию мононуклеаров культивировали в среде питательной Игла минимальная МЕМ, содержащей 20% сыворотку эмбриона коров, при 37ºС в 12-луночных планшетах. Через 40 мин неприлипшие клетки собирали, а прилипшие снимали со дна планшета охлажденным (4-6ºС) раствором Версена. Полученные моноциты отмывали дважды ФСБ, подсчитывали в камере Горяева и оценивали их жизнеспособность с помощью трипанового синего. Для получения комплементарной ДНК моноцитов вначале проводили процедуру выделения мРНК клеток методом фенол-хлороформной экстракции. кДНК получали с помощью набора для обратной транскрипции (Ревертаза-М-MuLV-50, РНПЦ ЭМ, РБ) в соответствии с инструкцией производителя. Для определения концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрические исследования (NanoDrop 1000, Thermo scientific, США), при этом определяли отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (А260/280). Образцы кДНК хранили при -80ºС до проведения анализа.

ПЦР в режиме реального времени осуществляли с использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I («Синтол», РФ). При приготовлении реакционной смеси использовали следующие объемы компонентов в расчете на одну пробу: 2,5 мМ dNTP (2,5 мкл), 10х ПЦР буфер с SYBR Green (2,5 мкл), 25 мМ $MgCl_2$ (2,5 мкл), смесь праймеров10 пкмоль/мкл каждого (1 мкл), 5 Е/мкл ДНК-полимераза (0,2 мкл), dd H_2O до 25 мкл. Праймерами для TREM1 были: прямой 5'-AGTTACAGCCCAAAACATGC-3' и обратный 5'-CAGCCCCCACAAGAGAATTA-3' и для β2-микроглобулина (B2M): прямой 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3' и обратный 5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3'. Каждый образец амплифицировали в трех повторностях в режиме 5 мин 95ºС, с последующими 40 циклами: 30 с – 95ºС, 30 с – 57ºС, 30 с – 72ºС. Для определения количества и специфичности полученных продуктов ПЦР был проведен анализ кривых плавления, который показал наличие одно пика во всех реакциях, что свидетельствует о высокой специфичности реакции ПЦР в режиме реального времени. Значение порогового цикла (C_T) рассчитывали как среднее значение трех повторностей каждого образца. Для выравнивания уровня экспрессии гена TREM1 в образцах рассчитывали параметр $\Delta\Delta C_T$ по формуле ΔC_T (TREM1) минус ΔC_T (B2M), где ΔC_T – среднее значение повторностей порогового значения, исследуемых генов. Для количественной оценки уровня экспрессии использовали параметр $2^{-\Delta\Delta C_T}$, отражающий уровень экспрессии гена TREM1 в исследуемых образцах.

Уровень растворимой формы TREM1 (sTREM1) в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческой тест-системы (Human sTREM1 ELISA Kit, Fine Test, Китай).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica версии 10. Для сравнения двух независимых выборок применяли U-критерий Манна-Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p<0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Все пациенты, включенные в исследование, были разделены на две группы: пациенты с сепсисом (n=31) и пациенты с септическим шоком (n=6). В группе с сепсисом больше половины составили мужчины (54,8%), женщины – 45,2%. В группе с септическим шоком мужчины составили 33,3%,

а женщины 66,7%. Возраст в первой группе варьировал от 19 до 89 лет, а во второй – от 20 до 74 лет. Детальная характеристика пациентов представлена в таблице.

Таблица. – Характеристика обследованных пациентов

Показатель	*Клинический диагноз*	
	Сепсис, n=31	*Септический шок, n=6*
Средний возраст M±σ, лет	57,1±19,9	49,3±19,6
Мужчины/женщины (абс/%)	17/14 (54,8/45,2%)	2/4 (33,3/66,7%)
Летальность (абс/%)	9 (29%)	2 (33%)

При изучении процентного содержания TREM-1 (CD354) позитивных моноцитов, было выявлено достоверное снижение показателя как в группе пациентов с сепсисом (78,88±2,07%, $p<0,05$), так и в группе с септическим шоком (78,90±5,09%, $p<0,05$) в сравнении с данными здоровых лиц. Данный показатель у доноров составил 89,99±0,48% (рисунок, A). Также выявлено, что имеются достоверные отличия ($p<0,05$) экспрессии данной молекулы, измеренной по средней интенсивности флюоресценции (MFI) TREM-1 на моноцитах. Показатель MFI TREM-1 на моноцитах был ниже и у пациентов с сепсисом (6,45±0,50) в сравнении с контрольной группой (8,09±0,31) (рисунок, B). У пациентов с септическим шоком индекс MFI составил 6,87±1,18 ($p>0,05$).

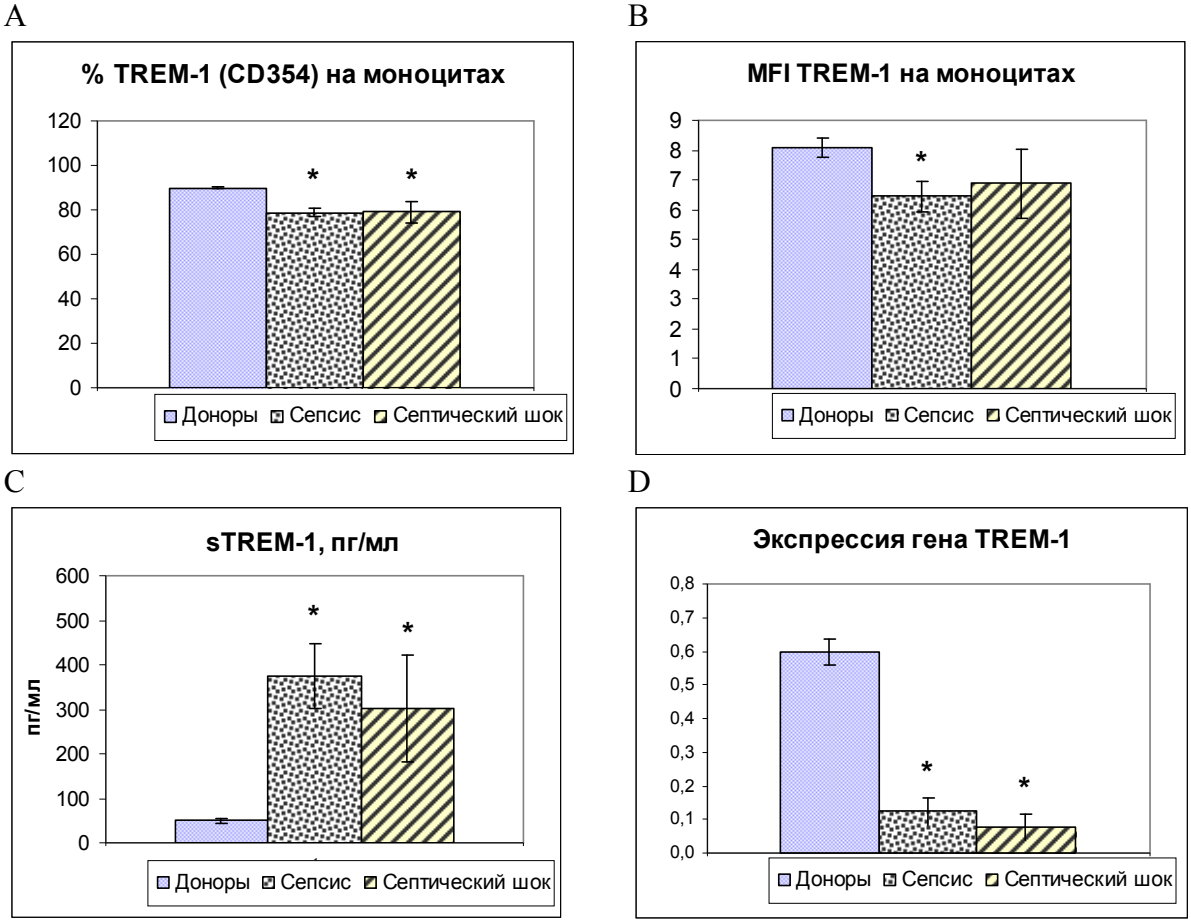


Рисунок. – Уровни экспрессии TREM-1: A) относительное содержание TREM-1 (CD354) позитивных моноцитов; B) интенсивность флюоресценции молекулы на мембране моноцитов; C) количественное содержание растворимой формы sTREM-1; D) уровень экспрессии гена TREM-1

Было исследовано количественное содержание растворимой формы TREM-1 в сыворотке крови. sTREM-1 образуется либо в результате альтернативного сплайсинга мРНК, либо в результате протеолитического расщепления молекулы, опосредованного матриксной металлопротеиназой [7]. Исследования показали достоверное увеличение ($p<0,05$) уровня sTREM-1 в сыворотке крови пациентов с сепсисом и септическом шоком, который составил 373,81±72,35 пг/мл и 443,55±119,23 пг/мл соответственно. Уровень sTREM-1 в сыворотке крови доноров составил 50,09±5,90 пг/мл (рисунок, C). Данные о статистически повышенном содержании растворимой формы TREM-1 указывают на высокую интенсивность процессов протеолиза и, вероятно, цитолиза. Значения уровня sTREM-1 обратно коррелировали с относительным содержанием TREM-1 положительных моноцитов и индексом флюоресценции MFI ($p<0,05$). Для пациентов с сепсисом коэффициенты корреляции Пирсона составили -0,825 для (%)TREM-1 положительных моноцитов и -0,626 для показателя количественной иммунофлюоресценции (MFI) на моноцитах. У пациентов с септическим шоком коэффициент корреляции Пирсона для значений %TREM-1/sTREM-1 составил -0,956, что также говорит о наличии сильной обратной зависимости.

При изучении экспрессии гена TREM-1 моноцитами было показано достоверное снижение в 4,8 раза у пациентов с сепсисом (0,12±0,04) и в 7,7 раза у пациентов с септическим шоком (0,08±0,04) по сравнению с контрольной группой (0,60±0,13) (рисунок, D). Выявленные в ходе исследования изменения относительных и количественных показателей TREM-1 свидетельствуют о серьезном вовлечении клеток системы мононуклеарных фагоцитов в иммунобиологические процессы при сепсисе.

Исследования последних лет показали, что экспрессия TREM-1 может регулироваться многими стимулами. Повышение уровня TREM-1 на поверхности и/или высвобождение sTREM-1 были продемонстрированы как в моделях на мышах, так и на человеческих моноцитах/макрофагах *in vitro* в ответ на бактериальные и вирусные стимулы в первые сутки наблюдения [6, 7]. Так как в нашем исследовании забор крови у пациентов производился на 3-4 день от момента заболевания, то снижение экспрессии гена и TREM1 на поверхности моноцитов, а также индекса MFI, может свидетельствовать о том, что в каскаде воспалительной реакции имеются стимулы, которые предотвращают активацию рецептора TREM-1, инициирующего воспаление. Так, в работе Marioli A. с соавт. [8], показано, что слабая экспрессия гена влечет за собой низкую интенсивность синтеза молекулы белка и его экспрессии на моноцитах, что в дальнейшем приводило к неблагоприятным исходам. С другой стороны, сниженное содержание данного рецептора на мембране моноцитов может свидетельствовать о выбросе в периферическую кровь значительных количеств незрелых клеток крови, характеризующихся низкой экспрессией TREM-1. В работе Raggi F. с соавт. [7] выявлено, что sTREM-1 функционирует как рецептор-ловушка, изолируя лиганд TREM-1 и предотвращая его связывание с мембранной формой TREM-1, тем самым снижая активацию моноцитов и, соответственно, экспрессию гена.

Заключение. С момента открытия TREM-1 в 2000 г. был достигнут значительный прогресс в понимании его биологических эффектов и взаимодействия с другими рецепторами, ответственными за воспаление. Наше исследование показало, что TREM-1 является одним из ключевых модулятором врожденного иммунитета в ответ на инфекционный агент. Таким образом, соотношение изменения процентного содержания TREM-1 на моноцитах, индекса MFI, экспрессии гена и концентрации sTREM-1 в сыворотке крови пациентов с сепсисом и септическим шоком могут также служить индикатором активности и тяжести заболевания, что требует дальнейших исследований в этой области.

Литература

1. Stelmasiak, M. Infection-induced innate antimicrobial response disorders: from signaling pathways and their modulation to selected biomarkers / M. Stelmasiak, R. Słotwiński // Cent. Eur. J. Immunol. – 2020. – Vol. 45, No. 1. – P. 104-116.

2. Сепсис: диагностика и подходы к антибактериальной и поддерживающей терапии: учеб.-метод. пособие / И.А. Карпов [и др.]. – Минск: БГМУ, 2014. – 46 с.

3. Ford, J.W. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease / J.W. Ford, D.W. McVicar // Curr. Opin. Immunol. – 2009. – Vol. 21, No. 1. – P. 38-46.

4. TREM receptors connecting bowel inflammation to neurodegenerative disorders / G. Natale [et al.] // Cells. – 2019. – Vol. 21, No. 8. – P. 1124-1130.

5. Pelham, C.J. Triggering receptor expressed on myeloid cells receptor family modulators: a patent review / C.J. Pelham, A.N. Pandya, D.K. Agrawal // Expert. Opin. Ther. Pat. – 2014. – Vol. 24, No. 12. – P. 1383-1395.

6. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 signaling: protective and pathogenic roles on streptococcal toxic-shock-like syndrome caused by *Streptococcus suis* / L. Han [et al.] // Front. Immunol. – 2018. – Vol. 21, No. 9. – P. 570-577.

7. Raggi, F. Targeting mononuclear phagocyte receptors in cancer immunotherapy: new perspectives of the triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) / F. Raggi, M.C. Bosco // Cancers (Basel). – 2020. – Vol. 12, No. 5. – P. 1330-1337.

8. Early changes of the kinetics of monocyte trem-1 reflect final outcome in human sepsis / A. Marioli [et al.] // BMC Immunol. – 2014. – Vol. 23, No. 15. – P. 580-585.

EXPRESSION OF THE INFLAMMATION MARKER TREM-1 BY MONOCYTES OF PATIENTS WITH SEPSIS AND SEPTIC SEPSIS

[1]Trusevich M.O., [1]Titov L.P., [2]Gorbich Yu.L., [3]Sirosh Yu.A.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

[2]Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

[3]Minsk City Emergency Hospital, Minsk, Republic of Belarus

The character of TREM-1 expression was studied both on the surface of monocytes and at the gene level, and the correlation with the level of the soluble form of TREM-1 in the serum of patients with sepsis and septic shock was assessed. A significant decrease in the percentage of TREM-1 on monocytes, MFI index, and gene expression in patients with sepsis and septic shock was revealed. A significant increase in sTREM-1 in the blood serum of patients with sepsis and septic shock was shown. The sTREM-1 values were inversely correlated with the %TREM-1 on monocytes and the MFI index ($p<0.05$) in patients with sepsis.

Keywords: monocytes, TREM-1, sTREM-1, flow cytometry, gene expression.

Поступила 22.10.2020

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ФРАГМЕНТЫ ГЕНОМА *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Фомина Е.Г., Рубаник Л.В., Капустина Ю.М., Григорьева Е.Е., Зверко В.В.

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

Резюме. Сконструированы рекомбинантные плазмиды, в составе которых содержатся фрагменты диагностически значимых участков хромосомальной и плазмидной ДНК *Chlamydia trachomatis.* Гибридные плазмиды позволяют оценить специфичность прохождения полимеразной цепной реакции при выявлении ДНК возбудителя урогенитального хламидиоза и будут использованы в качестве положительных контрольных образцов в составе набора реагентов для генодиагностики различных вариантов *C. trachomatis*.

Ключевые слова: хламидийная инфекция, ПЦР-диагностика, рекомбинантная плазмидная ДНК, положительный контрольный образец

Введение. Урогенитальная хламидийная инфекция представляет собой одну из актуальных проблем современной медицины в виду ее широкой распространенности, этиологической роли в развитии ряда заболеваний человека и перинатальных осложнений, высокой социальной значимости. По данным Всемирной организации здравоохранения каждый год в мире фиксируется более 90 миллионов новых случаев инфицирования лиц репродуктивного возраста *Chlamydia trachomatis.* Заболеваемость хламидийной инфекцией на территории Республики Беларусь регистрируется ежегодно. В 2017 г. этот показатель составил 51,8 случаев на 100 тысяч населения, в 2018 г. – 50,8 случаев, в 2019 г. – 43,8 случаев на 100 тысяч населения.

Лабораторная диагностика хламидиоза является ключевым моментом для своевременного установления диагноза, что обусловлено характером течения заболевания, отсутствием специфических клинических симптомов, а также частым сочетанием с другими инфекциями урогенитального тракта, затрудняющими выявление *C. trachomatis* [1-3]. Одними из наиболее эффективных методов обнаружения хламидий в биологическом материале в настоящее время признаны молекулярно-генетические методы, в частности полимеразная цепная реакция [4]. Постоянно ведутся исследования по совершенствованию подходов к диагностике хламидиоза; разработке современных, высокоспецифичных, чувствительных и доступных практическому здравоохранению диагностических препаратов [2, 3].

Полимеразная цепная реакция характеризуется высокой достоверностью верификации возбудителя инфекции, объективным учетом, воспроизводимостью, приемлемостью для выполнения скрининговых исследований. При проведении ПЦР для получения надежных результатов, а также для стандартизации диагностических наборов в целом необходимо наличие положительного контрольного образца, содержащего выявляемые нуклеотидные последовательности. С развитием молекулярной биологии и генной инженерии использование плазмидных ДНК для этих целей получило широкое распространение [5].

Целью данного исследования явилось создание рекомбинантных плазмидных ДНК, содержащих в своем составе диагностически значимые фрагменты генома *C. trachomatis,* для их использования в качестве положительных контрольных образцов при проведении полимеразной цепной реакции.

Материалы и методы исследования. В работе использовали биологический материал, полученный от пациентов, проходивших обследование на хламидийную урогенитальную инфекцию в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии в связи с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта.

Выделение ДНК из клинических образцов проводили с использованием набора реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Российская Федерация) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Специфичность выделенного генетического материала подтверждали с использованием набора реагентов для выявления ДНК *C. trachomatis* в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *Chlamydia trachomatis*-Fl» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Российская Федерация) согласно инструкции производителя.

Для подбора специфических праймеров и зондов формата TaqMan к диагностическим генам-мишеням *C. trachomatis* использовали программное обеспечение Oligo Analyzer Tool (eu.idtdna.com), программу «Vector NTI», алгоритм BLAST и базу данных GenBank NCBI.

Постановку ПЦР осуществляли на приборе Mic Real Time PCR Cycler (Bio Molecular Systems, Австралия) с использованием олигонуклеотидов, синтезированных ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь). Состав реакционной смеси: 5 мкл 10хTaq-буфера (АртБиоТех, Республика Беларусь), 2,5 мкл 50 mM $MgCl_2$, 1 мкл дНТФ (10 мМ каждого), по 15 рМ соответствующих праймеров, 1,25 ед. Taq-полимеразы (АртБиоТех, Республика Беларусь), 5 мкл ДНК, деионизованная вода до конечного объема 50 мкл. Режим амплификации: 95ºС – 2 мин; 95ºС – 20 с, 58ºС – 20 с, 72ºС – 20 с.

Анализ продуктов амплификации проводили в 2,0% агарозном геле. В качестве электродного буфера использовали однократный ТВЕ-буфер. Для визуализации анализируемой ДНК гель окрашивали раствором бромистого этидия с последующим просмотром в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

Для создания гибридных векторов использовали набор реагентов CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США). Предварительно проводили очистку встраиваемого ДНК-фрагмента фенол-хлороформным методом.

Трансформацию компетентной культуры клеток *E. coli* (штамм *XLBlue*) проводили методом теплового шока. Для подготовки компетентной клеточной культуры в 5 мл среды LB вносили отдельную колонию клеток. Флакон помещали на шейкер и инкубировали при 37ºС в течение 3 ч. В стерильные пробирки вносили полученную культуру клеток по 1,5 мл, охлаждали до +4ºС и центрифугировали 10 мин на +4ºС при 3000 об./мин, осадок ресуспендировали в 500 мкл 0,1 М $CaCl_2$. Образцы помещали на +4ºС на 40 мин с последующим центрифугированием 10 мин на +4ºС при 3000 об./мин. Полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл 0,1 М $CaCl_2$. В 100 мкл суспензии компетентных клеток вносили 10 мкл лигазной смеси, выдерживали 30 мин при +4ºС, тепловой шок проводили при 42ºС в течение 90 с. Пробирки быстро охлаждали на льду в течение 3 мин, вносили LB среду до конечного объема 1 мл и помещали в термостат на 1 ч. После инкубации клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 2500 об./мин, осадок ресуспендировали в 100 мкл среды. Клеточную суспензию высевали на селективную агаризованную среду с ампициллином (50 мкг/мл). Чашки помещали в термостат на ночь при 37ºС.

Выделение плазмидной ДНК осуществляли с использованием набора реагентов GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пары праймеров pJET1.2 Forward Sequencing Primer и pJET1.2 Reverse Sequencing

Primer с помощью набора BrilliantDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Nimagen, Нидерланды) согласно инструкции по применению. Очистку продуктов секвенирующей реакции от компонентов реакционной смеси осуществляли методом переосаждения этанолом. Электрофорез и анализ продуктов реакции выполняли на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США). Для поиска последовательностей, гомологичных исследуемым фрагментам ДНК, использовали алгоритм BLAST.

Результаты исследования и их обсуждение. Появление новых генетических вариантов *C. trachomatis* («шведский», «финский», бесплазмидный) создает определенные трудности при лабораторной диагностике урогенитального хламидиоза и может являться причиной ложноотрицательных результатов при ПЦР-тестировании клинического материала пациентов, направленном на детекцию только штаммов «дикого» типа (wtCT) [6-8]. В этой связи общемировой тенденцией в настоящее время является разработка и производство двухмишенных ПЦР тест-систем, позволяющих выявлять ДНК различных геновариантов *C. trachomatis.*

Базируясь на изучении имеющегося мирового опыта в области молекулярно-генетической диагностики урогенитальной хламидийной инфекции, в основу создания отечественной тест-системы для выявления всех известных генетических вариантов *C. trachomatis* методом ПЦР был положен подход, предполагающий одновременную детекцию двух независимых генетических мишеней – хромосомальной и плазмидной.

Хламидии имеют относительно небольшой высококонсервативный геном размером около 1 Mb и мультикопийную (4-8 копий) криптическую плазмиду размером около 7,5 Kb [9]. Криптическая плазмида *C. trachomatis* как генетическая мишень характеризуется высокой диагностической значимостью в виду ее мультикопийности и консервативности. Однако при использовании плазмиды в качестве единственной матрицы для генодиагностики *C. trachomatis* в клинических образцах существует вероятность получения недостоверных результатов. Это связано с широким распространением в настоящее время бесплазмидных штаммов (плазмида отсутствует у 1-16% выделяемых изолятов хламидий), обладающих вирулентностью подобно плазмидсодержащим и способных вызывать хламидийную инфекцию, а также выявляемым полиморфизмом в различных участках плазмидного репликона, наиболее распространенным вариантом которого является делеция 377 пар нуклеотидов в участке *orf1* (так называемый «шведский» вариант nvCT) [10, 11].

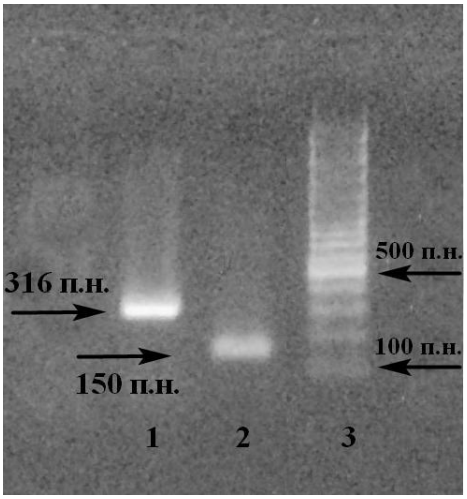
Ген, кодирующий 16S рРНК, представлен в геноме *C. trachomatis* в количестве 2-3 тандемных повторов [12]. При этом уровень его экспрессии определяется метаболической активностью хламидий, что следует учитывать при анализе возбудителей со сниженной репликативной способностью. В качестве диагностической мишени при исследовании вариантов *C. trachomatis* с модифицированным геномом могут быть эффективно использованы консервативные внутривидовые участки данного гена, не гомологичные родственным генам других видов.

Хромосомный ген *ompA*, кодирующий основной белок наружной мембраны MOMP, обеспечивает внутривидовую дифференциацию хламидий на отдельные сероварианты [13]. В геноме *C. trachomatis* он наиболее часто подвержен рекомбинационным процессам. При этом отмечено, что мутации могут затрагивать и нуклеотидные последовательности консервативной области, что в определенной мере затрудняет применение данного гена в лабораторной диагностике.

С учетом вышеизложенного, в качестве диагностически значимых сайтов генома возбудителя урогенитального хламидиоза были выбраны расположенный на хромосоме участок гена, кодирующего 16S рРНК, и *orf8* участок плазмиды, наиболее стабильно обнаруживаемый в плазмидном репликоне клинических изолятов. Детекция двух ге-

нов-мишеней позволит обеспечить высокую чувствительность и специфичность набора реагентов за счёт многокопийности плазмидной мишени, а также возможность выявлять циркулирующие бесплазмидные штаммы *C. trachomatis* с использованием хромосомальной ДНК.

С применением подобранных специфических праймеров методом ПЦР на матрице ДНК, выделенной из клинических образцов, были получены амплификаты диагностически значимых участков хромосомальной (316 п.н.) и плазмидной (150 п.н.) ДНК *Chlamydia trachomatis* (рисунок 1).



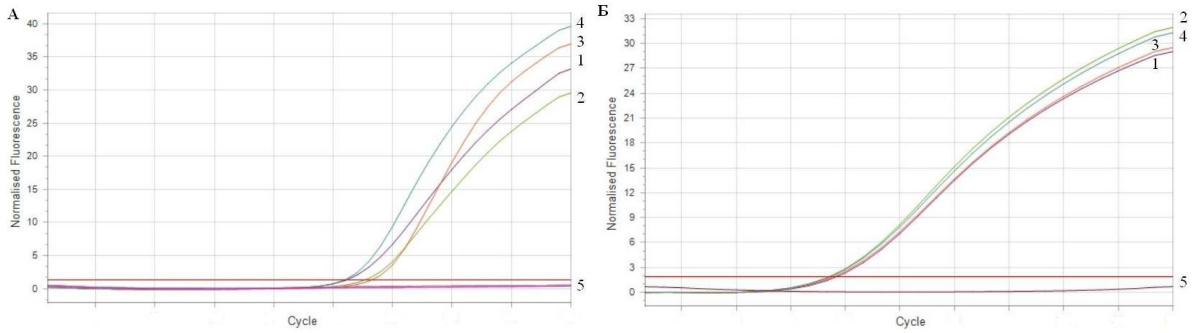
1 – диагностически значимый фрагмент хромосомальной ДНК *C. trachomatis;*
2 – диагностически значимый фрагмент ДНК криптической плазмиды *C. trachomatis;*
3 – маркер молекулярных масс (100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, США)

Рисунок 1. – Электрофоретический анализ продуктов амплификации диагностически значимых фрагментов генома *C. trachomatis*

В качестве вектора для клонирования специфических фрагментов ДНК была использована плазмида pJET 1.2/blunt. Особенностью данного вектора является наличие в его составе «суицидного гена», который не транслируется при встраивании в него чужеродного генетического материала. Таким образом, после трансформации лигазной смесью вырастают только бактериальные клоны, содержащие плазмидную ДНК с клонированной последовательностью.

Амплифицированные ДНК-фрагменты вырезали из агарозного геля и проводили их очистку. Клонирование осуществляли по «тупым» концам в полилинкер исходного вектора последовательно в две стадии, предполагающие подготовку фрагмента и его лигирование в вектор. Полученные лигазные смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli*, штамм *XLBlue*. Клетки выращивали на твердой селективной питательной среде, содержащей ампициллин (50 мкг/мл). После инкубирования в течение ночи при 37ºС по четыре колонии клеток рассевали штрихом и выращивали при тех же условиях, из бактериальных клеток *E. coli* выделяли плазмидную ДНК.

Наличие клонированных фрагментов в составе рекомбинантных плазмид определяли методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени со специфическими парами праймеров и гибридизационными зондами. Накопление флуоресцентного сигнала по каналу ROX при отсутствии такового для отрицательных образцов свидетельствовало об амплификации на матрице гибридных плазмидных ДНК специфических фрагментов генома *C. trachomatis:* участка гена, кодирующего 16S рРНК (рисунок 2А), и фрагмента криптической плазмиды (рисунок 2Б).



1-4 – рекомбинантные плазмидные ДНК, содержащие фрагмент гена, кодирующего 16S рРНК (А), фрагмент криптической плазмиды (Б); 5 – отрицательный контроль

Рисунок 2. – Оценка наличия специфических фрагментов генома *C. trachomatis* в составе рекомбинантных плазмидных ДНК методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени

Специфичность клонированных фрагментов в составе полученных рекомбинантных плазмид была подтверждена методом секвенирования. Результаты сравнительного анализа полученных в результате секвенирования нуклеотидных последовательностей с последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank, показали, что клонированные фрагменты, как в случае плазмидной ДНК, так и в случае хромосомальной ДНК совпадают с референс-последовательностями из базы данных, что свидетельствует о генетической идентичности исследованных ДНК-участков с *C. trachomatis.*

Заключение. С использованием методов генетической инженерии получены рекомбинантные плазмидные ДНК, содержащие диагностические фрагменты генетического материала *Chlamydia trachomatis:* 16S рРНК и orf8. Полученные гибридные плазмиды позволяют оценивать специфичность прохождения полимеразной цепной реакции при выявлении ДНК возбудителя урогенитального хламидиоза и будут использованы в качестве положительных контрольных образцов в составе набора реагентов для генодиагностики различных вариантов *C. trachomatis* методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени.

Литература

1. Здравоохранение в Республике Беларусь [Электронное издание]: офиц. стат. сб. за 2019 г. – Минск: ГУ РНПЦ МТ, 2019. – 257 с.

2. Совершенствование лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции у пациентов с нарушением репродуктивной функции, инфицированных *Chlamydia trachomatis* / В.А. Федорова [и др.] // Вестник дерматологии и венерологии. – 2017. – № 2. – С. 34-44.

3. Актуальные аспекты лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции / Н.В. Зур [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2016. – Т. 11, № 2. – С. 16-32.

4. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. – Geneva: World Health Organization, 2013. – 228 p.

5. Использование внешних и внутренних контрольных образцов при постановке полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции полимеразной цепной реакции / Т.Е. Сизикова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 3. – С. 41-44.

6. False-negative Chlamydia polymerase chain reaction result caused by a cryptic

plasmid-deficient *Chlamydia trachomatis* strain in Australia / E. Sweeney [et al.] // Sex Health. – 2019. – Vol. 16, No. 4. – P. 394-396.

7. Ripa, T.A Chlamydia trachomatis strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests / T. Ripa, P. Nilsson // Sex Transm. Dis. – 2007. – Vol. 34, No. 5. – P. 255-256.

8. The Finnish new variant of *Chlamydia trachomatis* with a single nucleotide polymorphism in the 23S rRNA target escapes detection by the Aptima Combo 2 Test / K. Hokynar [et al.] // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7, No. 8. – P. 227.

9. Thomson, N. *Chlamydia trachomatis*: small genome, big challenges / N. Thomson, I. Clarke // Future Microbiol. – 2010. – Vol. 5, No. 4. – P. 555-561.

10. Выявление безплазмидного и мутантного «шведского» вариантов *Chlamydia trachomatis*, выделенных от лиц с урогенитальным хламидиозом в Республике Беларусь / Л.В. Рубаник [и др.] // Медицинские новости. – 2017. – № 12. – С. 49-53.

11. Unemo, M. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* / M. Unemo, I. Clark // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 24, No. 1. – P. 62-69.

12. Comparison of plasmid- and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids / J.B. Mahony [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31, No. 7. – P. 1753-1758.

13. Использование различных мишеней для выявления штаммов *Chlamydia trachomatis* / В.А. Федорова [и др.] // Известия Саратовского университета. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2011. – Т. 11, № 2. – С. 73-77.

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT PLASMIDS CONTAINING DIAGNOSTICALLY SIGNIFICANT REGIONS OF THE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* GENOME

Famina A.G., Rubanik L.V., Kapustina Yu.M., Grigorieva E.E., Zverko V.V.

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

Recombinant plasmids, which contain diagnostically significant regions of *Chlamydia trachomatis* chromosomal and plasmid DNA, were constructed. Plasmids allow estimating the specificity of the reaction during PCR assay for detecting the *C. trachomatis* DNA in biological material and could be used as positive control samples in *C. trachomatis* real time PCR detection kit.

Keywords: urogenital chlamydia infection, PCR assay, recombinant plasmid DNA, positive control sample.

Поступила 23.10.2020

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА У ПАЦИЕНТОВ С ПАТОЛОГИЕЙ ВЕРХНИХ ОТДЕЛОВ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА И ИХ СВЯЗЬ С ИНФИЦИРОВАННОСТЬЮ *HELICOBACTER PYLORI*

[1]Янович О.О., [1]Титов Л.П., [2]Дорошко М.В., [2]Сергеева И.Г., [2]Гузов С.А.

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

Резюме. Целью исследования было оценить частоту морфологических изменений слизистой оболочки желудка у пациентов с патологией верхних отделов желудочно-кишечного тракта и их связь с инфицированностью *Helicobacter pylori* (*HP)*. Обследование 1251 человек с заболеваниями желудочно-кишечного тракта включало гастродуоденоскопию, тестирование на *HP*, гистологические исследования состояния слизистой желудка. Наличие *HP* в биопсийном материале подтверждали гистологическим методом и ПЦР в режиме реального времени. Установлена высокая распространенность хеликобактериоза среди пациентов с воспалительными заболеваниями верхних отделов желудочно-кишечного тракта (78,2%), а также сопутствующие заболеванию морфологические изменения слизистой оболочки желудка: атрофия – 45%, кишечная метаплазия – 8,1%. Показана достоверно, что инфицированность *H. pylori* является фактором риска развития атрофии и гиперплазий (фолликулярной и фовеолярной).

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, атрофия, кишечная метаплазия.

Введение. *Helicobacter pylori* (*HP*) является уникальным микроорганизмом, адаптированным к выживанию в кислой среде, что позволяет ему колонизировать эпителий слизистой оболочки желудка.

В настоящее время открыт вопрос о роли *HP* в развитии патологических морфологических изменений слизистой оболочки желудка: атрофии, кишечной метаплазии и гиперпластических изменений.

Гиперплазия желудка – это избыточное разрастание эпителиальной ткани органа в виде увеличения количества клеточных элементов. При этом слизистая утолщается с возможным образованием полипов. Фолликулярная гиперплазия связана с размножением клеток лимфоцитарного ряда, формированием фолликулоподобных структур со светлыми центрами размножения слизистой оболочки желудка. Фовеолярная гиперплазия характеризуется гиперплазией эпителия желудочных ямок и их высокой степенью дифференцировки [1].

В каскаде Корреа, приводящим к развитию рака желудка, первым этапом является выраженное хроническое воспаление, прогрессирующие в атрофический гастрит. Следующим этапом является кишечная метаплазия, которая характеризуется нарастающей дисплазией и последующей карциномой [2]. Проведенные исследования показали, что гиперпластические полипы и фовеолярная гиперплазия у пациентов с атрофическим гастритом указывают на повышенный риск рака желудка [3].

Цель исследования – оценить морфологические изменения слизистой оболочки желудка у пациентов с патологией верхних отделов желудочно-кишечного тракта и их связь с инфицированностью *HP*.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования были 1628 пациентов, проходивших в период 2016-2019 гг. обследование в медицинском центре «Нордин». Основным критерием отбора стало отсутствие эрадикационной терапии в анамнезе. Все участники исследования дали добровольное информированное согласие

на проведение первичной диагностики *H. pylori*. Окончательная группа, соответствующая всем критериям, составила 1279 человек.

Материалом для исследования служили биоптаты слизистой оболочки антрального отдела желудка, полученные при фиброгастродуоденоскопии.

Для гистологического исследования биоптаты фиксировали в 10% растворе формалина и заливали в парафин. Далее среды окрашивали гематоксилином и эозином.

На основании гистологического исследования основные поражения желудка описывались как атрофия желез, кишечная метаплазия (специализированные железы желудка заменяются клетками кишечного типа), наличие *HP*, фовеолярная гиперплазия, фолликулярная гиперплазия. Выраженность воспаления гистологически оценивается 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.

Наличие *HP* в биопсийном материале подтверждали гистологическим методом (окраска по Гимза) и ПЦР в режиме реального времени. Экстракцию ДНК *HP* из биопсийного материала проводили с использованием набора «Нуклеосорб-С» (Праймтех, РБ), в соответствии с инструкцией производителя. Выявление *HP* (мишень ген 23S рРНК) осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени на приборе Rotor Gene 3000 [4].

Для статистического анализа полученных результатов была использована компьютерная программа Statistica 8. Данные представлены в виде абсолютных (количество случаев) и относительных (проценты) показателей частоты.

Для установления статистической достоверности различий между группами использовались таблицы сопряженности с использованием критерия Хи-квадрат для анализа качественных признаков.

Результаты исследования и их обсуждение. В таблице 1 представлена общая характеристика обследованной группы.

Таблица 1. – Характеристика группы пациентов

Параметры	*n*	*%*
Пол		
Женщины	842	65,8
Мужчины	437	34,2
Инфицированность *H. pylori*		
H. pylori +	1000	78,2
H. pylori -	279	21,8
Атрофия	576	45,0
Кишечная метаплазия	103	8,1
Гиперплазия		
фовеолярная	233	18,2
фолликулярная	49	3,8

Исследуемая группа включала 437 мужчин и 842 женщины, средний возраст – 45,0±0,4 лет.

По данным гистологического исследования и ПЦР-анализа *H. pylori* выявлен в 78,2% случаев пациентов с воспалительными заболеваниями верхнего отдела ЖКТ (1000 человек).

Гиперплазия. При гистологическом исследовании слизистой оболочки антрального отдела желудка установлено, что гиперплазия покровно-ямочного эпителия (фо-

веолярная гиперплазия) была выявлена у 18,2%, фолликулярная гиперплазия у 3,8% пациентов.

Показано, что у пациентов инфицированных *HP* частота выявления гиперплазий выше и риск развития фолликулярной гиперплазии возрастает в 14 раз (p<0,001, ОШ=14, 2,0-104,6), фовеолярной гиперплазии в 1,5 раза (p<0,05, ОШ=1,5, 1,0-2,2) по сравнению с группой пациентов у которых не выявлен *HP*.

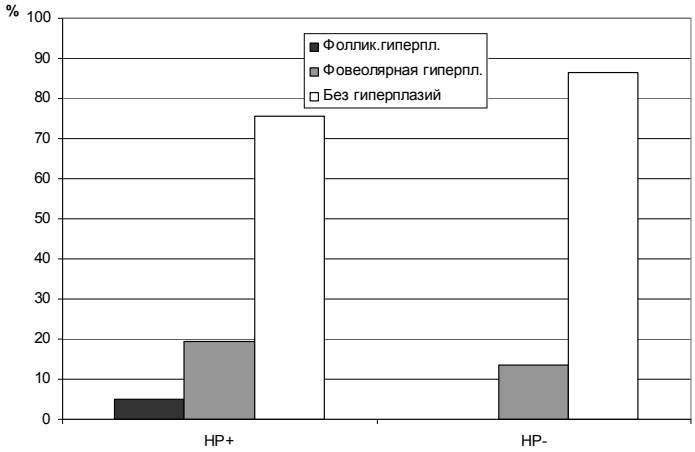


Рисунок. – Частота выявления гиперплазий в зависимости от инфицирования *HP*

Полученные данные указывают на возможную роль бактерии в образовании гиперпластических изменений как реакции слизистой оболочки желудка на колонизацию *HP*.

Предполагается, что при инфицировании *HP* повреждение слизистой оболочки желудка приводит к образованию арахидовой кислоты и ее метаболита простагландина Е2 который может вызывать развитие очаговой гиперплазии [5].

Куренков Е.Л. предполагает, что высокая *HP*-колонизация поверхности слизистой оболочки желудка определяет выраженную иммуновоспалительную реакцию с высокой склонностью к обострению хронического воспаления, сопряженной с формированием и накоплением в строме телец Русселя [1].

Анализ наших данных показал, что умеренная и выраженная активность хронического воспаления достоверно чаще встречалась в группе с фолликулярной гиперплазей (91,8%), чем при фовеолярной гиперплазии (56,7%). В группе без гиперплазий более характерной являлась низкая активность воспаления (62,5%) (таблица 2).

Таблица 2. – Степень активности воспалительного процесса в антральном отделе желудка при гиперпластических образованиях

Гиперплазия	*Степень активности воспаления*	
	низкая	*умеренная и выраженная*
Фолликулярная	4/8,2	45/91,8*
Фовеолярная	101/43,3	126/56,7
Без гиперплазии	623/62,5	363/36,4

* – достоверно при сравнении с группой с фовеолярной гиперлазией, p<0,05

Также у 98% пациентов с фолликулярной гиперплазий выявлена умеренная и высокая выраженность воспалительного процесса. При отсутствии фолликулярной гиперплазии частота выявления воспалительного процесса низкой и умеренной выраженности была примерно равной (46,6% и 53,4%, соответственно) (таблица 3).

Таблица 3. – Степень выраженности воспалительного процесса в антральном отделе желудка при гиперпластических образованиях

Гиперплазия	*Степень выраженности воспаления*	
	низкая	*умеренная и выраженная*
Фолликулярная	1/2	48/98*
Фовеолярная	86/36,9	147/63,1
Без гиперплазии	465/46,6	532/53,4

* – достоверно при сравнении с группой с фовеолярной гиперлазией, p<0,05

Показано, что частота выявления атрофии и кишечной метаплазии в антральном отделе желудка была примерно равной как при гиперплазиях, так и у пациентов без гиперплазий (таблица 4).

Таблица 4. – Частота выявления гиперплазий у пациентов с атрофией и кишечной метаплазией

Гиперплазия	*Атрофия*	*Метаплазия*
Фолликулярная	26/53,1	5/10,2
Фовеолярная	95/40,8	21/9,0
Без гиперплазии	455/45,5	96/9,6

Атрофия. Атрофический гастрит определяется как редукция/потеря желез желудка которые замещаются фиброзной тканью или кишечными метапластическими клетками.

В мире частота выявления атрофии в слизистой оболочке желудка зависит от способов диагностики и стран [6]: в европейских странах данный показатель составляет 15-30%, в странах Азии и Южной Америки – 50-66%. В нашем исследовании из 1279 пациентов, включенных в исследование, 576 (45%) имели атрофию.

Возраст обследованных пациентов с атрофией желудка составил 52,9±0,5 лет, что достоверно выше при сравнении с пациентами без атрофии (38,5±0,5 лет) (таблица 5). Эти данные согласуются с проведенными ранее исследованиями [7].

Таблица 5. – Сравнительная характеристика группы пациентов в зависимости от выявления атрофии в антральном отделе желудка

Параметры	*Атрофия (n= 576)*	*Без атрофии (n= 703)*	*p, ОШ, ДИ*
Средний возраст	52,9±0,5	38,5±0,5	p<0,01
Пол			
Мужчины	184/42,1	253/57,9	p>0,05
Женщины	392/46,5	450/53,5	
Инфицированность *H. pylori*			
H. pylori +	469/46,9	531/53,1	p<0,01; 1,4; 1,1-1,9
H. pylori -	107/38,4	172/61,6	
Кишечная метаплазия			
+	106/86,9	16/13,1	p<0,001; 9,7; 5,6-16,6
-	470/40,6	687/59,4	
Гиперплазия	455	542	
фовеолярная	95/40,8	138/59,2	p>0,05
фолликулярная	26/53,1	23/46,9	

Не установлено достоверной разницы в частоте встречаемости атрофии в зависимости от пола.

Исследования проведенные Kim N. с соавт. [8] показали, что риск развития атрофии связан с инфицированием *HP*. Наши данные подтверждают эти результаты. Выявлено, что наличие *HP* увеличивает риск развития атрофии желудка в 1,4 раза (p<0,01).

Установлена убедительная связь атрофии желудка с кишечной метаплазией. При наличии атрофии риск развития метаплазии возрастает в 9,7 раз (p<0,001, ОШ=9,7; ДИ-5,6-16,6).

Кишечная метаплазия. По литературным данным [7] факторами риска развития кишечной метаплазии являются возраст старше 40 лет, мужской пол, курение, неправильное питание. Наше исследование показало связь между развитием кишечной метаплазии и возрастом. Возраст пациентов, у которых была выявлена кишечная метаплазия, составил 54,0±1,2 лет, что достоверно выше при сравнении с группой обследованных без кишечной метаплазии (44,1±0,4 лет). Однако нами не установлено разницы по полу в частоте выявления кишечной метаплазии (8,9% против 9,9%) (таблица 6).

Таблица 6. – Сравнительная характеристика группы пациентов в зависимости от выявления кишечной метаплазии в антральном отделе желудка

Показатели	*Метаплазия (n=122)*	*Без метаплазии (n=1157)*	*p, ОШ, ДИ*
Средний возраст	54,0±1,2	44,1±0,4	p<0,001
Пол			
Мужчины	39/8,9	398/91,1	p>0,05
Женщины	83/9,9	759/90,1	
Инфицированность *H. pylori*			
H. pylori +	103/10,3	897/89,7	p>0,05
H. pylori -	19/6,8	260/93,2	
Гиперплазия			
фовеолярная	21/9	212/91	p<0,001; 9,9, 4,4-21,9
фолликулярная	5/10,2	44/89,8	p<0,001; 11,3, 3,6-35,4

Показано, что у пациентов с кишечной метаплазией риск развития фовеолярной гиперплазии возрастает в 9,9 раз, а фолликулярной гиперплазии в 11,3 раз.

Не установлено связи между наличием *HP* с кишечной метаплазией желудка, что подтверждает данные полученные другими авторами [9].

В обследованной группе пациентов возрастные группы составили: до 18 лет – 13 человек (1%), от 18 до 24 лет – 70 (5,5%), от 25 до 44 лет – 558 (43,6%), от 45 до 59 лет – 409 (32%), 60-74 года – 205 (16%) и старше 75 лет – 24 (1,9%) пациентов.

Наше исследование показало, что у пациентов младше 18 лет не выявляется атрофия и метаплазия желудка. Далее с возрастом наблюдается рост развития морфологических изменений желудка. Более резко идет возрастание частоты встречаемости атрофии с возрастом. Уже в возрастной группе 25-44 года частота атрофии составила 25,9% и достигает максимума в возрасте 60-74 года (таблица 7).

Наибольшая встречаемость метаплазии желудка выявлена в самой старшей возрастной группе – старше 75 лет – 25%.

Таблица 7. – Частота выявления атрофии и кишечной метаплазии в зависимости от возраста

Возраст	*Атрофия, %*	*Метаплазия, %*
меньше 18	0	0
18-24	1,5	1,5
25-44	25,9	5,3
45-59	62,8	11,0
60-74	77,1	20,5
старше 75	66,7	25

Выводы. В результате проведенного исследования выявлена высокая распространенность хеликобактериоза среди пациентов с воспалительными заболеваниями верхних отделов желудочно-кишечного тракта (78,2%), а также сопутствующие заболеванию морфологические изменения слизистой оболочки желудка: атрофия – 45%, кишечная метаплазия – 8,1%.

Установлено, что инфицированность *H. pylori* вызывает увеличение воспаления, что с течением времени приводит к развитию изменений слизистой оболочки желудка – гиперплазий и атрофии. Так как эти изменения повышают риск развития рака желудка то важно выявить группы риска для определения оптимального наблюдения и терапии таких пациентов.

Литература

1. Куренков, Е.Л. Морфологическая характеристика полиповидных образований желудка и фонового хронического гастрита / Е.Л. Куренков // Росс. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2000. – № 2. – С. 18-25.
2. Correa, P. The gastric precancerous cascade / P. Correa, M.B. Piazuelo // J. Dig. Dis. – 2012. – Vol. 13, No. 1. – P. 2-9.
3. Laxon, F. Gastric carcinoma and pernicious anaemia in long-term endoscopic follow-up of subjects with gastric polyps / F. Laxon // Scand. J. Gastroenterol. – 1984. – Vol. 19. – P. 535-540.
4. Оценка резистентности *Helicobacter pylori* к кларитромицину методом ПЦР у больных хеликобактериозом / О.О.Янович, Е.С.Носова, Л.П.Титов, М.В.Дорошко // Здравоохранение. – 2011. –№ 12. – С. 9-12.
5. Uribe, A. Cell kinetics of rat gastrointestinal mucosa. Autoradiographic study after treatment with 15(R)15-methyl-prostaglandin E2 / A. Uribe, C. Rubio, C. Johansson // Scand. J. Gastroenterol. – 1986. – Vol. 21, No. 2. – P. 246-252.
6. Prevalence of gastric precancerous conditions: a systematic review and meta-analysis / L. Marques-Silva [et al.] // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. – 2014. – Vol. 26. – P. 378-387.
7. Prevalence and risk factors of atrophic gastritis and intestinal metaplasia: a nationwide multicenter prospective study in Korea / Y.E. Joo [et al.] // Gut Liver. – 2013. – Vol. 7. – P. 303-310.
8. Prevalence and risk factors of atrophic gastritis and intestinal metaplasia in a Korean population without significant gastroduodenal disease / N. Kim [et al.] // Helicobacter. – 2008. – Vol. 13, No. 4. – P. 245-255.
9. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer precursor lesions in patients with dyspepsia / L.B. Muller [et al.] // Arq. Gastroenterol. – 2007. – Vol. 44, No. 2. – P. 93-98.

MORPHOLOGICAL CHANGES IN GASTRIC MUCOSA IN PATIENTS WITH GASTRODUODENAL PATHOLOGY AND THEIR RELATION TO *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION

[1]Yanovich O., [1]Titov L., [2]Doroshko M., [2]Sergeeva I., [2]Guzov S.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

[2]Medical Center "Nordin", Minsk, Republic of Belarus

The aim of the study was to assess morphological changes in gastric mucosa in patients with gastroduodenal pathology and their relationship with *Helicobacter pylori* (*HP*) infection. Endoscopic and hystological examination of stomach antral part was performed in 1251 patients with different gastroduodenal pathologies. *HP* was diagnosed by histological and real-time PCR methods. Among patients with different gastroduodenal pathologies the frequency of *H. pylori* infection was 77.9%, morphological changes: atrophy – 45%, intestinal metaplasia – 8.1%. It was shown that *H. pylori* infection is a risk factor for gastric atrophy and hyperplasia.

Keywords: *Helicobacter pylori*, atrophy, intestinal metaplasia.

Поступила 16.10.2020

ВИДОВОЙ СОСТАВ И АССОЦИАТИВНОСТЬ МИКРОФЛОРЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ РАНАМИ

[1]Ярец Ю.И., [1]Шевченко Н.И., [2]Еремин В.Ф.

[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь

[2]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Проведен анализ результатов микробиологического исследования образцов раневого отделяемого пациентов с ХР различных сроков давности (n=229). Средняя частота обнаружения монокультур и ассоциаций в ХР была практически одинаковой и составила 44,2 % [40,9; 47,4] и 42,0 % [35,4; 48,6], соответственно. В 13,8 % [5,4; 22,2] случаев микроорганизмы из ХР не выделялись. С увеличением давности существования ХР увеличивалась частота выделения ассоциаций до 50 %, снижалась частота отрицательных результатов посева до 2,8 %. Качественная структура микрофлоры ХР характеризовалась преобладанием рода *Staphylococcus* (c=42,7 %), НФБ (*Pseudomonas* и *Acinetobacter,* c=20,1 %), *Enterococcus faecalis* (c=17,8 %), и представителей порядка Enterobacterales (c=16,5 %). Большинство изолятов проявляло высокую ассоциативность с КА>51 %: НФБ (68,3 %), *S. aureus* (53,3 %)*, E. faecalis* (91,1 %), Enterobacterales (86,5 %). Наиболее устойчивыми были ассоциации, образованные НФБ и *S.aureus* (g=31,5 %).

Ключевые слова: микробные ассоциации, этиологическая значимость, хронические раны.

Введение. Исследование механизмов инфекционного процесса в настоящее время включают учет различных факторов, необходимых для определения этиологической значимости патогенов и разработки критериев интерпретации результатов микробиологического исследования. При анализе видовой структуры микрофлоры, выделенной из клинических образцов пациентов, исследователями указывается на наличие ассоциаций микроорганизмов. Известно, что в ассоциациях микробы могут действовать синергически, способствуя росту и размножению, экспрессии факторов патогенности, чем объясняется возникновение устойчивых ассоциаций. С другой стороны, антагонистический характер взаимоотношений обуславливает редкую встречаемость определенных групп микроорганизмов в составе сообществ [1].

Общепринятым в клинической микробиологии является подход к описанию видовой структуры микроорганизмов с указанием только качественных и количественных характеристик. Однако в настоящее время специалистами микробиологами признается необходимость разработки новых подходов для адекватного мониторинга видовой структуры клинически значимых штаммов бактерий с учетом специфики межвидовых взаимодействий [2]. Научные данные демонстрируют актуальность проблемы полиэтиологичных инфекций, особенно в хирургии. При этом отмечена недостаточная изученность этой проблемы на теоретическом и практическом уровне: нет систематизированных данных о спектре микробных ассоциаций, недостаточно представлены свойства патогенов в сравнении с моновозбудителями [3].

Доказано, что одной из основных причин задержки раневого заживления является микробный фактор. Инфекция превращает острую рану в хроническую, для которой характерен вялотекущий воспалительный процесс с нечеткой клинической картиной. Хроническая рана остается открытой на протяжении длительного времени, что создает усло-

вия для формирования на ее поверхности полимикробной биопленки. В этом случае сделать заключение о ведущем патогене сложно, учитывая характер взаимоотношений микроорганизмов в процессе повреждения тканей [4, 5].

Значительное количество публикаций, посвященных исследованию микробиологических и клинико-диагностических особенностей полиэтиологичных инфекций различных локализаций, обуславливает актуальность проведения анализа структуры и ассоциативности микрофлоры у пациентов с хроническими ранами (ХР).

Цель: оценить состав и ассоциативность микрофлоры ХР.

Материалы и методы исследования. Проведен анализ результатов культурального микробиологического исследования образцов раневого отделяемого пациентов с ХР (n=229, срок существования ХР более 3-х недель), которые были госпитализированы для оказания специализированной медицинской помощи в ожоговое отделение ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница №1» за период 2012-2020 гг. Биологические образцы получали на момент поступления пациентаов в стационар. Локальная клиническая оценка раны проводилась по системе MEASURE и включала описание следующих ключевых параметров: M (Measure) – измерение раны (длина, ширина, глубина и площадь), E (Exudate) – количественные и качественные характеристики экссудата, A (Appearance) – внешний вид (основание раны, тип ткани и количество), S (Suffering) – болевой синдром (характер и интенсивность боли), U (Undermining) – деструкция (наличие подрытых краев раны и тунелирования), R (Reevaluate) – наблюдение (регулярный контроль всех параметров), E (Edge) – край (состояние краев раны и окружающей кожи) [6].

Раны у всех пациентов носили локальный характер – их площадь при поступлении была от 2 до 900 см^2. Раневые повреждения были вызваны случайной механической травмой (в результате падения, сдавления сегмента конечности, удара об острый или тупой предмет), термическим (пламенем, горячей жидкостью и контактом с горячей поверхностью) или химическим ожогом – посттравматические раны;, предшествующими гнойно-воспалительными заболеваниями кожи и мягких тканей II уровня (некротической формы рожистого воспаления, флегмоны или абсцессов мягких тканей с некрозом кожи) – постнекротические раны; трофическими язвами, сформированными на культе нижней конечности после проведения ее ампутации и ношения протеза, а также возникшие после механической травмы периферических нервов; пролежнями по причине длительной иммобилизации. Этиологическая структура ран, разделение пациентов по срокам существования ран представлена в таблице 1.

При проведении микробиологического исследования руководствовались национальными и международными рекомендациями [4, 7, 8]. Забор раневого отделяемого проводили ватным тампоном, после предварительной обработки раны, удаления детрита стерильным физиологическим раствором. При взятии материала использовали две основные технологии. Из относительно больших по размеру ран (более 5 см^2) мазок из раны брали «Z»-методом путем прокатывания стерильного тампона в зигзагообразном направлении по поверхности раны, избегая ее краев. Для небольших (менее 5 см^2) ран использовали метод N.S. Levine, предполагающий роллинг тампона от центра к периферии по всей поверхности раны [8]. Для доставки биологического материала в лабораторию ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» использовали транспортную среду Amies. Посев проводили на плотные питательные среды (кровяной агар, среда Эндо, желточно-солевой агар, среда для выделения энтерококков) полуколичественным методом, также использовали посев на среду обогащения (триптиказо-соевый бульон) с последующим высевом на плотные питательные среды. Идентификацию штаммов выполняли на автоматическом микробиологическом анализаторе VITEK 2 Compact (BioMerieux, Франция). При описании микро-

биологической структуры ОР и ХР принимали во внимание все микроорганизмы, выделенные на первичных плотных питательных средах во всех титрах, а также на среде обогащения, учитывая «селективное давление» антисептиков.

Таблица 1. – Общая характеристика пациентов с ХР

Признак	*ХР (n=229)*
Пол пациентов	
Мужчины, n (%)	139 (60,7)
Женщины, n (%)	90 (39,3)
Возраст пациентов, Me [25%; 75%]	51 [39; 61]
Этиология раневого повреждения:	
Постнекротические раны, n (%)	57 (24,9)
Посттравматические раны (механическая травма мягких тканей), n (%)	66 (28,8)
Посттравматические раны (термические, контактные, химические ожоги)	43 (18,8)
Пролежни, n (%)	18 (7,8)
Трофические язвы, n (%)	45 (19,7)
Длительность раневого дефекта	
От 3-х до 4-х недель	61 (26,6)
От 4-х до 6-и недель	43 (18,8)
От 6-и до 8 недель	23 (10,0)
От 8-и недель до 3-х месяцев	32 (14,0)
От 3-х до 6-и месяцев	36 (15,7)
От 6-и месяцев до 1 года и более	34 (14,9)

Частоты встречаемости микроорганизмов представляли в виде: среднее значение [±95% доверительный интервал – ДИ]. Статистические исследования, построение графиков проводили с помощью программного пакета «STATISTICA 6.1» (StatSoft Inc., США, регистрационный номер лицензионной версии GS-35F-589). Интегральную оценку микробиологических характеристик осуществляли с использованием специальных коэффициентов, выраженных в %. Долевое участие разных таксонов в структуре микрофлоры определяли по коэффициенту постоянства (*c*), который представляет собой отношение числа наблюдений, содержащих изучаемый вид к общему числу наблюдений [12]. Для анализа специфики межвидовых взаимодействий рассчитывали коэффициент ассоциативности (КА) в виде отношения абсолютного числа культур-ассоциантов определенного вида к общему числу выделенных культур этого вида. Высокую ассоциативность определяли при КА более 51 %, умеренную и низкую – при КА от 31 до 50 % и от 20 до 30 %, соответственно. КА≤20% соответствовал отсутствию ассоциативности [13]. Коэффициент Жаккара использовали для определения взаимоотношений различных таксонов, который рассчитывали по формуле [12]:

$$g = \frac{c}{a + b - c} \times 100\%$$

где g – коэффициент Жаккара, a – число выборок с видом A, b – число выборок с видом B, c – число выборок, содержащих оба вида.

Результаты исследования и их обсуждение. У пациентов определялась характерная клиническая картина длительно незаживающей раны. Практически во всех случаях ХР были выполнены патологически измененной грануляционной тканью – с признаками атрофии, рубцового перерождения, гипертрофии, также регистрировался комбинированный тип основания ран, представленный сочетанием грануляций, рыхлого или плотного струпа, признаков эпителизации различной степени выраженности. Для ХР ряда пациен-

тов были также характерны клинические признаки воспаления, заключающиеся в наличии болевого синдрома, неприятного запаха из раны, раневой экссудации, присутствия в ране рыхлых, крупнозернистых, темно-красных или багровых грануляций, изменений окружающих рану мягких тканей и подрытого края раны. Необходимо отметить, что согласно установленным рекомендациям по оценке ХР, указанные клинические признаки являются местными критериями инфекции [9, 10, 11].

Всего из ХР пациентов было выделено 314 штаммов условно-патогенных бактерий и грибов в 195 образцах биологического материала. Из 34 биопроб (14,9 %) микроорганизмы не высевались. Среди положительных результатов микробиологического исследования в монокультуре обнаруживалось 51,3 % изолятов (n=100), в ассоциациях, состоящих из 2-х (n=72), 3-х (n=22) и 4-х видов (n=1) – 48,7 % изолятов (n=214, выделены из 95 образцов биоматериала).

При анализе результатов микробиологического исследования в зависимости от сроков существования ран средняя частота обнаружения монокультур и ассоциаций была практически одинаковой и составила 44,2 % [40,9; 47,4] и 42,0 % [35,4; 48,6], соответственно. В 13,8 % [5,4; 22,2] результат микробиологического посева был отрицательным – микроорганизмы из ХР не выделялись (рисунок А). Детальный анализ показал, что с увеличением давности существования ХР, увеличивалась частота выделения ассоциаций, снижалась частота отрицательных результатов посева. Для ран, существующих более 3-х месяцев, ассоциации обнаруживались в 50 % образцов, при этом микроорганизмы не высевались только в 2,8 % и 5,9 % случаев. Частота выделения из ХР монокультур была практически постоянной на различных сроках ран, составляя 39,5 % – 47,8 % (рисунок Б).

Представители грамположительных (Г+) бактерий – *Staphylococcus, Enterococcus, Streptococcus* были доминирующими среди всех таксонов, выделяемых из раневого отделяемого пациентов с ХР – с=62,1 % (n=195). Грамотрицательные (Г-) бактерии (неферментирующие бактерии – НФБ, порядок Enterobacterales) занимали 2-е место и обнаруживались в 36,6 % случаев (n=115). Наиболее редкими были дрожжеподобные грибы рода Candida – выделено 4 изолята (с=1,3 %).

Анализ видового состава показал преобладание представителей рода *Staphylococcus* – с=42,7 % (n=134), при этом коагулазопозитивный *Staphylococcus aureus* обнаруживался в 33,5 % случаев (n=105), коагулазонегативные стафилококки (coagulase-negative staphylococci – CoNS) выделялись реже: с=9,2 % (n=29): *S. haemolyticus, S. epidermidis, S. hominis.* На втором месте по частоте встречаемости были НФБ: с=20,1 %, n=63; обнаруживались представители родов *Pseudomonas* и *Acinetobacter*. Часто высевались бактерии рода *Enterococcus*, из которого были идентифицированы штаммы только одного вида – *Enterococcus faecalis,* – в 17,8 % случаев (n=56). Практически с таким же коэффициентом постоянства обнаруживались бактерии порядка Enterobacterales – 16,5 % (n=52). Наиболее редкими видами были дрожжеподобные грибы рода *Candida* и *Streptococcus* группы *viridans* (таблица 2).

Большинство изолятов проявляло высокую ассоциативность (КА>51 %): НФБ, *S. aureus, E. faecalis* представители порядка Enterobacterales образовывали ассоциации в 68,3 %, 53,3 %, 91,1 %, 86,5 % случаев, соответственно. Среди CoNS наиболее высокий КА был *S. haemolyticus* (66,7 %). Г- бактерии представители порядка Enterobacterales, которые обнаруживались в единичных случаях, всегда высевались в ассоциациях с другими видами. Высоким был КА для *E. faecalis* (таблица 2). Существенных отличий в КА в зависимости от давности раны отмечено не было.

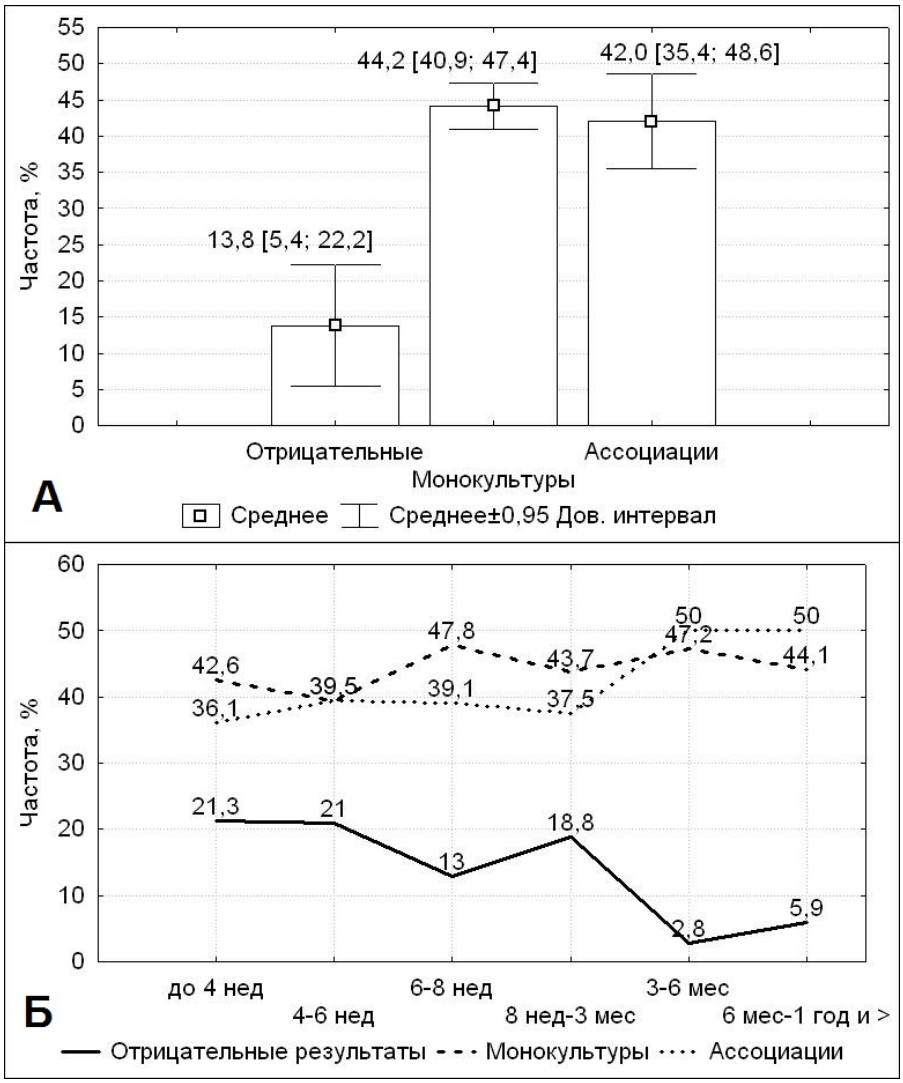


Рисунок. – Частоты отрицательных результатов посева, обнаружения монокультур и ассоциаций из ХР различных сроков давности

Таблица 2. – Видовой состав микроорганизмов, выделенных из ХР пациентов

Группа/вид микроорганизмов	*Общее количество изолятов*	*с, %*	*Количество изолятов, участвующих в ассоциациях*	*КА, %*
НФБ:	**63**	**20,1**	**43**	**68,3**
A. baumannii	23	7,4	17	74,0
A.iwoffii	2	0,6	1	50,0
P. aeruginosa	34	10,8	22	64,7
P. putida	3	1,0	2	66,7
P. fluorscens	1	0,3	1	100,0
S. aureus	**105**	**33,5**	**56**	**53,3**
CoNS:	**29**	**9,2**	**14**	**48,3**
S. haemolyticus	18	5,7	12	66,7
S. epidermidis	10	3,2	2	20,0
S. hominis	1	0,3	0	0
E. faecalis	**56**	**17,8**	**51**	**91,1**

Продолжение таблицы 2				
порядок Enterobacterales	**52**	**16,5**	**45**	**86,5**
K. pneumoniae	3	1,0	2	66,7
K. planticola	1	0,3	1	100,0
E. cloacae	12	3,8	10	83,3
E. agglomerans	1	0,3	1	100,0
P. mirabilis	23	7,4	22	95,6
E. coli	7	2,2	4	57,1
K. aerogenes	1	0,3	1	100,0
K. oxytoca	2	0,6	2	100,0
C. freundii	1	0,3	1	100,0
C. farmeri	1	0,3	1	100,0
C. albicans	**3**	**1,0**	**2**	66,7
Candida non-albicans:	**1**	**0,3**	**1**	100,0
C. parapsilosis	1	0,3	1	100,0
Streptococcus gr. viridans	**5**	**1,6**	**2**	40,0
Грам+ бактерии (в целом)	**195**	**62,1**	**123**	63,7
Грам- бактерии (в целом)	**115**	**36,6**	**88**	76,5
Дрожжеподобные грибы	**4**	**1,3**	**3**	75,0

Примечание: НФБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии, CoNS – coagulase-negative staphylococci, коагулазонегативные стафилококки, с – коэффициент постоянства, КА – коэффициент ассоциативности.

Доказано, что на течение инфекционного процесса оказывает влияние характер взаимосвязей микроорганизмов, входящих в состав сообщества. Между бактериями в сообществах существуют контакты различных типов, которые способствуют лучшей адаптации ассоциантов в воспалительных очагах, а также потенциированию их патогенных свойств [14]. В связи с этим выполняется анализ встречаемости моно- и полиэтиологичных инфекционных осложнений; выражением степени участия бактерий в ассоциациях является КА. Значения КА могут быть использованы для установления этиологической значимости условных патогенов в зависимости от преобладания их в монокультуре либо в ассоциации [3].

Для определения вида взаимоотношений микроорганизмов в ассоциациях проведен расчет коэффициента Жаккара (таблица 3).

Таблица 3. – Коэффициент Жаккара для ассоциаций микроорганизмов, выделенных из образцов биологического материала пациентов с ХР

Ассоциация	*g, %*
НФБ+*S. aureus*	31,5
Enterobacterales+*E. faecalis*	26,3
S. aureus+*E. faecalis*	24,4
Enterobacterales+*S. aureus*/CoNS	23,7
НФБ+*E. faecalis*	22,1
НФБ+CoNS	14,0
НФБ+представители порядка Enterobacterales	12,8
CoNS+*E. faecalis*	8,3

Примечание: НФБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии, CoNS – coagulase-negative staphylococci, коагулазонегативные стафилококки, g – коэффициент Жаккара.

Среди всех выявленных сопряженных связей между микроорганизмами наиболее устойчивыми были ассоциации, образованные НФБ и *S.aureus*. Согласно интерпретации результатов определения коэффициента Жаккара, указанная ассоциация носила характер синергизма (g>30,0 %) [12]. Аналогичные результаты были получены другими исследователями при анализе ассоциативности микрофлоры ожоговых ран. Авторы объясняли ассоциативность НФБ и *S.aureus* способностью продуцировать бактерицины, ингибирующие рост представителей кишечной и кожной микрофлоры [1]. Уровень ассоциативности НФБ и представителями Enterobacterales, CoNS был низким. Наиболее редкими были ассоциации CoNS+*E. faecalis* (таблица 3).

Коэффициент экологического сродства Жаккара используется для определения способности сосуществования в ассоциациях. Отмечают, что коэффициент Жаккара особенно уместен при ретроспективной оценке, как альтернатива распространенным классическим методам отсроченного антагонизма, регистрации «сцепленных» ассоциаций по чашкам первичного посева. Исследователи отмечают, что одной из причин синергизма между клиническими штаммами бактерий и формирования устойчивых ассоциаций является антибиотикорезистентность [1].

Заключение. Результаты проведенного исследования позволили определить качественную структуру микрофлоры ХР, которая характеризовалась преобладанием рода *Staphylococcus* (c=42,7 %), НФБ (*Pseudomonas* и *Acinetobacter,* c=20,1 %), *Enterococcus faecalis* (c=17,8 %), и представителей порядка Enterobacterales (c=16,5 %). Большинство изолятов проявляло высокую ассоциативность с КА>51 %: НФБ (68,3 %), *S. aureus* (53,3 %)*, E. faecalis* (91,1 %), Enterobacterales (86,5 %). Наиболее устойчивыми были ассоциации, образованные НФБ и *S.aureus* (g=31,5 %). Полученные данные могут быть использованы для установления приоритетных патогенов для указанной категории пациентов.

Исследование выполнено в рамках финансируемого задания государственной программы научных исследований на 2016–2020 гг. «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», подпрограмма 2 «Диагностика и терапия заболеваний» по теме «Изучение патогенного потенциала клинически значимых штаммов бактерий для повышения эффективности системы инфекционного контроля в стационаре».

Литература

1. Андреева, С.В. Оценка степени экологической общности микроорганизмов, выделенных из ожоговых ран / С.В. Андреева, Д.Ю. Нохрин, Л.И. Бахарева // Вестник Карагандинского университета. Сер. Биология. Медицина. География. – 2013. – Т. 71, № 3. – С. 67-71.

2. Андреева, С.В. Использование статистических методов в анализе динамики видовой структуры микробных сообществ при ожоговой травме / С.В. Андреева, Н.Э. Хайдаршина, Д.Ю. Нохрин // Лабораторная служба. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 65-72.

3. Общая характеристика и проблемные вопросы полиэтиологичнных инфекций, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами / В.В. Шкарин [и др.] // Журн. микробиол. – 2017. – № 6. – С. 114-126.

4. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей. Российские национальные рекомендации / под ред. Б.Р. Гельфанда [и др.]. – 2-е изд. допол. – М., 2015. – 109 с.

5. Biofilms and inflammation in chronic wounds / G. Zhao [et al.] // Adv. Wound Care (New Rochelle). – 2013. – Vol. 2, No. 7. – P. 389-399.

6. Keast, D.H. MEASURE: A proposed assessment framework for developing best practice recommendations for wound assessment / D.H. Keast // Wound Repair Regen. – 2004. – Vol. 2, suppl. 1. – P. 1-17.

7. Микробиологические методы исследования биологического материала: bнструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 16.02.2010, рег. № 075-0210 / авт.-разраб.: Н.Д. Коломиец [и др.]. – Минск, 2010. – 75 с.

8. Schwarzkopf, A. Indication and practical implementation of microbiologic diagnostics in patients with chronic wounds / A. Schwarzkopf, J. Dissemond // J. Dtsch. Dermatol. Ges. – 2015. – Vol. 13, No. 3. – P. 203-209.

9. Sibbald, G.R. Increased bacterial burden and infection: NERDS and STONEES / G.R. Sibbald, K. Woo, E. Ayello // Wounds UK. – 2007 – Vol. 7, No. 2. – P. 25-46.

10. Yarets, Y. Effective biofilm removal and changes in bacterial biofilm building capacity after wound debridement with low-frequency ultrasound as part of wound bed preparation before skin grafting / Y. Yarets // Chronic Wound Care Management and Research. – 2017. – Vol. 4. – P. 55-64.

11. Young, L. Identifying infection in chronic wounds / L. Young // Wound Practice and Research. – 2012. – Vol. 20, No. 1. – P. 38-44.

12. Характеристика носоглоточного микробиоценоза и оценка взаимодействия его ассоциантов у женщин с хроническим эндометритом / Е.А. Кунгурцева [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. – 2018. – Т. 6, № 3. – С. 29-35.

13. Исследование ассоциаций бактерий в микробиоценозе слизистой носоглотки практический здоровых людей / Е.В. Беляева [и др.] // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2012. – Т. 3, № 2. – С. 20-24.

14. Бухарин, О.В. Симбиотические взаимоотношения микроорганизмов при инфекции / О.В. Бухарин // Журн. микробиол. – 2013. – № 1. – С. 93-97.

COMPOSITION AND ASSOCIATION OF MICROFLORA ISOLATED FROM SAMPLES OF PATIENTS WITH CHRONIC WOUNDS

[1]Yarets Y.I., [1]Shevchenko N.I., [2]Eremin V.F.

[1]Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Republic of Belarus

[2]Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnology, Minsk, Republic of Belarus

The analysis of the results of a microbiological study of wound samples from patients with chronic wounds (CW) of different duration (n=229). The average frequency of detection of monocultures and associations in CW was practically the same and amounted to 44.2% [40.9; 47.4] and 42.0% [35.4; 48.6], respectively. 13.8% [5.4; 22.2] cases, microorganisms were not isolated from CW. With an increase in the duration of the existence of CW, the frequency of association allocation increased to 50%, the frequency of negative culture results decreased to 2.8%. The qualitative structure of the CW microflora was characterized by the predominance of the *Staphylococcus* (c=42.7%), non-fermentative rods (NFR) – *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, c=20.1%), *Enterococcus faecalis* (c=17.8%), and Enterobacterales (c=16.5%). Most of the isolates showed high associativity with CA>51%: NFR (68.3%), *S. aureus* (53.3%), *E. faecalis* (91.1%), Enterobacterales (86.5%). The most stable associations were formed by NFR and *S. aureus* (g=31.5%).

Keywords: microbial associations, etiological significance, chronic wounds.

Поступила 12.10.2020

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ПАЦИЕНТОВ С ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ В ОТДЕЛЕНИИ РЕАНИМАЦИИ

[1]Ярец Ю.И., [1]Шевченко Н.И., [2]Ковалев В.О.

[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь

[2]Государственное учреждение здравоохранения «Гомельская городская клиническая больница № 1», Гомель, Республика Беларусь

Резюме. Выполнен анализ чувствительности клинических изолятов *Staphylococcus aureus* (n=80), CoNS (coagulase-negative staphylococci) (n=92), *Enterococcus faecalis* (n=210), *Pseudomonas aeruginosa* (n=259), *Acinetobacter baumannii* (n=216), *Klebsiella pneumoniae* (n=92), других представителей *Enterobacterales* (n=50), выделенных из 720 образцов биологического материала 195 пациентов с ожоговой болезнью. Распространенность метициллин-резистентных штаммов *S. aureus и* CoNS составляла 71%, 81% соответственно. У CoNS была более высокая устойчивость к левофлоксацину и гентамицину, чем у *S. aureus*: 42% и 23%, 46% и 29% соответственно (p<0,05). Высокий уровень резистентности к аминогликозидам и фторхинолонам проявляли и *E. faecalis* (>60 % изолятов). Полная чувствительность у грамположительных бактерий была к ванкомицину, тейкопланину, линезолиду и тигециклину. Устойчивость *P. aeruginosa* к цефалоспоринам и пенициллинам составляла от 88% до 100%. Высокой была резистентность у *A. baumannii* и *P. aeruginosa* к аминогликозидам, карбапенемам. Не обнаружено изолятов *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, резистентных к колистину. *K. pneumoniae* к карбапенемам проявляла устойчивость только в 23% случаев, а другие энтеробактерии к этой группе антибиотиков, как и большинству других, были полностью чувствительны.

Ключевые слова: ожоговая болезнь, антибиотикорезистентность, отделение реанимации.

Введение. На современном этапе отмечают, что проблема антибиотикорезистентности приобрела особую значимость в мире и имеет огромное социально-экономическое значение [1]. В большинстве регионов мира получили широкое распространение нозокомиальные штаммы микроорганизмов, характеризующиеся устойчивостью к большинству антимикробных препаратов (АМП). Полирезистентность характерна для штаммов грамположительных (Г+) (стафилококки, энтерококки) и грамотрицательных (Г-) бактерий (энтеробактерии, *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp.*). Так, в стационарах распространены устойчивые к метициллину (оксациллину) стафилококки (MRSA) и энтеробактерии, устойчивые к цефалоспориновым антибиотикам (продуценты бета-лактамаз расширенного спектра – БЛРС). Особую тревогу вызывает распространение в отделениях реанимации *P. aeruginosa, A. baumannii* и *Klebsiella pneumoniae* с множественной резистентностью к большинству антибиотиков, включая карбапенемы [2]. Одним из источников таких штаммов, в том числе обладающих дополнительными механизмами патогенности, являются пациенты с ожоговой болезнью (ОБ). Обширные и глубокие ожоги приводят к длительной госпитализации в отделении реанимации, требуют проведения множества инвазивных манипуляций, способствующих развитию инфекционных осложнений. При этом у этой категории пациентов нельзя не учитывать комменсальную флору, которая в таких условиях становится патогенной (энтерококки, коагулазонегативные стафилококки).

Анализ локальной антибиотикорезистентности является одним из важнейших принципов реализации системы инфекционного контроля в стационаре и разработки рекомендаций по лечению инфекций у пациентов с ОБ, находящихся в отделении реанимации конкретного учреждения здравоохранения.

Цель: оценить чувствительность к АМП изолятов бактерий, выделенных из образцов биологического материала пациентов с ОБ.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования были клинические изоляты Г+ и Г- бактерий, выделенные из 720 образцов биологического материала (пробы крови, раневого отделяемого, респираторные образцы, пробы мочи из мочевого катетера) 195 пациентов с ОБ. Пациенты находились на лечении в отделении реанимации ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница № 1» (г. Гомель, Республика Беларусь) в период 2014 г. – май 2020 г. Выделение и идентификация изолятов, определение чувствительности к АМП проводилось в лаборатории клеточных технологий ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека». Идентификацию выделенных штаммов проводили на автоматическом микробиологическом анализаторе VITEK 2 Compact (BioMerieux, Франция).

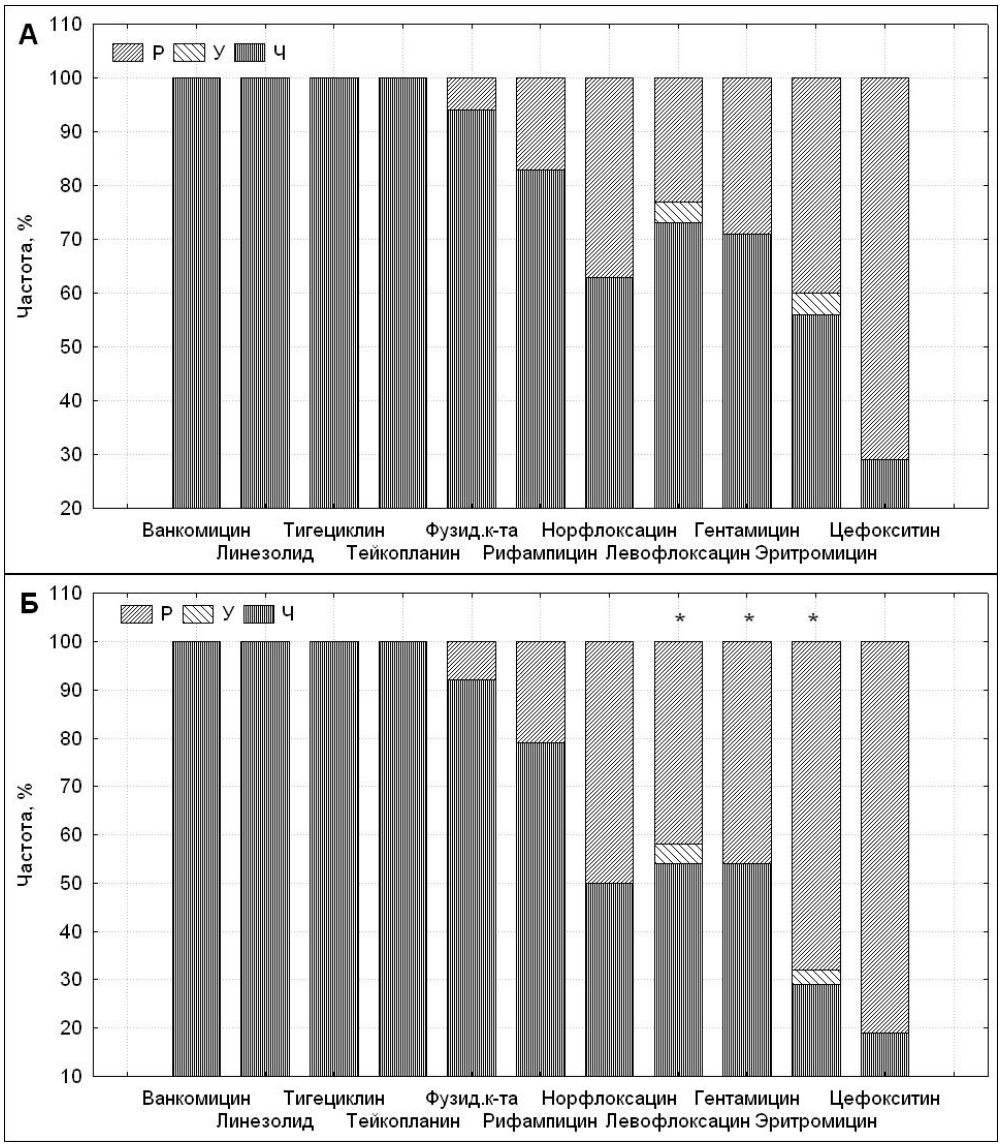
Для анализа чувствительности определены следующие категории микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* (n=80), CoNS (coagulase-negative staphylococci, коагулазонегативные стафилококки – *S. haemolyticus, S. epidermidis* и др.) (n=92), *Enterococcus faecalis* (n=210), *Pseudomonas aeruginosa* (n=259), *Acinetobacter baumannii* (n=216), *Klebsiella pneumoniae* (n=92), другие изоляты *Enterobacterales* (n=50).

Первичное определение чувствительности выделенных микроорганизмов к АМП проводилось диско-диффузионным методом (ДДМ) (использовались диски производства Bio-Rad, Франция) на среде Мюллера-Хинтон (Oxoid, Великобритания). При наличии фенотипической резистентности к большинству групп АМП с целью уточнения полученных результатов дополнительно выполнялось альтернативное исследование – определение МПК с использованием автоматического анализатора VITEK 2 Compact и полуавтоматического анализатора miniApi (BioMerieux, Франция). Для некоторых АМП (например, колистин) чувствительность оценивали с использованием коммерческих панелей. При выборе панели АМП, проведении исследования и интерпретации результатов определения чувствительности руководствовались клиническими рекомендациями [3] и стандартами EUCAST [4]. В панель тестирования включали препараты из различных групп, рекомендованных EUCAST 10.0, а также АМП, входящие в панель исследования для анализатора miniApi и VITEK 2 Compact, с учетом наличия регистрации АМП в Республике Беларусь в качестве изделий медицинского назначения для использования в клинической практике. При интерпретации результатов использовали следующие категории чувствительности: Ч – чувствительный при стандартном режиме дозирования; У – чувствительный при увеличенной экспозиции; Р – резистентный [4]. Для АМП, где указана нагрузка диска, определение чувствительности проводилось ДДМ, в остальных случаях – с использованием автоматизированных систем.

Статистические исследования, построение графиков проводили с помощью программного пакета «STATISTICA 6.1» (StatSoft Inc., США, регистрационный номер лицензионной версии GS-35F-589). Частотный анализ в таблицах сопряженности проводили с использованием критерия χ^2 и точного двустороннего критерия Фишера.

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты скрининга чувствительности к цефокситину (30 мкг) с использованием ДДМ выявили 71 и 81 % резистентных к метициллину штаммов *S. aureus и* CoNS, соответственно. Метициллинорезистентность, как известно, является маркером устойчивости к большинству бета-лактамных антибиотиков, а также ассоциированной устойчивости к антибиотикам других групп и представляет собой основную проблему антибиотикорезистентности стафилококков [1,

5]. Этот механизм резистентности связан с приобретением стафилококками дополнительного пенициллин-связывающего белка с низкой аффинностью к АМП этой группы. В свою очередь, к ванкомицину, который традиционно является средством выбора для лечения инфекций, вызванных метициллин-резистентными Г+ бактериями, у *S. aureus и* CoNS обнаруживалась полная чувствительность (рисунок 1).



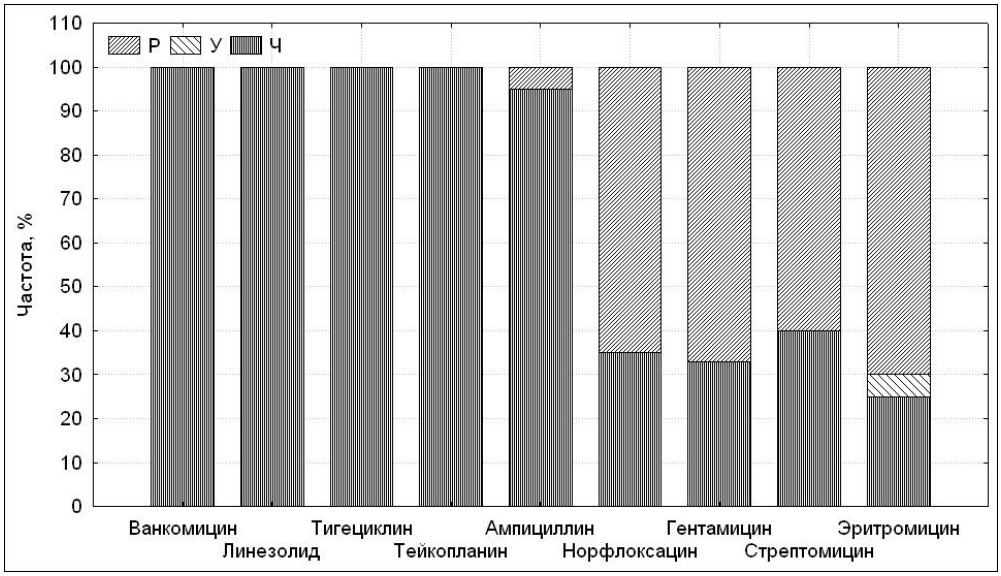
Ч – чувствительный при стандартном режиме дозирования; У – чувствительный при увеличенной экспозиции; Р – резистентный. А – результаты определения чувствительности для *S. aureus*, Б – результаты определения чувствительности для CoNS. Фузид.к-та – сокращение для фузидиевой кислоты

Рисунок 1. – Чувствительность изолятов стафилококков к АМП

В качестве альтернатив ванкомицину на современном этапе рассматривают такие антибиотики, как тейкопланин, линезолид, тигециклин, к которым резистентность не проявляется [1, 5]. К этим антибиотикам стафилококки также были полностью чувствительны. Резистентность к ряду АМП у *S. aureus* и CoNS различалась. Скрининг чувствительности к фторхинолонам (диск с норфлоксацином, 10 мкг) выявил 37% резистентных штаммов *S. aureus* и 50% резистентных CoNS. Дополнительный анализ показал, что CoNS демонстрировали значимо более высокую устойчивость к левофлоксацину, чем

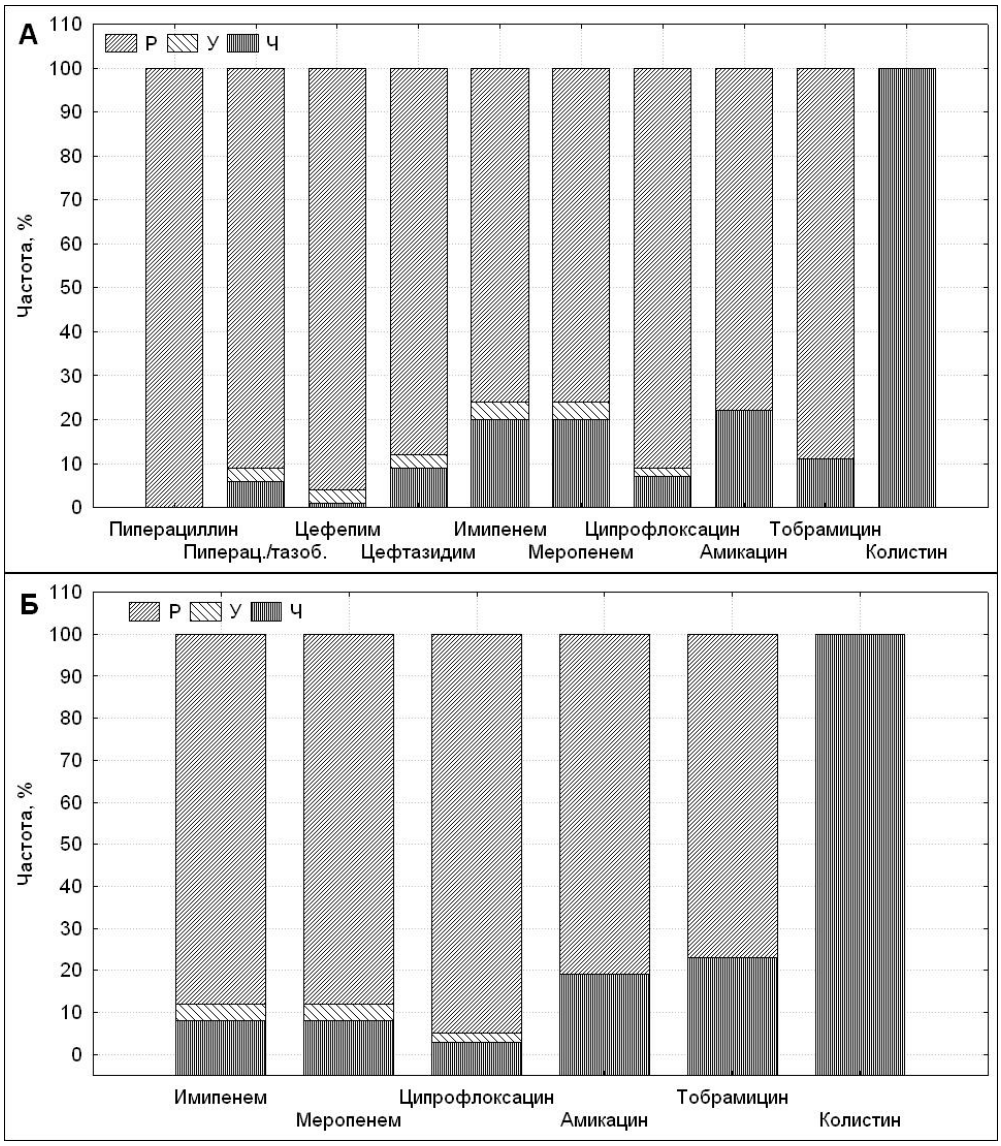
S. aureus: 42% и 23% соответственно (χ^2=6,91; p=0,086); по 4% штаммов были отнесены к категории «У». Резистентность к гентамицину – маркеру устойчивости к аминогликозидам у CoNS была также выше – 46%, тогда как у *S. aureus* устойчивость составляла 29% (χ^2=6,58; p=0,013). Значительные различия в частоте устойчивости отмечались и в группе макролидов. К эритромицину – маркеру для определения чувствительности к другим макролидам были резистентны 68% CoNS и 40% *S. aureus* (χ^2=13,45; p=0,002). Единичные изоляты были отнесены к категории «У» – 4% *S. aureus* и 3% CoNS. Низкой была устойчивость всех стафилококков к фузидиевой кислоте (6% для *S. aureus* и 8% для CoNS) (рисунок 1). Некоторые исследователи рассматривают возможность местного применения фузидиевой кислоты при инфекциях кожи и мягких тканей [5].

Резистентность *E. faecalis* к ампициллину составила 5%, что в целом согласуется с литературными данными. Высокий уровень резистентности к аминогликозидам (индикаторные антибиотики – гентамицин 30 мкг, стрептомицин – 300 мкг) был определен у весомого числа изолятов – 60% для стрептомицина и 67% для гентамицина. Устойчивость высокого уровня к аминогликозидам у энтерококков активно регистрируется в мире, о чем говорят результаты различных исследований [6]. В клинической практике высокий уровень резистентности к аминогликозидам у энтерококков проявляется отсутствием бактерицидного эффекта в комбинации их с пенициллинами или гликопептидами. Скрининг чувствительности к фторхинолонам (диск с норфлоксацином, 10 мкг) выявил 65% устойчивости. Полная чувствительность у *E. faecalis,* выделенных из различных биологических образцов пациентов с ОБ отмечалась к гликопептидным антибиотикам – ванкомицину, тейкопланину, а также к линезолиду и тигециклину (рисунок 2).



Ч – чувствительный при стандартном режиме дозирования; У – чувствительный при увеличенной экспозиции; Р – резистентный

Рисунок 2. – Чувствительность изолятов *E. faecalis* к АМП

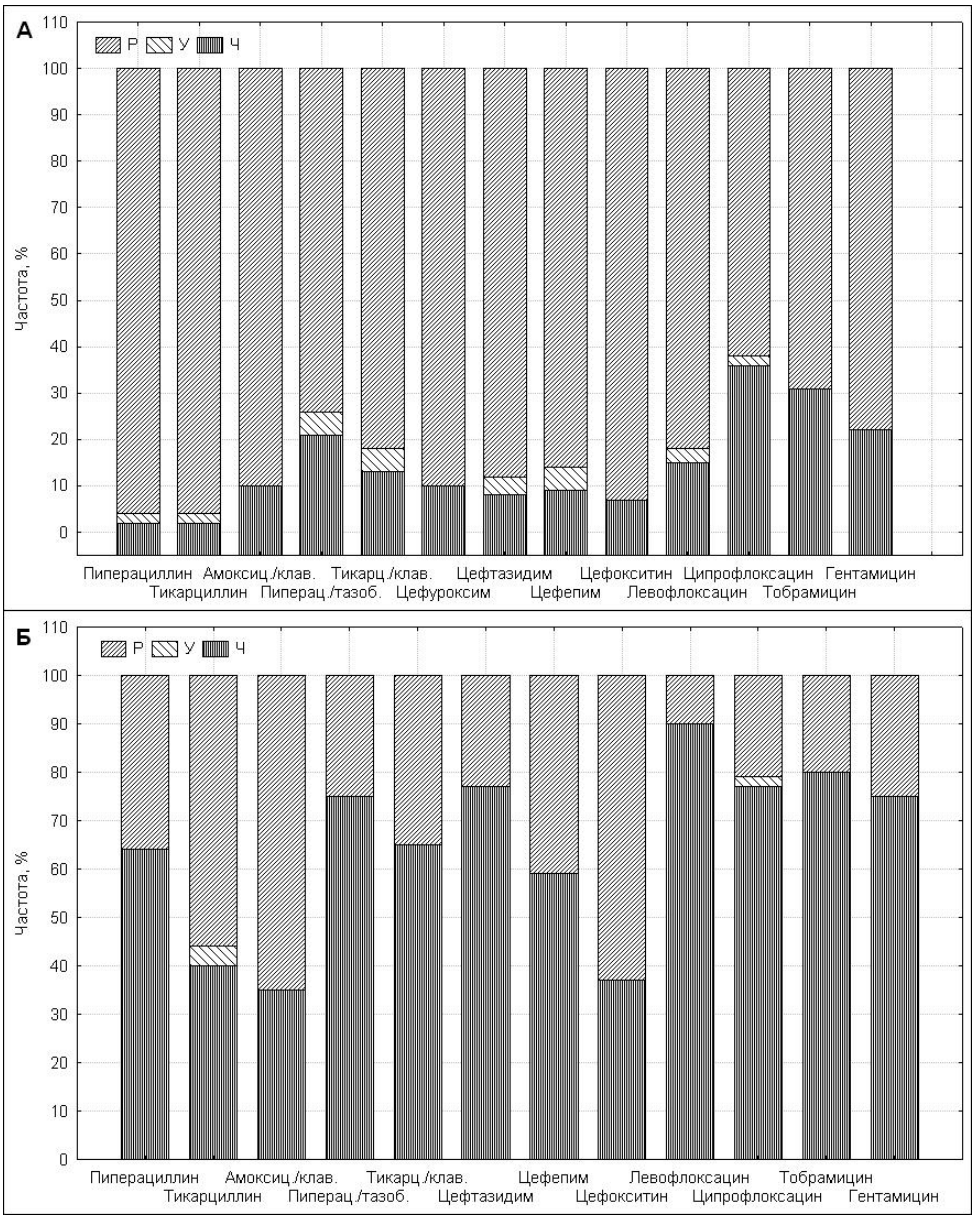


Ч – чувствительный при стандартном режиме дозирования; У – чувствительный при увеличенной экспозиции; Р – резистентный. А – результаты определения чувствительности для *P. aeruginosa*, Б – результаты определения чувствительности для *A. baumannii*. Пиперац./тазоб. – сокращение для пиперациллина/тазобактама

Рисунок 3. – Чувствительность изолятов НФБ к АМП

Чувствительность *A. baumannii* к АМП представлена с учетом их природной резистентности к пенициллинам (включая пиперациллин и пиперациллин-тазобактам) и цефалоспоринам (цефепим и цефтазидим). Известно, что *P. aeruginosa* в условиях стационара быстро приобретает устойчивость. В настоящем исследовании регистрировалась полная (100%) или практически полная (91%) резистентность *P. aeruginosa* к препаратам пенициллинового ряда (пиперациллин, пиперациллин/тазобактам). Также высокий уровень резистентности был выявлен для цефепима и цефтазидима (96% и 88% соответственно). Резистентность к фторхинолонам (ципрофлоксацин) у *P. aeruginosa* и *A. baumannii* была практически одинаковой и составляла 91% и 95% соответственно. Высокой была резистентность к карбапенемам – имипенему, меропенему (88% для *A. baumannii,* 76% для *P. aeruginosa),* по 4% изолятов обнаруживали чувствительность при увеличенной экспозиции (категория «У»). К аминогликозидам – амикацину, тобрамицину у *P. ae-*

ruginosa резистентность составляла 78% и 89%, у *A. baumannii* – 81% и 77% соответственно. Наиболее активными в плане антибактериального действия оставался колистин – резистентных штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* обнаружено не было (рисунок 3). *P. aeruginosa* и *A. baumannii* в настоящее время признаются наиболее частыми возбудителями нозокомиальных инфекций, исследователями России и Беларуси отмечен высокий уровень устойчивости НФБ к АМП [1, 7].



Ч – чувствительный при стандартном режиме дозирования; У – чувствительный при увеличенной экспозиции; Р – резистентный. А – результаты определения чувствительности для *K. pneumoniae*, Б – результаты определения чувствительности для других *Enterobacterales*. Пиперац./тазоб., амоксиц./клав., тикарц./клав – сокращения для пиперациллина/тазобактама, амоксициллина/клавулоната, тикарциллина/клавулоната соответственно

Рисунок 4. – Чувствительность изолятов Enterobacterales к АМП

Согласно полученным ранее результатам микробиологического посева, *K. pneumoniae* была наиболее часто встречаемым видом среди представителей *Enterobacterales*. В связи с этим анализ чувствительности к антибиотикам был проведен отдельно для

K. pneumoniae, чувствительность остальных видов энтеробактерий представлена в объединенном виде (рисунок 4). Полученные результаты показали высокую устойчивость *K. pneumoniae* к большинству АМП. Фенотипические признаки устойчивости к цефалоспоринам 3-го поколения, в том числе ингибиторо-защищенным, позволяли предположить продукцию БЛРС у *K. pneumoniae*. Полученные данные об уровне резистентности энтеробактерий, в частности *K. pneumoniae,* к цефалоспоринам сопоставимы с результатами многоцентрового исследования России «МАРАФОН» [8]. Фенотипическую оценку продукции БЛРС дополнительно подтверждали с использованием Е-тестов – цефепим+клавулановая кислота. В случаях наличия резистентности к цефалоспоринам эффективности в лечении инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, стоит ожидать только от карбапенемов. К имипенему, меропенему *K. pneumoniae* проявляла резистентность только в 23% случаев. Дополнительный скрининг продукции карбапенемаз проводили с помощью метода инактивации карбапенемов (Carbapenem Inactivation Method, CIM). Наличие карбапенемаз определяли при выявлении изолятов с зоной подавления роста менее 27 мм для меропенема или изолятов с МПК меропенема >0,12 мг/л. Обращает на себя внимание высокая резистентность к аминогликозидам: амикацину (60%), торбамицину (69%), гентамицину (77,5%). Ципрофлоксацин проявлял относительную активность (62% резистентности) против *K. pneumoniae* (рисунок 4-А).

Другие энтеробактерии – *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *E. coli* характеризовались значимо более низкой частотой обнаружения резистентных штаммов, по сравнению с *K. pneumoniae* ($p<0,05$). Полная чувствительность обнаруживалась для карбапенемов. Активность цефалоспоринов была выше, чем для *K. pneumoniae* – 23%, 41% для цефтазидима и цефепима, соответственно. Регистрировалась высокая чувствительность к фторхинолонам – ципрофлоксацину и левофлоксацину (рисунок 4-Б).

Заключение. По результатам оценки чувствительности изолятов бактерий, выделенных из образцов клинического материала пациентов с ОБ, распространенность метициллин-резистентных штаммов *S. aureus* и CoNS составляла 71% и 81% соответственно. У CoNS была более высокая устойчивость к левофлоксацину и гентамицину, чем у *S. aureus*: 42% и 23%, 46% и 29%, соответственно ($p<0,05$). Высокий уровень резистентности к аминогликозидам и фторхинолонам проявляли и *E. faecalis* (>60% изолятов). Полная чувствительность у Г+ бактерий была к ванкомицину, тейкопланину, линезолиду и тигециклину. Устойчивость *P. aeruginosa* к цефалоспоринам и пенициллинам составляла от 88% до 100%. Высокой была резистентность у *A. baumannii* и *P. aeruginosa* к аминогликозидам, карбапенемам. Не обнаружено изолятов *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, резистентных к колистину. *K. pneumoniae* к карбапенемам проявляла устойчивость только в 23% случаев, а другие энтеробактерии к этой группе антибиотиков, как и большинству других, были полностью чувствительны.

Исследование выполнено в рамках финансируемого задания государственной программы научных исследований на 2016-2020 гг. «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», подпрограмма 2 «Диагностика и терапия заболеваний» по теме «Изучение патогенного потенциала клинически значимых штаммов бактерий для повышения эффективности системы инфекционного контроля в стационаре».

Литература

1. Диагностика и антимикробная терапия инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами. Методические рекомендации Российской некоммерческой общественной организации «Ассоциация анестезиологов-реаниматологов», Межрегиональной общественной организации «Альянс клинических химиотерапевтов и микробиологов», Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), общественной организации «Российский Сепсис Форум» / В.Б. Белобородов [и др.] / Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2020. – Т. 17, № 1. – С. 52-83. doi: 10.21292/2078-5658-2020-17-1-52-83.

2. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи. Российские клинические рекомендации. – М., 2017. – 131 с.

3. Клинические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, Версия 03.2018. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf. – Дата доступа: 10.10.2020.

4. Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам. Таблицы пограничных значений для интерпретации значений МПК и диаметров зон подавления роста. Версия 10.0, 2020. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.antibiotic.ru/iacmac/ru/docs/eucast/eucast-clinical-breakpoints-bacteria-10.0-rus.pdf. – Дата доступа: 10.10.2020.

5. Антибиотикорезистентность коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных в стационарах Санкт-Петербурга и Москвы / В.В. Гостев [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – Т. 60, № 9-10. – С. 23-28.

6. Антибиотикорезистентность госпитальных штаммов *Enerococcus spp.*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови: результаты многоцентрового исследования / Г.А. Клясова [и др.] // КМАХ. – 2018. – Т. 20, № 2. – С. 142-149.

7. Тапальский, Д.В. *Acinetobacter baumannii*: распространенность, спектр и динамика антибиотикорезистентности, чувствительность к комбинациям антибиотиков / Д.В. Тапальский, Н.А. Бонда // Журн. Гродненского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 16, № 3. – С. 286-291. doi: 10.25298/2221-8785-2018-16-3-286-291.

8. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacterales* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015-2016» / М.В. Сухорукова [и др.] // КМАХ. – 2019. – Т. 12, № 2. – С. 149-159.

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF CLINICAL BACTERIA STRAINS ISOLATED FROM SAMPLES OF PATIENTS WITH EXTENSIVE BURNS IN INTENSIVE CARE UNIT

[1]Yarets Y.I., [1]Shevchenko N.I., [2]Kovalev V.O.

[1]Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Republic of Belarus

[2]Gomel City Clinical Hospital No. 1, Gomel, Republic of Belarus

Antimicrobial sensitivity analysis of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* (n=80), CoNS (coagulase-negative staphylococci) (n=92), *Enterococcus faecalis* (n=210), *Pseudomonas aeruginosa* (n=259), *Acinetobacter baumannii* (n = 216), *Klebsiella pneumoniae* (n=92), other representatives of *Enterobacterales* (n=50), isolated from 720 different samples from 195 patients with extensive burns. The prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* and CoNS strains was 71%, 81%, respectively. CoNS had higher resistance to levofloxacin and gentamicin than *S. aureus*: 42%, and 23%, 46%, and 29% respectively ($p<0.05$). *E. faecalis* also showed a high level of resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones (>60% of isolates). Gram-positive bacteria were completely susceptible to vancomycin, teicoplanin, linezolid, and tigecycline. *P. aeruginosa* resistance to cephalosporins and penicillins ranged from 88% to 100%. *A. baumannii* and *P. aeruginosa* were highly resistant to aminoglycosides and carbapenems. No isolates of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* resistant to colistin were found. *K. pneumoniae* showed resistance to carbapenems only in 23% of cases, and other *Enterobacteriaceae* to this group of antibiotics, like most others, were completely sensitive.

Keywords: extensive burns, antibiotic resistance, intensive care unit.

Поступила 22.10.2020

ВИРУСОЛОГИЯ

Оригинальные исследования

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ФОРМЫ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ И МОЛОДЫХ ВЗРОСЛЫХ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

[1]Амвросьева Т.В., [1]Богуш З.Ф., [1]Аринович А.С., [1]Кишкурно Е.П., [2]Марейко Ю. Е., [2]Минаковская Н.В.

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

[2]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, республика Беларусь

Резюме. Статья посвящена актуальной для здравоохранения проблеме дифференциальной генодиагностики вирусных инфекций, являющихся одной из важных причин заболеваемости и смертности детей и молодых взрослых после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Изучена распространенность вирусных инфекций, вызываемых цитомегаловирусом (ЦМВ), вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ), вирусами герпеса человека 6 и 7 типов (ВГЧ-6, ВГЧ-7), полиомавирусами (BKV, JCV), аденовирусами (АдВ) и норовирусами (НоВ), описаны посттрансплантационные вирусассоциированные осложнения у данной категории пациентов. Установлено, что частота регистрации вирусных инфекций составила 96%. Доминирующими их возбудителями были BKV (57%), ВГЧ-6 (56%), ВГЧ-7 (45%). Активная вирусная инфекция в виде виремии чаще наблюдалась при ВГЧ-6 инфекции (у 42% реципиентов) и ВЭБ инфекции (у 23%). Анализ кинетики развития инфекций показал, что пик их регистрации имел место в первый месяц после операции. ТГСК в 50% случаев сопровождалась осложнениями, которые наиболее часто отмечались на фоне ВГЧ-6 инфекции. Полученные результаты указывают на весомый вклад ряда вирусных агентов в развитие посттрансплантационных осложнений и диктуют необходимость их регулярного мониторинга в послеоперационном периоде для выработки адекватных схем проводимой терапии с целью профилактики тяжелых последствий вплоть до фатальных исходов.

Ключевые слова: вирусные инфекции, дети, трансплантация, гемопоэтические стволовые клетки, дифференциальная диагностика, вирусные осложнения.

Введение. Вирусные инфекции вносят значительный вклад в заболеваемость и смертность у детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Доминирующими возбудителями вирусассоциируемых осложнений являются цитомегаловирус (ЦМВ), вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), вирус герпеса человека 6 и 7 типов (ВГЧ-6, ВГЧ-7), варицелла-зостер вирус (ВЗВ), полиомавирусы (BKV, JCV), аденовирусы (АдВ) и норовирусы (НоВ). Они вовлекают в инфекционный процесс практически все органы и системы организма человека, включая легкие, гастроинтестинальный тракт, ЦНС и гемопоэтическую систему. При наращивании иммуносупрессии на фоне подавления Т-клеточного иммунитета эти инфекции у пациентов после трансплантации могут протекать особенно тяжело. Так, по литературным данным, частота посттрансплантационных герпесвирусных энцефалитов у детей-реципиентов гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) достигает 6,3% [1, 2]. Пациенты с фульминантным течением инфекции,

вызванной ВЭБ, имеют высокий риск развития лимфопролиферативных посттрансплантационных заболеваний [3]. Розеоловирусы, включающие ВГЧ-6 и ВГЧ-7 типы, могут вызывать разнообразные клинические формы, протекающие в виде внезапной экзантемы, неврологических заболеваний. Наибольшую опасность представляет хромосомно-интегрированная форма ВГЧ-6 (хиВГЧ-6), которая характеризуется необычно высокой вирусной нагрузкой в крови и во всех других тканях организма. Именно хиВГЧ-6 может вызывать тяжелые заболевания ЦНС, включая энцефалит и энцефаломиелит [4-8]. Результаты зарубежных исследований по мониторингу АдВ инфекции показали, что в первые 50 дней после трансплантации у 57% реципиентов ГСК в фекалиях были выявлены вирусы, у 33% регистрировалась виремия [9, 10]. Все пациенты, у которых имела место виремия, в дальнейшем погибли. У 22% реципиентов ГСК развивается хроническая форма НоВ инфекции, которая может длиться годами, приводить к НоВ-ассоциированной энтеропатии и даже смерти [11]. Наиболее частым и серьезным клиническим проявлением реактивации полиомавирусов является геморрагический цистит (развивается у 10-25% реципиентов) [12].

В настоящее время, благодаря доступности новых противовирусных лекарственных средств и новых стратегий клеточной терапии, достигнут значительный прогресс в лечении вирусных заболеваний. В этих условиях проведение вирусологического мониторинга в посттрансплантационный период является чрезвычайно целесообразным для раннего выявления и установления этиологии вирусных осложнений, что позволяет своевременно внести коррекцию в лечебные и профилактические схемы ведения реципиентов [11, 13].

Целью настоящего исследования было изучение распространенности и форм инфекций, вызванных АдВ, BKV, JCV, ЦМВ, ВЭБ, ВЗВ, ВГЧ 6 и 7 типов, НоВ, у детей и молодых взрослых после аллогенной ТГСК.

Материалы и методы исследования. За период май 2018 г. – май 2020 г. обследовано 45 реципиентов ГСК в возрасте 1,5-29 лет (медиана 11,9 лет), которым выполнено 46 аллогенных ТГСК различных видов (1 реципиенту ТГСК была выполнена повторно в связи с недостаточностью функционирования трансплантата) на базе ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии». У пациентов, включенных в исследование, патологиями, приведшими к ТГСК, являлись: острый лимфобластный лейкоз (у 13 пациентов), острый миелоидный лейкоз (8), острый бифенотипический лейкоз (2), миелодиспластический синдром (6), неходжкинская лимфома (3), врожденная апластическая анемия (1), приобретенная апластическая анемия (6), первичный иммунодефицит (5), лимфогранулематоз (1), талассемия (1).

Проведены генодиагностические исследования 754 проб биологического материала (293 пробы крови, 269 проб мочи, 3 пробы спинномозговой жидкости, 152 пробы слюны, 32 пробы фекалий, 3 образца биоптата/аутоптата, 1 образец волос и 1 образец ногтей). Установлена следующая периодичность исследования материала: до трансплантации, первые 100 дней после трансплантации (1 или 2 раза в 2 недели), спустя 100 дней (по показаниям).

Выделение ДНК/РНК из образцов волос и ногтей осуществляли с помощью реагентов «АртДНК MiniSpin Эксперт» («АртБиоТех», Беларусь), из остальных образцов биологического материала – с использованием наборов «РИБОпреп» (Амплисенс, Россия) и «НК-экстра» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь).

Выявление ДНК BKV, JCV, ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6, ВГЧ-7, АдВ, РНК НоВ проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Детекцию ДНК BKV и JCV осуществляли согласно методике определения ДНК полиомавирусов (ВК и JC вирусов) с использованием взятых из литературных источников праймеров (PM2+, PM2-) и зондов (BKVp, JCVp) [14]. Количественную детекцию BKV проводили

с использованием «Набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК BKV методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь). Детекцию ДНК ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6 осуществляли с использованием наборов реагентов "АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL", ДНК ВГЧ-7 – с помощью праймеров и зонда, взятых из литературного источника [15], обнаружение АдВ и НоВ – тест-системой «ОКВИ-ПЦР» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь). Постановку ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторах RotorGeneQ (Corbett Life Sciences, Австралия), CFX96 Real-TimeSystem (Bio-Rad, США), Quant Studio 5 (Thermo Scientific, США).

Результаты исследования и их обсуждение. По результатам выполненных молекулярно-генетических исследований биологического материала (клетки и сыворотка крови, моча, спинномозговая жидкость, слюна, фекалии, биоптаты/аутоптаты, волосы и ногти), забранного у реципиентов после проведения ТГСК, частота выявления вирусных инфекций в целом составила 96%. Наиболее часто детектируемыми вирусными агентами были BKV (57%), ВГЧ-6 (56%), ВГЧ-7 (45%) и ВЭБ (33%) (рисунок). При этом виремия, свидетельствующая об активной вирусной инфекции, была зарегистрирована у 27 пациентов (57%, n=46).

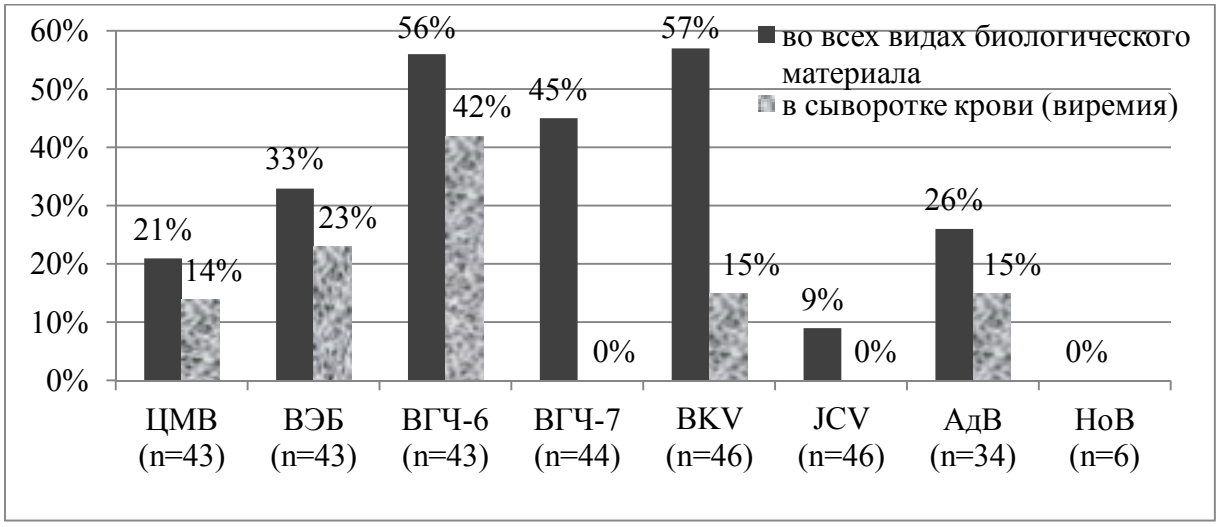


Рисунок. – Частота детекции ДНК/РНК возбудителей вирусных инфекций во всех видах биологического материала, и частота выявления виремии у реципиентов после ТГСК

Розеоловирусы (ВГЧ-6 и ВГЧ-7) чаще обнаруживались в слюне и клетках крови, что коррелирует с местами их персистенции. У одной пациентки была установлена хиВГЧ-6 инфекция, на что указывало наличие вирусной ДНК в образцах волос и ногтей в концентрации lg5,1 и lg5,3 геномных копий в 10^5 клеток, соответственно [16]. ВГЧ-6-виремия была выявлена у 42% (n=43) пациентов, ВГЧ-7-виремия не регистрировалась.

BKV инфекция чаще проявлялась в виде вирурии. У 15% реципиентов была отмечена не только вирурия, но и виремия. Уровни вирусной нагрузки при виремии колебались в значениях до $1{,}2\times10^8$ копий/мл, а при вирурии – до $5{,}3\times10^{11}$ копий/мл. JCV инфекция сопровождалась только вирурией.

ВЭБ-, АдВ- и ЦМВ-виремия выявлялась у 23%, 15% и 14% реципиентов, соответственно.

Более подробные результаты вирусологического мониторинга, базирующегося на осуществлении генодиагностического обследования реципиентов ГСК до трансплантации и в динамике течения посттрансплантационного периода, представлены в таблице.

Установлено, что детектируемые возбудители обнаруживались ещё в период кондиционирования (до проведения операции). Пик их выявления в посттрансплантационном периоде приходился на первый месяц после ТГСК. При этом пик регистрации BKV- и ВГЧ-6-виремии имел место на 15–28 сутки, ЦМВ-виремии – на 1-14 сутки после ТГСК.

Таблица. – Частота детекции возбудителей вирусных инфекций у реципиентов до трансплантации и в разные периоды после ТГСК

Периоды при ТГСК	*BKV (n=46)*	*JCV (n=46)*	*ЦМВ (n=43)*	*ВЭБ (n=43)*	*ВГЧ-6 (n=43)*	*ВГЧ-7 (n=44)*	*АдВ (n=34)*
До ТГСК	30%	4%	7%	16%	21%	25%	3%
0 – +14 сутки	54%	13%	16%	5%	33%	39%	6%
+15 – +28 сутки	50%	9%	5%	16%	51%	36%	9%
+29 – +42 сутки	43%	4%	7%	9%	16%	14%	9%
+43 – +70 сутки	28%	2%	5%	16%	16%	20%	6%
+71 – +109 сутки	26%	2%	5%	14%	7%	11%	6%

Спустя 110 дней посттрансплантационного периода у 4 пациентов из 4 обследованных обнаруживался BKV, у 3 из 5 – ЦМВ (у 2 из них отмечена виремия), у 3 из 5 – ВЭБ (у 1 из них имела место виремия).

В 50 % случаев выполненных ТГСК (в 23 из 46) имела место реактивация вирусных инфекций, которая происходила на разных этапах после операции и сопровождалась осложнениями различной вирусной этиологии. Так, у 7 пациентов в период +37 – +105 день после ТГСК развились ВЭБ-ассоциированные осложнения в виде: легкой формы лимфопролиферативного синдрома, поражения печени (у 1 пациента на +44 день); слабо выраженной лимфопролиферации с быстрым ростом вирусной нагрузки и появлением большого числа реактивных лимфоцитов в крови (у 1 ребенка на +37 день); лимфопролиферации с гиперпротеинемией, гипериммуноглобулин-G-емией (у 2 пациентов на +54 и +105 день); мукокутанной язвы левой небной миндалины (у 1 реципиента на +74 день); умеренного лимфопролиферативного синдрома с поражением печени и стенки кишечника на фоне агрессивной иммуносупрессивной терапии по поводу лечения острой РТПХ 4 степени (у 1 пациента на +55 день); острой РТПХ 4 степени, выраженной лимфопролиферации в слизистой желудка и 12-перстной кишки и почек (у 1 реципиента на +75 день - пациент умер).

ВГЧ-6-ассоциированные осложнения имели место у 12 реципиентов в период +8 – +27 день, клинические проявления которых включали: дерматит (у 3 пациентов); поражения слизистой полости рта (у 1 пациента); фульминантный гепатит (у 1 пациента на +9 день с летальным исходом на +17 сутки); гепатит легкой и средней степени тяжести (у 5 пациентов на +9 и +23 день); тяжелый гепатит и цитопению на фоне смешанной ВГЧ-6+ВЭБ инфекции (у 1 пациента с летальным исходом на +82 день); колит на фоне смешанной ВГЧ-6+ЦМВ+АдВ+ВЭБ инфекции (у 1 пациента).

У 7 пациентов среди осложнений на фоне ЦМВ инфекции в период +12 - +84 день были зарегистрированы 2 случая колита средней и тяжелой степени, 2 случая гепатита легкой степени и 5 эпизодов кратковременной или длительной цитопении различной степени тяжести. У 2 пациентов цитопения была связана только с активацией ЦМВ, а у 3 имела поливирусную этиологию (ЦМВ+ВГЧ-6+парвовирус В19).

У 3 пациентов в первый месяц посттрансплантационного периода (+16, +24 и +29 день) развился BKV-ассоциированный геморрагический цистит. У 2 из них отмечалась одновременая активация BKV и ВГЧ-6. Геморрагический цистит у 2 реципиентов имел среднетяжелое течение (процесс разрешился), у 1 – тяжелое с развитием BKV-

ассоциированного геморрагического нефрита, сопровождающегося волнообразным течением, что внесло вклад в смерть пациента на +82 день после ТГСК.

У 4 пациентов был диагностирован энтероколит АдВ этиологии, на фоне которого наблюдалось развитие синдрома приживления и/или острой РТПХ с поражением кишечника. У 1 реципиента кроме колита развился и геморрагический цистит смешанной этиологии (АдВ+BKV). На фоне положительной динамики по проявлениям кожной и печеночной форм у реципиентов сохранялись явления выраженного энтероколита. Выявление АдВ в фекалиях одного из пациентов позволило избежать необоснованной эскалации иммуносупрессивной терапии, что могло усилить состояние вторичного иммунодефицита, который ассоциирован с высоким риском тяжелых инфекционных осложнений и рецидивом лейкоза.

Выводы. По результатам проведенной дифференциальной генодиагностики вирусных инфекций, возбудителями которых оказались ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ 6, ВГЧ 7, АдВ, BKV, JCV, HoB, установлена достаточно высокая частота их регистрации (96%). Доминирующими возбудителями были BKV (57%), ВГЧ-6 (56%), ВГЧ-7 (45%). Активная вирусная инфекция в виде виремии чаще наблюдалась при ВГЧ-6 инфекции (у 42% реципиентов) и ВЭБ инфекции (у 23% обследованных).

Кинетика развития инфекций характеризовалась пиком их регистрации в первый месяц после операции.

В 50% случаев ТГСК сопровождалась осложнениями, которые наиболее часто ассоциировались с ВГЧ-6 инфекцией.

Полученные результаты указывают на весомый вклад ряда вирусных агентов в развитие посттрансплантационных осложнений и диктуют необходимость их регулярного мониторинга в послеоперационном периоде для выработки адекватных схем проводимой терапии с целью профилактики тяжелых последствий вплоть до фатальных исходов.

Литература

1. Risk factors and outcomes of cytomegalovirus viremia in pediatric hematopoietic stem cell transplantation patients / J.L. Wu [et al.] // J. Microbiol. Immunol. Infect. – 2017. – Vol. 50. – P. 307-313.

2. Viral reactivations and associated outcomes in the context of immune reconstitution after pediatric hematopoietic cell transplantation / R. Admiraal [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2017. – Vol. 140. – P. 1643-1650.

3. Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines / J. Styczynski [et al.] // Haematologica. – 2016. – Vol. 101, No. 7. – P. 803-811.

4. Clinical characteristics and outcome of human herpesvirus-6 encephalitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / M. Ogata [et al.] // Bone Marrow Transplant. – 2017. – Vol. 52. – P. 1563-1570.

5. Reactivation of human herpes virus-6 after pediatric stem cell transplantation: risk factors, onset, clinical symptoms and association with severity of acute graft-versus-host disease / D.H. Verhoeven [et al.] // Pediatr. Infect. Dis. J. – 2015. – Vol. 34. – P. 1118-1127.

6. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers: ciHHV-6 Q & A / P.E. Pellett [et al.] // Rev. Med. Virol. – 2012. – Vol. 22, No. 3. – P. 144-155.

7. Human herpes virus-6 DNA in cerebrospinal fluid of children undergoing therapy for acute leukaemia / B. Wittekindt [et al.] // Brit. J. Haematol. – 2009. – Vol. 145, No. 4. – P. 542-545.

8. Severe encephalomyelitis in an immunocompetent adult with chromosomally integrated human herpesvirus 6 and clinical response to treatment with Foscarnet plus Ganciclovir / S.B. Troy [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 47, No. 12. – P. e93-e96.

9. Kojaoghlanian, T. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host / T. Kojaoghlanian, P. Flomenberg, M.S. Horwitz // Rev. Med. Virol. – 2003. – Vol. 13. – P. 155-171.

10. Florescu, D.F. Adenovirus in solid organ transplant recipients: Guidelines from the American

Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice / D.F. Florescu, J.M. Schaenman // Clin. Transplant. – 2019. – Vol. 33, No. 9. – P. e13527. doi: 10.1111/ctr.13527

11.Ljungman, P. Viral infections / P. Ljungman, J. Styczynski, H. Einsele // In: The EBMT Handbook – 2019. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies / eds.: E. Carreras [et al.]. – Springer Int. Publ., 2019. – P. 281-290. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02278-5

12.ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients / S. Cesaro [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. – 2018. – Vol. 73. – P. 12-21.

13.Cytomegalovirus treatment in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients / B.A. Wattles [et al.] // J. Pediatr. Hematol. Oncol. – 2017. – Vol. 39. – P. 241-248.

14.Development and validation with clinical samples of internally controlled multiplex real-time PCR for diagnosis of BKV and JCV infection in associated pathologies / A. Bárcena-Panero [et al.] // Compar. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. – 2012. –Vol. 35, No. 2. – P. 173-179.

15.Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7 / K. Wada [et al.] // Microbiol. Immunol. – 2009. – Vol. 53, No. 1. – P. 22-29.

16.Flamand, L. Chromosomal Integration by Human Herpesviruses 6A and 6B / L. Flamand // In: Human Herpesviruses / eds.: Y. Kawaguchi, Y. Mori, H. Kimura. – Singapore: Springer Singapore, 2018. – Vol. 1045. – P. 209-226.

PREVALENCE AND FORMS OF VIRAL INFECTIONS IN CHILDREN AND YOUNG ADULTS AFTER HEMOPOETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

[1]Amvrosieva T.V., [1]Bogush Z.F., [1]Arinovich A.S., [1]Kishkurno E.P., [2]Minakovskaya N.V., [2]Mareika Yu.E.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

[2]Republican Research & Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology, and Immunology, Minsk, Republic of Belarus

The article is devoted to the urgent problem of differential genetic diagnosis of viral infections, which are essential causes of morbidity and mortality in children and young adults after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The prevalence of viral infections caused by polyomaviruses (BKV, JCV), cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), human herpes viruses 6 and 7 types (HHV-6, HHV-7), adenoviruses (AdV) and noroviruses (NoB) has been studied, and post-transplant virus-associated complications in this category of patients were described. It was found that the frequency of registration of viral infections was 96%. Their dominant pathogens were BKV (57%), HHV-6 (56%), HHV-7 (45%). Active viral infection in the form of viremia was more often observed with HHV-6 infection (in 42% of recipients) and EBV infection (in 23%). An analysis of the kinetics of the development of infections showed that the peak of their registration took place in the first month after the operation. HSCT in 50% of cases was accompanied by complications, which were most often observed against the background of HHV-6 infection. The results obtained indicate the active participation of a number of viral agents in the development of post-transplant complications and dictate the need for their regular monitoring in the postoperative period in order to develop adequate treatment regimens in order to prevent severe consequences up to fatal outcomes.

Keywords: viral infections, children, transplantation, hematopoietic stem cells, differential diagnosis, viral complications.

Поступила 22.10.2020

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ КОМПЛЕКТА ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК BKV, JCV, АдВ

Аринович А.С., Бельская И.В., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В.

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

Резюме. В рамках создания мультиплексной диагностической тест-системы для одновременной детекции и количественного определения BKV, JCV и АдВ разработан комплект праймеров и зондов. Экспериментальная его апробация на биологическом материале подтвердила специфичность выбранных последовательностей к ДНК наиболее распространенных генотипов АдВ, циркулирующих на территории Республики Беларусь (1-7, 41).

Ключевые слова: полиомавирусы, аденовирусы, полимеразная цепная реакция.

Введение. Важным этапом современных схем генодиагностики вирусных инфекций у иммунокомпрометированных пациентов (реципиенты органов и клеток, ВИЧ-инфицированные, пациенты с иммунодефицитами, аутоиммунными заболеваниями) является установление вирусной нагрузки возбудителя, от уровня которой зависит тактика лечебных мероприятий, направленных на сдерживание и подавление инфекционного процесса. Среди распространенных этиологических агентов инфекций, регистрируемых у этой группы пациентов, доминирующими признаются BKV и JCV полиомавирусы (ПВ). Данные вирусные патогены, так же как и аденовирусы (АдВ), входят в перечень одних из наиболее клинически значимых возбудителей серьезных инфекционных заболеваний, таких как геморрагический цистит, нефропатия, нефрит, пневмония, гепатит, полиорганная недостаточность, энцефалит и другие тяжелые формы нейроинфекций (например, прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия). Кроме того, ПВ и АдВ рассматриваются сегодня как потенциальные кандидаты индикаторных вирусов при проведении санитарно-вирусологических исследований водных объектов, а также оценке их эпидбезопасности и риска здоровью, в основе которой лежат количественные показатели данных вирусов-контаминантов [1, 2]. В отличие от других групп вирусных патогенов они способны персистировать в организме человека пожизненно и, соответственно, выделяться с мочой и калом значительным количеством заболевших и бессимптомных носителей, что определяет их широкое распространение в объектах окружающей среды [3, 4].

Мультиплексные диагностические средства, позволяющие проводить одновременно (параллельно) качественную и количественную детекцию трех актуальных для иммунодефицитных пациентов вирусных патогенов – BKV, JCV, АдВ, отсутствуют не только на рынке нашей страны, но и за рубежом.

В соответствии с вышеизложенным **целью** данной работы была разработка и апробация комплекта праймеров и зондов для одновременного выявления BKV, JCV, АдВ – как один из этапов создания технологии соответствующей мультиплексной диагностической тест-системы.

Материалы и методы исследования. Исследовано 217 проб (кровь, моча), поступивших из ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии», ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», УЗ «Витебская областная клиническая больница», УЗ «Брестская областная клиническая больница», УЗ «Городская инфекционная клиническая больница», УЗ «Могилёвская областная клиническая больница», УЗ «2 городская детская клиническая больница» г. Минска.

Выявление ДНК АдВ и BKV проводили с помощью коммерческих ПЦР тест-систем с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени (Беларусь) согласно инструкциям по применению. Одновременную детекцию ДНК BKV, JCV и АдВ проводили с применением разработанного комплекта праймеров и зондов. Использовали Taq-полимеразу, 10х реакционный буфер и раствор $MgCl_2$, смесь дезоксинуклеотидов (АртБиоТех, Беларусь), разработанные праймеры и зонды (PrimeTech, Беларусь).

Постановку ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) осуществляли на амплификаторах RotorGene Q (Corbett LifeSciences, Австралия), Applied Biosystems QuantStudio5 (Thermo Scientific, США).

Результаты исследования и их обсуждение. На первом этапе исследований детекцию ДНК АдВ в исследуемых пробах осуществляли методом ПЦР-РВ с помощью коммерческого набора, а также по ранее разработанной нами методике, изложенной в «Стандартной операционной процедуре для выявления ДНК АдВ в биологическом материале и воде» (утверждена 25.11.2019). Как оказалось, применение коммерческого набора не позволяет осуществлять контроль исследований на этапе выделения. Имели место также ложноотрицательные результаты при анализе нескольких АдВ-положительных проб (генотип 2, 7). В свою очередь, использование прописанного в СОП комплектов праймеров, не обеспечивает выявление достаточного спектра генотипов АдВ.

В связи с этим проводили поиск универсального комплекта праймеров, благодаря которому можно было бы с одинаковой эффективностью выявлять АдВ разных видов. Подбор оптимального комплекта является непростой задачей вследствие широкого генетического разнообразия идентифицированных на данный момент 103 генотипов аденовирусных агентов. В результате выполненного анализа установлено, что АдВ видов A-G имеют общие консервативные регионы в пределах гена гексона. На основе литературных данных, а также изучения последовательностей ДНК гена гексона АдВ в MEGA7, был выбран комплект из прямого (Tx-f), обратного (Tx(alt)-r) праймеров и зонда (Tx-p), позволяющий одновременно выявлять ДНК АдВ методом ПЦР-РВ. Во внимание принимались такие параметры, как Tm, GC%, образование димеров и шпилек (таблица 1).

Таблица 1. – Основные характеристики праймеров и зондов

Название	*Длина*	*Tm*	*GC%*	*Самодимеры 3' ΔG*	*Шпильки ΔG*	*Длина повторов*
Tx-f	21	64,5	66,7	-1,9	-0,9	2
Tx(alt)-r	21	57,1	54,3	-0,6	-0,6	4
Tx-p	22	66,2	68,2	-3,3	-1,9	3

Геном полиомавирусов представлен кольцевой двухцепочечной ДНК длиной порядка 5000 пар оснований. Белки вирусов разделяются на ранние – регуляторные (большой Т-антиген, малый Т-антиген), и поздние – структурные (VP1, VP2, VP3, агнопротеин). С целью подбора оптимального комплекта праймеров для идентификации и дифференциации BKV и JCV, было проведено мультигеномное выравнивание 25 нуклеотидных последовательностей данных вирусов. По результатам его анализа был выбран регион большого Т-антигена, который содержит как консервативные для ПВ участки, так и вариабельные регионы для дифференциации выявленных ПВ на BKV и JCV. Для использования совместно с комплектом для выявления АдВ был разработан комплект из универсальных праймеров (прямой PM2+, обратный PM2-) и двух специфических зондов (BKVp, JCVp), характеристики которых отражены в таблице 2.

Таблица 2. – Основные характеристики праймеров и зондов для выявления ДНК ПВ

Название	*Длина*	*Tm*	*GC%*	*Самодимеры 3' ΔG*	*Шпильки ΔG*	*Длина повторов*
PM2+	23	53,1	43,5	-0,6	-0,6	3
PM2-	24	54,8	45,8	-1,6	-1,4	3
BKVp	20	53,2	50,0	-11,2	-1,2	2
JCVp	23	58,9	52,2	-9,7	-1,1	2

Исходя из имеющихся данных литературы [5] и расчетной температуры отжига выбранных праймеров и зондов, были отработаны следующие параметры и условия постановка реакции (таблица 3).

Таблица 3. – Температурный режим ПЦР-РВ для детекции ДНК BKV, JCV, АдВ

Этапы		*Условия реакции*
Преденатурация		95ºС – 5 мин
45 циклов	Денатурация	95ºС – 15 с
	Отжиг праймеров, считывание флюоресценции, элонгация	55ºС – 40 с

В состав реакционной смеси входили 10х ПЦР-буфер (специфический для используемого фермента термостабильной ДНК-полимеразы), смесь дНТФ (200 мкмоль), 3.5mM $MgCl_2$, 2.5 единицы термостабильной ДНК-полимеразы («АртБиоТех»), а также по 10 пмоль фланкирующих праймеров и 7 пмоль зонда в смеси для детекции ДНК АдВ и по 15 пмоль праймеров и по 10 пмоль зондов в смеси для выявления ДНК BKV и JCV.

Разработанный комплект праймеров для ПЦР-РВ апробировали на достоверно положительных пробах известных генотипов АдВ. Специфичность реакции была подтверждена в исследованиях 30 заведомо отрицательных проб деионизированной воды.

Полученные результаты (Таблица 4) показали специфичность данных праймеров к ДНК разных генотипов АдВ, циркулирующих на территории Республики Беларусь.

Таблица 4. – Результаты выявления АдВ разных генотипов с применением разработанного комплекта праймеров

№ пробы	Генотип АдВ	Значения пороговых циклов реакций
1	1	27,11
2	2	13,09
3	3	18,24
4	4	16,53
5	5	29,30
6	6	23,10
7	7	17,54
8	41	24,21
9	41	22,26

Сравнительные результаты генодиагностики с использованием коммерческой тест-системы для выявления и количественного определения BKV и выбранного ком-

плекта праймеров и зондов для одновременного выявления BKV и JCV представлены в таблице 5.

Таблица 5. – Результаты генодиагностики ПВИ

Вид биологического образца	Количество положительных образцов с использованием		
	тест-системы для определения BKV	комплекта олигонуклеотидов (PM2+, PM2-, BKVp, JCVp)	
	BKV+	BKV+	JCV+
Кровь	24	19	0
Моча	134	117	11

Полученные данные демонстрируют, что выбранный комплект олигонуклеотидов не позволяет выявить все BKV+ образцы. Сравнительный анализ показал, что отрицательные результаты регистрировались при исследовании образцов, пороговые циклы ПЦР-РВ в которых при детекции с помощью тест-системы были >30. Исходя из этого, потребовалась дальнейшая оптимизация параметров реакции. С этой целью проведен эксперимент по подбору оптимальной температуры отжига праймеров PM2+, PM2- (таблицы 6, 7).

Таблица 6. – Значения пороговых циклов ПЦР-РВ с градиентом температур отжига (QuantStudio5) для JCV+ образцов

№ пробы	Значения пороговых циклов ПЦР-РВ, полученных при постановке на RotorGeneQ (Т отжига=55°С)	Т отжига, °С				
		53	**55**	**56**	**58**	**60**
6	18,99	18,67	18,58	**16,30**	**16,49**	18,86
4	31,77	35,22	-	39,01	31,96	**29,42**
8	31,01	45,00	-	-	-	-
9	22,84	30,91	**27,98**	29,10	29,52	30,71

Таблица 7. − Значения пороговых циклов ПЦР-РВ с градиентом температур отжига (QuantStudio5) для BKV+ образцов

№ пробы	Значения пороговых циклов ПЦР-РВ, полученных при использовании коммерческой тест-системы	Т отжига, °С				
		53	**55**	**56**	**58**	**60**
1	15,00	19,29	19,16	19,31	19,27	**16,74**
2	31,04	-	-	-	-	-
3	21,23	27,707	**23,98**	25,52	25,45	25,67
4	29,17	37,514	-	42,57	34,78	**33,24**
5	н/д	**35,61**	36,46	36,73	**35,86**	38,80

Согласно результатам выполненных исследований изменение температуры отжига праймеров при малом содержании ДНК BKV (проба № 2) не влияет на чувствительность. Определили оптимальный диапазон температур отжига в пределах 55-58ºС.

Заключение. Разработан комплект праймеров и зондов для одновременного выявления ДНК BKV, JCV, АдВ, который успешно апробирован на достоверно положительных образцах биологического материала. Данный комплект в дальнейшем будет

использован для разработки технологии и создания мультиплексной тест-системы для одновременной детекции и количественного определения BKV, JCV и АдВ.

Литература

1. Girones, S. Excretion and transmission of JCV in human populations/ S. Girones, R. Bofill-Mas // J. Neurovirol. – 2001. – Vol. 7, No. 4. – P. 345-349.

2. Jiang, S. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review / S. Jiang // Environ. Sci Technol. – 2006. – Vol. 40, No. 23. – P. 7132-7140.

3. Development of a quantitative immunocapture real-time PCR assay for detecting structurally intact adenoviral particles in water / L. Ogorzaly [et al.] // J. Virol. Methods – 2013. – Vol. 194, No. 1. – P. 235-241.

4. Quantitative PCR detection and characterisation of human adenovirus, rotavirus and hepatitis A virus in discharged effluents of two wastewater treatment facilities in the Eastern Cape, South Africa / M.A. Adefisoye [et al.] // Food Environ. Virol. – 2016. – Vol. 8, No. 4. – P. 262-274.

5. Development and validation with clinical samples of internally controlled multiplex real-time PCR for diagnosis of BKV and JCV infection in associated pathologies / A. Bárcena-Panero [et al.] // Compar. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. – 2012. –Vol. 35, No. 2. – P. 173-179.

DEVELOPMENT AND TESTING OF PRIMERS AND PROBES KIT FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF BKV, JCV, AdV DNA

Arynovich A.S., Belskaya I.V., Paklonskaya N.V., Amvrosieva T.V.

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

Primers and probes kit has been developed as part of the creation of a multiplex diagnostic test system for simultaneous detection and quantification of BKV, JCV, and AdV. Experimental testing on biological material confirmed the specificity of the selected sequences to the DNA of the most common AdV genotypes circulating on the territory of the Republic (1-7, 41).

Keywords: polyomaviruses, adenoviruses, polymerase chain reaction.

Поступила 21.10.2020

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК И СОЗДАНИЕ НА ИХ ОСНОВЕ КАЛИБРАТОРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ДНК АДЕНОВИРУСОВ В ВОДНЫХ ОБЪЕКТАХ

Бельская И.В., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В.

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

Резюме. С использованием генно-инженерных методов на основе участков гена гексона АдВ 2, 3, 4, а также фибры АдВ 41 созданы генетические конструкции, содержащие фрагменты генома АдВ, соответствующие мишеням для разработанных комплектов праймеров (A C F и BDE), позволяющих выявлять ДНК АдВ видов A-F. Успешное клонирование позволило получить плазмидные ДНК pJET-ad2hex, pJET-ad3hex, pJET-ad4hex, pJET-ad41fib с концентрациями, варьирующими в пределах от 116 нг/мкл до 248 нг/мкл. В рамках разработки технологии создания калибраторов получены и апробированы разведения линеаризованных векторов с концентрациями от $1*10^3$ ГЭ/мл до $1*10^7$ ГЭ/мл. Коэффициент корреляции R2, свидетельствующий о соответствии определения концентрации ДНК линейной модели, составил 0,9932 при детекции фрагмента фибры и 0,9976 при детекции фрагмента гексона. При оценке межтестовой точности определения коэффициент вариации (CV) в среднем составил 3,12%, при выявлении АдВ F и 0,62% – при детекции ДНК видов A-E. Эффективность гексон-основанной ПЦР составила 101% и ПЦР, основанной на детекции фрагмента гена фибры – 117%. Полученные в ходе исследований значения воспроизводимости, линейности и эффективности ПЦР, основанной как на детекции гена фибры, так и гена гексона, указывают на возможность ее использования для определения концентрации ДНК АдВ.

Ключевые слова: аденовирус человека, контаминация, качество воды, плазмидный вектор, количественная ПЦР.

Введение. Представители семейства *Adenoviridae,* аденовирусы человека (АдВ) в настоящее время рассматриваются в качестве потенциальных санитарно-показательных агентов вирусной контаминации водных объектов [1]. Следует отметить, что на текущий момент санитарное законодательство ряда стран, в том числе Республики Беларусь, при контроле качества воды по вирусологическим показателям регламентирует детекцию энтеровирусов. Хотя очевидные преимущества АдВ перед энтеровирусами в плане их большей репрезентативности дают основания для развития сравнительных санитарно-вирусологических исследований, направленных на обоснование и выбор наиболее адекватных санитарно-показательных объектов вирусного загрязнения воды. К таким преимуществам АдВ относятся: отсутствие сезонности в их циркуляции среди населения [2], высокая концентрация выделения с фекалиями от инфицированных пациентов и бессимптомных носителей [3], более выраженная устойчивость к дезинфицирующим факторам и УФ-излучению, по сравнению с другими кишечными вирусами. Кроме того, для детекции АдВ не требуется стадия обратной транскрипции, что облегчает их количественное определение по сравнению с РНК-содержащими вирусными агентами [4]. Они часто обнаруживаются в поверхностных водах, подверженных воздействию загрязнения хозяйственно-бытовыми стоками, водах плавательных бассейнов, источниках питьевой воды [2, 5]. В совокупности широкое внесезонное распространение и повышенная устойчивость АдВ в окружающей среде дают основания рассматривать их в качестве перспективных кандидатов на роль индикаторов вирусного загрязнения водных объектов.

Детекцию АдВ осуществляют с помощью как классических культуральных [6], так молекулярно-генетических методов [4]. Однако кишечные АдВ F (40, 41 генотипы), которые вызывают ОКИ и наиболее часто выделяются с фекалиями, являются плохо культивируемыми и крайне редко выделяются в культуре клеток [7]. Поэтому в последние годы обнаружение АдВ основано на детекции ДНК вируса [4], продуктов транскрипции [8] или определении белковых молекул, содержащих вирусспецифические эпитопы [9].

Наиболее универсальным методом для выявления АдВ в водных объектах является полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени. Она позволяет в краткие сроки не только качественно, но и количественно оценить концентрацию вируса в исследуемой пробе при сохранении высокой чувствительности [4], что имеет большое значение для повышения результативности контроля качества воды вследствие теоретически низкой концентрации в ней патогенов. Количественное обнаружение содержания вирусов в воде необходимо также для анализа и оценки ассоциированного с водопользованием риска здоровью.

В связи с тем, что для оценки риска здоровью, связанного с водопользованием, необходим не только качественный, но и количественный учет состояния по вирусологическим показателям.

Как известно, разработка количественной ПЦР требует создания стабильных положительных контролей с известной концентрацией, которые содержат в своем составе фрагмент генома АдВ и, таким образом, имитируют присутствие ДНК вируса в реакционной смеси.

Настоящая работа посвящена получению трансформированных линий клеток, несущих плазмидные векторы со вставкой фрагмента ДНК АдВ и созданию на их основе калибраторов для проведения количественной ПЦР.

Материалы и методы исследования. Для получения фрагментов генома, применяемых для их клонирования в составе вектора pJET1.2 («Novagen», США), использовали выделенные в культуре клеток АдВ (n = 22). Наработку плазмид осуществляли с помощью коммерческого штамма E. coli XL1blue («Novagen», США).

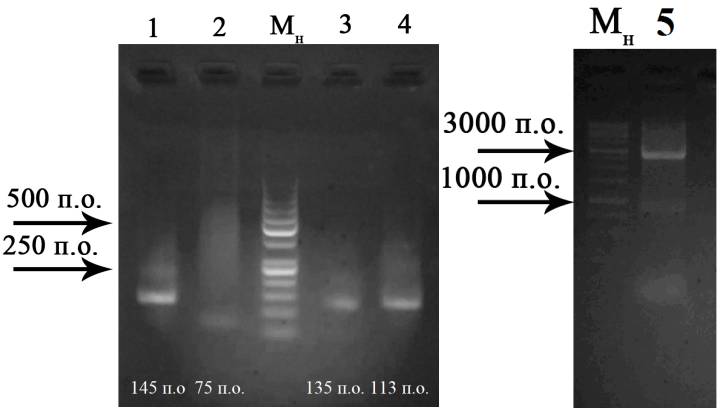
Выделение нуклеиновых кислот проводили с использованием набора Рибо-преп («АмплиСенс», Россия). Выявление ДНК АдВ осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с применением праймеров («Праймтех», Беларусь) комплементарных последовательностям консервативного региона гена гексона АдВ и фибры АдВ F. Разгорание флюоресценции анализировали с помощью программного обеспечения амплификатора Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия). Наработку фрагментов-вставок для создания калибраторов осуществляли с использованием Flash ДНК-полимеразы («АртБиоТех», Беларусь). Линеаризацию плазмидного вектора осуществляли эндонуклеазой EcoRV («Promega», США). Очистку ампликонов векторных конструкций проводили переосаждением 96% EtOH с гликогеном, линейного вектора – набором GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo Fisher Scientific», США). Измерение концентрации очищенной ДНК осуществляли флуориметрически на приборе Qubit Fluorometer («Invitrogen», США) с использованием интеркалирующего красителя ZUBR Green I («Праймтех»), специфичного к двухцепочечной ДНК. Ферментативную сшивку очищенных продуктов проводили коммерческим препаратом лигазы бактериофага T4 (New England Biolabs, США). Приготовление компетентных клеток *E. coli* XL1Blue и их трансформацию выполняли с помощью набора Roti Transform («Carl Roth Gmbh and Co», Германия). Трансформированные клетки высевали на плотную селективную питательную среду LB с добавлением ампицилина до конечной концентрации 100 мкг/мл. Выделение плазмид проводили методом щелочного лизиса [10].

Результаты исследования и их обсуждение. В рамках создания технологии количественного определения ДНК АдВ были разработаны 2 комплекта олигонуклеотидов.

Первый включал праймеры для выявления видов A, C, F (ACF1-R1, ACF2-R2, ACF3-R3), второй – для обнаружения видов B, D, E (BDEF-R). Использование данных комплектов в совокупности позволило проводить выявление широкого спектра АдВ-генотипов. Однако такие исследования требуют обязательного использования контролей, позволяющих осуществлять оценку прохождения отдельных этапов реакции. В качестве положительных контролей и калибраторов этапа ПЦР обычно используют рекомбинантные плазмиды, содержащие вставку ДНК, соответствующую участку-мишени для используемых праймеров. В связи с чем была проведена амплификация мишеней для каждой пары фланкирующих олигонуклеотидов. Фрагмент AF-R (135 п.о.) был клонирован из генома АдВ 4 генотипа, CF-R (75 п.о.) – из генома АдВ 2 генотипа, FF-R (113 п.о.) – из генома АдВ 41 генотипа, BDEF-R (145 п.о.) – из генома АдВ 3 генотипа.

Линеаризацию коммерческого вектора pJET 1.2, содержащего ген резистентности к ампициллину в качестве селективного маркера, осуществляли по сайту рестрикции *Eco*RV (*Eco*32I). Вышеупомянутая эндонуклеаза позволяет линеаризовать фрагменты по «тупым концам», что упрощает дальнейшее получение конечных плазмид избегая обработки рестриктазами целевых фрагментов. Выбор вектора был обусловлен наличием вставки (около 1000 п.о), при удалении которой исключается возможность самолигирования и, соответственно, рост «пустых» колоний.

Постановка горизонтального ДНК-электрофореза в 1-2,5% агарозном геле после амплификации фрагментов и линеаризации плазмиды позволила убедиться в получении продуктов нужной длины, которые совпадают с теоретическими размерами (рисунок 1).



$М_н$ (здесь и далее) – фрагменты ДНК с известным количеством пар оснований,
1 – продукт, полученный с праймерами BDEF-BDER, 2 – CF-R, 3 – AF-R, 4 – FF-R,
5 – продукты линеаризации pJET1.2 по сайту узнавания рестриктазой *Eco*RV

Рисунок 1. – Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации фрагментов генов АдВ и линерариза́ции вектора pJET 1.2 генов АдВ

Концентрация очищенных образцов составила: AF-R – 22,6 нг/мкл, CF-R – 16,7 нг/мкл, FF-R – 20,4 нг/мкл, BDEF-BDER – 25,1 нг/мкл, pJET1.2-lin – 8,5 нг/мкл. Каждый фрагмент сшивали с линейным вектором с помощью Т4-лигазы полученными лигазными смесями трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL1Blue. Теоретическая схема клонирования показана на рисунке 2 для плазмиды pJET-ad41fib, содержащей фрагмент фибры АдВ41 генотипа.

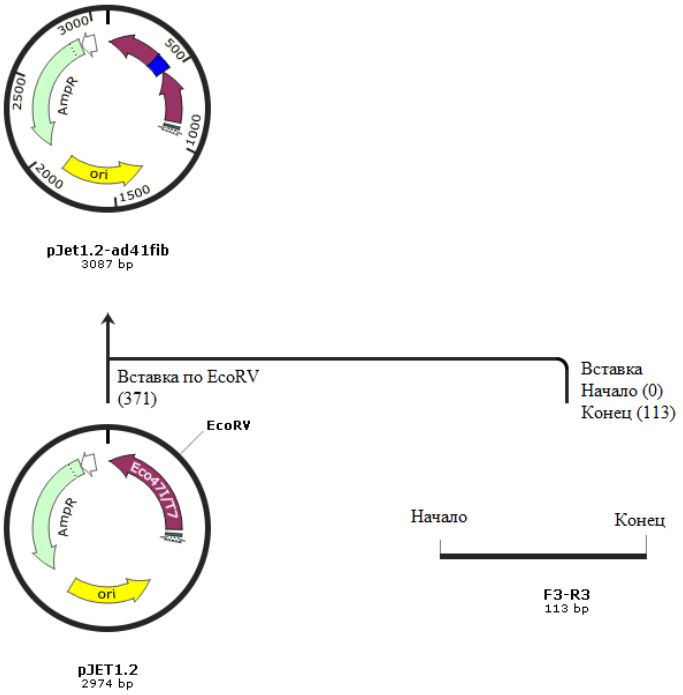


Рисунок 2. – Схема клонирования плазмиды pJET1.2 фрагментом FF-R

ДНК выросших клеток-трансформантов подвергали ПЦР-анализу для подтверждения наличия в ней целевых фрагментов генов в правильной ориентации. Для этого использовали ранее разработанные праймеры и зонды, комплементарные нуклеотидным последовательностям целевых фрагментов. Результаты скрининга, представленные на рисунке 3, позволили отобрать колонии для выделения плазмид и последующего приготовления на их основе калибраторов.

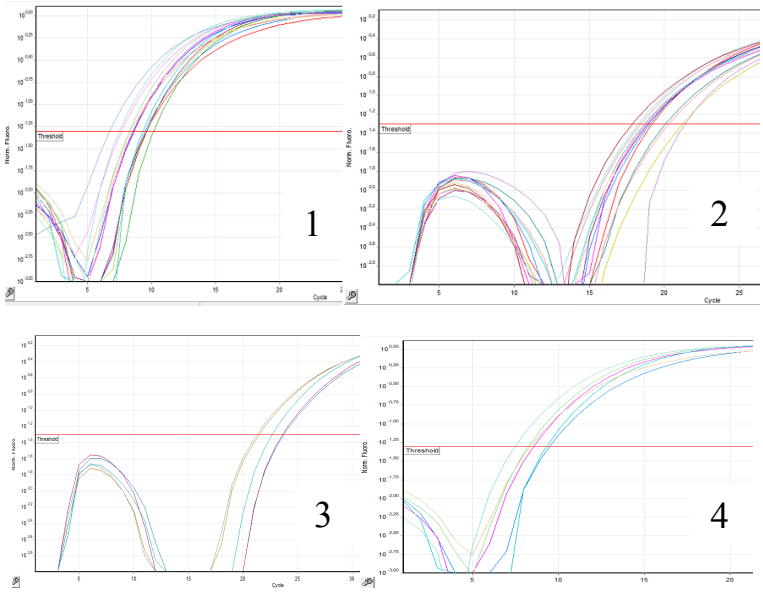


Рисунок 3. – Выявление специфических АдВ-вставок AF-R (3), CF-R (4), FF-R (1) и BDEF-BDER (2) при скрининге колоний

Из выбранных колоний клеток-трансформантов, после ночного культивирования в жидкой питательной среде LB при добавлении ампициллина, были выделены путем щелочного лизиса плазмиды. Концентрации полученных очищенных препаратов плазмид

измеряли при помощи интеркалирующего красителя ZUBR 10 000x (таблица). Расчет числа геномных эквивалентов (ГЭ)/мкл осуществляли, исходя из рассчитанной длины плазмид и их концентрации.

Таблица. – Концентрации полученных препаратов плазмид, содержащих фрагменты полинуклеотидных последовательностей АдВ

Название плазмиды	*Размер кольцевой ДНК*	*Концентрация, нг/мкл*	*Расчетное число ГЭ/мкл*
pJET-ad2hex	3049 п.о.	137 нг/мкл	$4{,}1*10^{10}$
pJET-ad3hex	3119 п.о.	116 нг/мкл	$3{,}4*10^{10}$
pJET-ad4hex	3109 п.о	124 нг/мкл	$3{,}7*10^{10}$
pJET-ad41fib	3087 п.о	248 нг/мкл	$7{,}4*10^{10}$

Далее осуществляли линеаризацию полученных плазмид по сайту узнавания эндонуклеазой PstI., а также готовили порядковые разведения каждого из линейных векторов от $1*10^2$ до $1*10^7$ ГЭ/мл. В серийных постановках определили, что пороговые циклы реакции (Ct) для стандартных образцов, содержащих мишени для отжига праймеров AF-R, CF-R и BDEF-R, были практически идентичны (вариабельность в пределах 0,43% для калибраторов с концентрацией $1*10^7$ ГЭ/мл и 1,55% – для $1*10^3$ ГЭ/мл), что обусловлено использованием одного и того же региона для детекции АдВ видов A-E. Поэтому дальнейшие исследования проводили в отношении только двух типов калибраторов: pJET-ad2hex и pJET-ad41fib. Соответствие определения концентрации ДНК линейной модели оценивали по коэффициенту корреляции R2, который составил 0,9932 при детекции фрагмента фибры и 0,9976 - при детекции фрагмента гексона. Для двух систем зависимость Ct от концентрации ДНК считали линейной. Однако при постановке калибраторов в концентрации ниже $1*10^3$ ГЭ/мл линейность нарушалась, что затрудняло количественную оценку, хотя качественная детекция низких количеств была осуществима.

Для оценки точности измерения количества ДНК вычисляли коэффициент вариации CV (%) средних значений Ct калибраторов после трех независимых воспроизведений в разные дни. Данный показатель при оценке межтестовой точности определения в среднем составил 3,12%, при выявлении АдВ F и 0,62% – при детекции ДНК видов A-E.

Эффективность ПЦР рассчитывали по формуле $\{(10–1/k – 1) \times 100\}$, где k – угловой коэффициент стандартной кривой. Она составила 117% для реакции, основанной на детекции гена фибры, и значительно превышала значения для реакции, где в качестве мишени выступал ген гексона. Низкая эффективность гексон-базирующейся ПЦР могла быть обусловлена как неоптимальным выбором региона-мишени, так и неудовлетворительным качеством ДНК-матрицы [11]. Для установления причины неудовлетворительного значения данного параметра гексон-основанной ПЦР, проводили аналогичные эксперименты, используя разведения изолятов АдВ генотипов 1, 3, 4. В результате проведенных исследований эффективность ПЦР достигла 101%.

Заключение. Полученные в ходе исследований значения воспроизводимости, линейности и эффективности ПЦР, основанной как на детекции гена фибры, так и гена гексона, указывают на возможность ее использования для определения концентрации ДНК АдВ.

Литература

1. United States Environmental Protection Agency [Electronic resource] – Mode of access: https://www.epa.gov/ccl/microbial-contaminants-ccl-4. – Date of access: 08.05.2019.

2. Jiang, S. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review / S. Jiang / Environ. Sci. Technol. – 2006. – Vol. 40, No. 23. – P. 7132-7140.
3. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river / T.T. Fong [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – Vol. 76, No. 3. – P. 715-723.
4. Development of a quantitative immunocapture real-time PCR assay for detecting structurally intact adenoviral particles in water / L. Ogorzaly [et al.] // J. Virol. Methods – 2013. – Vol. 194, No. 1. – P. 235-241.
5. Mena, K. D. Waterborne adenovirus / K.D. Mena, C.P. Gerba // Rev. Environ. Contam. Toxicol. – 2009. – Vol. 198. – P. 133-167.
6. Kamen, A. Development and optimization of an adenovirus production process / A. Kamen // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 6, No. 1. – P. 184-192.
7. Kim, M. Enhancement of enteric adenovirus cultivation by viral transactivator proteins / M. Kim // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – Vol. 76, No. 8. – P. 2509-2516.
8. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR / G. Ko, T.L. Cromeans, M. D. Sobsey // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69, No. 12. – P. 7377-7384.
9. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay / B. Calgua [et al.] // J. Virol. Methods. – 2011. – Vol. 171, No. 1. – P. 1-7.
10. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with sodium dodecyl sulfate: maxipreps / M.R. Green, J. Sambrook // Cold Spring Harb. Protoc. – 2018. – Ch. 1. – P. 68-73.
11. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods / S. Broeders [et al.] // Trends Food Sci. Technol. – 2004. – Vol. 37. – P. 115-126.

TRANSFORMED CELL LINE PRODUCTION AND OBTAIN ON THEIR BASIS OF CALIBRATORS FOR ADENOVIRUSES DNA DETECTION IN AQUEOUS OBJECTS

Belskaya I.V., Paklonskaya N.V., Amvrosieva T.V.

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

Using genetic engineering methods genetic constructs on the base of HAdV 2, 3, 4 hexon gene regions, as well as the HAdV 41 fiber were created. Those contained fragments of the HAdV genome that corresponded to the targets for the developed primer sets (A C F and BDE), allowing detection of HAdV DNA of A-F species. Successful cloning made it possible to obtain plasmid DNAs pJET-ad2hex, pJET-ad3hex, pJET-ad4hex, pJET-ad41fib with concentrations ranging from 116 ng/µl to 248 ng/µl. As a part of the development of the technology for creating calibrators, dilutions of linearized vectors with concentrations from $1*10^3$ GE/ml to $1*10^7$ GE/ml were obtained and tested. The correlation coefficient R2, indicating the correspondence of the determination of DNA concentration to the linear model for the detection of a fiber fragment reached 0.9932 and for the detection of a hexon fragment it reached 0.9976. When assessing the intertest accuracy of the determination, the coefficient of variation (CV) averaged 3.12%, when detecting HAdV F and 0.62% when detecting DNA of species A-E. The efficiency of the hexon-based PCR was 101% while that of the PCR based on the detection of a fragment of the fiber gene was 117%. The values of reproducibility, linearity, and efficiency of PCR obtained in the course of studies, based on both the detection of the fiber gene and the hexon gene, indicate the possibility of its use for determining the concentration of HAdV DNA.

Keywords: human adenovirus, contamination, plasmid vector, quantitative PCR.

Поступила 23.10.2020

ВОЗМОЖНОСТИ АДАПТАЦИИ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АЛЛЕЛИ HLA-B*57:01, АССОЦИИРОВАННОГО С РАЗВИТИЕМ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЛЕКАРСТВЕННОМУ СРЕДСТВУ АБАКАВИР, ВХОДЯЩЕМУ В СОСТАВ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

Булда К.Ю., Гасич Е.Л., Бунас А.С.

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

Резюме. Абакавир является нуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы (НИОТ) и используется в сочетании с такими лекарственными средствами, как зидовудин, эмтрицитабин, тенофовир и ламивудин как часть высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ). *HLA-B*57:01* значительно увеличивает риск развития реакции гиперчувствительности замедленного типа при назначении лекарственного средства абакавира пациентам с ВИЧ-инфекцией. Адаптирована методика полимеразной цепной реакции для выявления аллели *HLA-B*57:01*. Результаты исследований показали, что частота встречаемости аллели *HLA-B*57:01* составила 3,6±1,4% (n=169), что сопоставимо с частотой встречаемости данной аллели в странах Европы и европейской части России. С целью оптимизации схем лечения ВИЧ-инфекции, в стране должен быть рекомендован скрининг аллели *HLA-B*57:01* у ВИЧ-инфицированных пациентов перед назначением аналога нуклеотидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ – абакавира.

Ключевые слова: аллель *HLA-B*57:01,* генетический маркер, ВИЧ-инфекция, абакавир.

Введение. Абакавир является нуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы (НИОТ) и используется в сочетании с такими лекарственными средствами, как зидовудин, эмтрицитабин, тенофовир и ламивудин как часть высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) [1]. Абакавир связан с риском развития аллергической реакции замедленного типа (АРЗТ) у пациентов носителей аллели HLA-B * 5701. Гены *HLA* являются членами семейства генов главного комплекса гистосовместимости (МНС), которое включает в себя более 200 генов. Семейство МНС разделено на 3 класса в зависимости от структуры и функции кодируемых белков: класс I, класс II и класс III. Класс I содержит гены, кодирующие белки HLA-A, HLA-B и HLA-C. Ген *HLA-B* играет важную роль в распознавании и реакции иммунной системы на патогены и опосредует реакции гиперчувствительности. *HLA-B*57:01* – генетический маркер, имеющий клиническое значение, который успешно использовался в нескольких других странах, что привело к значительному снижению АРЗТ, связанного с абакавиром, на 56–100% [2]. Аллель *HLA-B*57:01* встречается в разных этнических группах, включая европейцев, латиноамериканцев и лиц африканского происхождения [3].

Абакавир противопоказан *HLA-B*57:01*-положительным пациентам и пациентам с предшествующей реакцией гиперчувствительности на абакавир [4]. Обычно реакции гиперчувствительности почти у всех пациентов сопровождаются повышением температуры и/или появлением сыпи. Основными признаками и симптомами реакции гиперчувствительности после приема могут выступать: сыпь, тошнота, рвота, диарея, боль в брюшной полости, язвы во рту; одышка, кашель, боль в горле, дистресс-синдром у взрослых; лихорадка, летаргия,

недомогание, отеки, лимфаденопатия, артериальная гипотензия, конъюнктивит, анафилаксия; головная боль, парестезии, лимфопения; печеночная недостаточность; миалгия, артралгия, повышение уровня креатининфосфокиназы; повышение уровня креатинина, почечная недостаточность. При тяжелых реакциях могут возникнуть опасные для жизни кожные заболевания, синдром Стивенса-Джонсона и токсико-эпидермальный некролиз. Считается, что реакция гиперчувствительности на абакавир сохраняется в течение всей жизни человека. Реакция гиперчувствительности наблюдаться в 5-8% случаев [5].

Цель: адаптировать метод полимеразной цепной реакции для выявления аллели *HLA-B*57:01*, связанного с реакцией гиперчувствительности на лекарственное средство абакавир у пациентов, инфицированных ВИЧ.

Материалы и методы исследования. Исследовано 169 образцов крови, выполнен гемолиз с использованием реагента для предобработки цельной периферической и пуповинной крови «Гемолитик» (Россия). Выделение тотальной ДНК проводили с помощью набора реагентов для одновременного выделения ДНК и РНК из биологического материала «РИБОпреп» (Россия).

Амплификацию фрагментов ДНК для установления наличия фармакогенетического маркера аллели *HLA-B*57:01* проводили при помощи двухраундовой «гнездовой» ПЦР, используя амплификатор «Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal» в объеме 25 мкл.

Продукт амплификации ПЦР аллели *HLA-B*57:01* был экстрагирован с использованием «PureLink™ Quick Gel Extaction Kit» (Invitrogen, Литва). Далее проводилась ферментативная очистка продукта ПЦР с использованием набора «ExS-Pure» (Nimagen, Нидерланды). Секвенирующая ПЦР проводилась с использованием набора реагентов для секвенирования «BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией к набору реагентов. Очистка продуктов секвенирующей ПЦР проводилась методом спиртового осаждения с использованием 96% и 70% этилового спирта, ацетата натрия и формамида. Электрофорез очищенных фрагментов после секвенирующей ПЦР проводили на генетическим анализаторе «3500 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программных продуктов Sequensing Analysis Software v.6, BioEdit v7.0.9.0, SeqScape v.3.

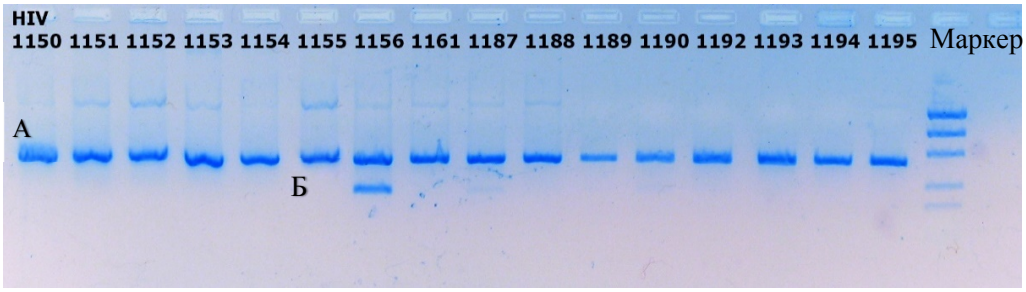
Результаты и их обсуждение. Исследуемая выборка составила 169 образцов, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов, среди которых: 95 мужчин (56,2±3,8%) и 74 женщин (43,8±3,8%). Средний возраст пациентов составил 33,2±14,4 лет, из них возраст 32 меньше 18 лет (18,9±3), у 9 – в диапазоне от 18 до 25 лет (5,3±1,7), у 45 – в диапазоне от 26 до 35 (26,6±3,4%), у 59 – в диапазоне от 36 до 45 лет (34.,9±3,7%), и у 24 – выше 45 лет (14,2±2,7%).

Географическое распределение пациентов было следующим: наибольшее количество образцов было получено от пациентов, проживающих на территории Минска и Минской области – 51 (30,2±3,5%) и 25 (14,8±2,7%) соответственно, 47 образцов получены от пациентов, проживающих на территории Гомельской области, что составило 27,8±3,4%, 18 образцов – от пациентов, проживающих на территории Могилевской области, что составило 10,7±2,4%, 15 образцов – от пациентов, проживающих на территории Брестской области, что составило 8,9±2,2%, 10 образцов – от пациентов, проживающих на территории Гродненской области, что составило 5,9±1,8%, 3 образца – от пациентов, проживающих на территории Витебской области, что составило 1,8±1%.

Для амплификации фрагментов был выполнен дизайн праймеров, оптимизированы температурные и временные условия. ДНК проводилась двухраундовая «гнездовая» ПЦР. Состав ПЦР-смеси для 1 раунда: 10х ПЦР-буфер, 2 мМ дНТФ, 15 мМ праймеры: 5' –

GTCTCACATCATCCAGGT – 3', 5' – CGTCTCCTTCCCGTTCTC – 3', праймеры внутреннего контроля 5' – GCAGAAGGGCGCATTATAGC – 3', 5' – CATGTGAGTACACTCAGCTTG – 3', 25 мМ MgCl2, 5 ед/мкл Taq-полимераза, вода для ПЦР. Временные и температурные режимы были следующими: 95ºС 4 мин, затем 32 циклов 95ºС 30 с, 60ºС 30 с и 72ºС 1 мин, затем 72ºС 5 мин.

С целью отбора образцов содержащих исследуемую аллель *HLA-B*57* ввиду ее низкого процента встречаемости после первого раунда ПЦР проводится электрофоретическая детекция результатов в 2,0% агарозном геле. Результат амплификации после 1 раунда представлен на рисунке 1.



А – Внутренний контроль (размер 444 bp)
Б – Фрагмент *HLA-B*57* (размер 262 bp)
Рисунок 1. – Электрофоретическая детекция 1 раунда ПЦР

Состав ПЦР-смеси для 2 раунда: 10х ПЦР-буфер, 2 мМ дНТФ, 15мМ праймеры: 5' – GTCTCACATCATCCAGGT – 3', 5' – ATCCTTGCCGTCGTAGGCGG – 3', 5' – ATCCTT-GCCGTCGTAGGCAG – 3', 25 мМ MgCl2, 5 ед/мкл Taq-полимераза, вода для ПЦР. Временные и температурные режимы были следующими: 95□ 4 минуты, затем 32 циклов 95□ 30 секунд, 60□ 1 минута 72□ 1 минута, затем 72□ 10 минут. Амплифицированные фрагменты ДНК анализировали детектировали 2,0% агарозном геле, 20 минут, маркер молекулярного веса 100 bp. Результат амплификации после 2 раунда изображен на рисунке 2.

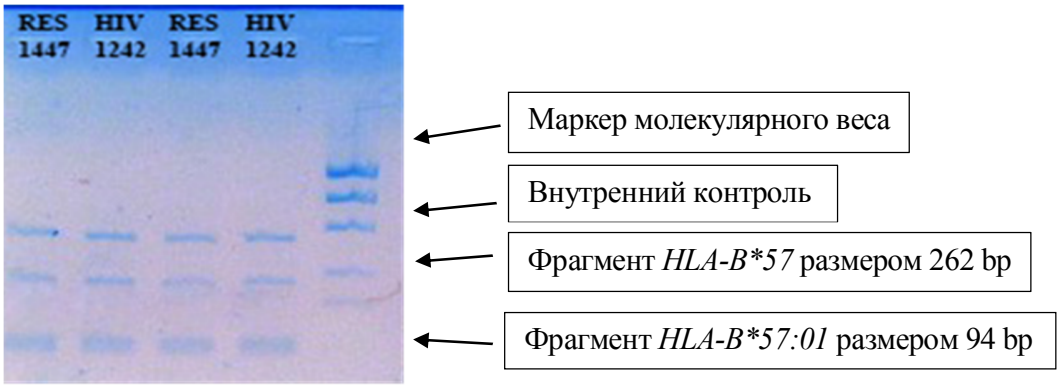


Рисунок 2. – Электрофоретическая детекция 2 раунда ПЦР

Для подтверждения специфичности полученных продуктов фрагменты *HLA-B*57:01* были исследованы с помощью генетического анализатора «3500 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США). На рисунке 3 изображена электрофореграмма фрагмента *HLA-B*57:01*.

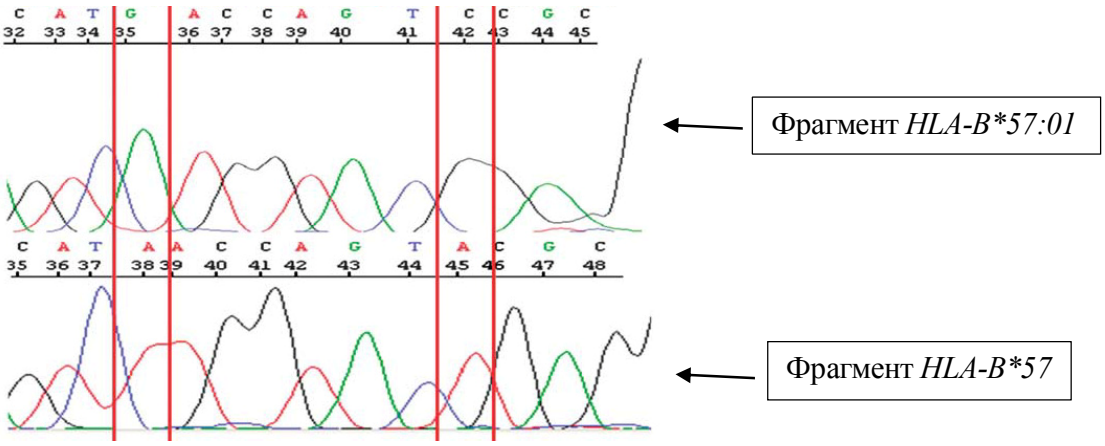


Рисунок 3. – Электрофореграмма аллели *HLA-B*57:01*

В результате анализа данных исследуемой выборки, было установлено, что среди 169 образцов, 6 содержали аллель *HLA-B*57:01*, что составило 3,6±1,4%. Республика Беларусь относится к странам с высоким уровнем использования схем, содержащих абакавир, в качестве первой линии или смены лечения, но тест на *HLA-B*57:01* до сих пор не применяется в клинической практике. Наши результаты об уровне распространенности *HLA-B*57:01* подтверждают значительную долю носителей *HLA-B*57:01* в стране и представляют собой первый шаг к рутинному генетическому скринингу на наличие этого аллели в Республике Беларусь в качестве меры для предотвращения реакции ГЗТ, связанной с абакавиром. Учитывая, что в настоящее время схемы ВААРТ получает порядка 20000 ВИЧ-инфицированных пациентов, расчетные данные показывают, что менее 700 из них будет противопоказано назначение лекарственного средства абакавир. Соответственно необходимо рекомендовать скрининг аллели *HLA-B*57:01* у ВИЧ-инфицированных пациентов перед применением абакавира с целью оптимизации схем лечения и предотвращения развития побочных реакций.

Полученные нами результаты коррелирует с данными исследований проведенных в ряде стран, так частота встречаемости аллели *HLA-B*57:01* среди населения стран Европы составляет 6,8%, 2,6% среди населения Южной Америки, 2,5% среди жителей Среднего Востока, 2,2% среди населения Мексики [6].

Важно отметить, что скрининг на *HLA-B*57:01*, хотя и является высокоспецифичным, никогда не заменяет клинического наблюдения за пациентами, начинающими схемы, содержащие абакавир [7].

Заключение.

1. Адаптирован метод полимеразной цепной реакции для выявления фармакогенетического маркера аллели *HLA-B*57:01*, основанный на принципе двухраундовой «гнездовой» ПЦР, и апробирован на клиническом материале с подтверждением результатами секвенирования.

2. Распространённость аллели *HLA-B*57:01* в исследуемой выборке (n=169) составила 3,6±1,4%, что соответствует частоте встречаемости аллели в странах Европы.

3. Расчетные данные показывают, что среди почти 20000 пациентов, получающих антиретровирусную терапию, в проведении теста нуждается не менее 700 пациентов.

4. С целью оптимизации схем лечения ВИЧ-инфекции, в стране должен быть рекомендован скрининг аллели *HLA-B*57:01* у ВИЧ-инфицированных пациентов перед назначением аналога нуклеотидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ – абакавира.

Литература

1. Successful implementation of a national HLA-B*5701 genetic testing service in Canada / R.G. Lalonde [et al.] // Tissue Antigens. – 2010. – Vol. 75, No. 1. – P. 12-18.
2. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to Abacavir / S. Mallal [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2008. – Vol. 358, No. 6. – P. 568-579.
3. Pharmacogenetics of abacavir hypersensitivity: A systematic review and meta-analysis of the association with HLA-B*57:01 / B. Sousa-Pinto [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2015. – Vol. 136, No. 4. – P. 1092-1094.
4. Illing, P.T. The role of HLA genes in pharmacogenomics: unravelling HLA associated adverse drug reactions / P.T. Illing, A.W. Purcell, J. McCluskey // Immunogenetics. – 2017. – Vol. 69, No. 8. – P. 617-630.
5. Bharadwaj, M. Personalized medicine for HLA-associated drug-hypersensitivity reactions / M. Bharadwaj, P. Illing, L. Kostenko // Personalized Medicine. – 2010. – Vol. 7, No. 5. – P. 495-516.
6. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for HLA-B genotype and Abacavir dosing / M.A. Martin [et al.] // Clin. Pharmacol. Ther. – 2012. – Vol. 91, No. 4. – P. 734-738.
7. An epidemiologic study to determine the prevalence of the HLA-B*57:01 allele among HIV-positive patients in Europe / C. Orkin [et al.] // Pharmacogenet. Genomics. – 2010. – Vol. 20. – P. 307-314.

ADAPTING THE POLYMERASE CHAIN REACTION TO DETECT *HLA-B*57:01* ALLELE ASSOCIATED WITH DEVELOPMENT OF HYPERSENSITIVITY TO ABACAVIR, WHICH IS PART OF ANTIRETROVIRAL THERAPY

Bulda K.Yu., Gasich E.L., Bunas A.S.

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

Abacavir is an nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) of HIV and is used in combination with such drugs as zidovudine, emtricitabine, tenofovir and lamivudine as part of highly active antiretroviral therapy (HAART). *HLA-B*57:01* significantly increases the risk of developing a delayed-type hypersensitivity reaction when abacavir is prescribed to patients with HIV infection. The polymerase chain reaction technique has been adapted to identify the *HLA-B*57:01* allele. The research results showed that the frequency of occurrence of the *HLA-B*57:01* allele was 3.6±1,4% (n=169), which is comparable to the frequency of occurrence of this allele in Europe and the European part of Russia. In order to optimize the treatment regimens for HIV infection, the country should recommend screening for the *HLA-B*57:01* allele in HIV-infected patients before prescribing an analogue of the nucleotide inhibitor of HIV reverse transcriptase, abacavir.

Keywords: *HLA-B*57: 01* allele, genetic marker, HIV infection, abacavir.

Поступила 08.11.2020

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ ЭКЗАНТЕМНЫХ ИНФЕКЦИЙ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН

Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю., Самойлович Е.О.

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

Резюме. В 2012-2018 гг. этиологическая диагностика краснухи и парвовирусной инфекции была проведена у 42 беременных женщин с макулопапулезной сыпью (n=27) или контактировавших с больными с сыпью (n=15). Единственный случай краснухи был выявлен в 2012 г. при сроке беременности 36 недель, что не оказало негативного влияния на ее исход. Парвовирусная инфекция диагностирована у 7 женщин (в 2013, 2014, 2016, 2017 гг.), все они имели как IgM к парвовирусу B19, так и вирусную ДНК в сыворотке крови. Женщины с парвовирусной инфекцией были в возрасте от 22 до 38 лет (медиана 31 год), у 5 женщин была макулопапулезная сыпь, у 2 – лихорадка с артропатией. Шесть из 7 женщин имели контакт с пациентом с сыпью. Представленные данные свидетельствуют о доминирующей роли парвовирусной инфекции в этиологии инфекционной макулопапулезной сыпи у беременных женщин в Беларуси в настоящее время.

Ключевые слова: краснуха, парвовирусная инфекция, диагностика, беременные женщины, Беларусь.

Введение. Краснуха является инфекцией, обладающей хорошо известным тератогенным действием, и имеет наиболее тяжелые последствия при заболевании женщины в 1 триместре беременности [1]. Отсутствие способов предотвратить вертикальную передачу вируса приводит к тому, что основной тактикой при установлении диагноза краснухи у женщины остается прерывание беременности. В Республике Беларусь благодаря успешной вакцинопрофилактике эндемичная циркуляция вируса краснухи отсутствует и выявляются только редкие завозные случаи инфекции [2]. Вместе с тем широкое распространение в стране имеет парвовирусная инфекция, основным проявлением которой является макулопапулезная экзантема, клинически сходная с проявлениями краснухи. Возбудитель парвовирусной инфекции, парвовирус B19, также может передаваться вертикально плоду, приводя к самопроизволным абортам, развитию водянки плода и его гибели. Однако, в отличие от краснухи, парвовирус B19 не обладает тератогенным действием, и при своевременно проведенном внутриутробном лечении высока вероятность благоприятного исхода беременности [3]. Таким образом, этиологическая дифференциальная диагностика краснухи и парвовирусной инфекции играет существенную роль в определении тактики ведения и прогнозе исхода беременности.

Целью работы явилась этиологическая диагностика краснухи и парвовирусной инфекции у беременных женщин с макуло-папулезной сыпью или контактировавших с пациентами с сыпью и эпидемиологический анализ этих случаев.

Материалы и методы исследования. В период 2012-2018 гг. в республиканской лаборатории по кори и краснухе (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии) для верификации диагноза были направлены 42 беременные женщины. Основанием для обследования у 27 женщин явилось появление макуло-папулезной сыпи, у 15 – контакт с пациентом с острой экзантемой. Материалом для исследования служила сыворотка крови. Лабораторная верификация краснухи включала выявление специфических IgM антител, парвовирусной инфекции – IgM антител и вирусной ДНК.

Специфические IgM антитела выявляли в иммуноферментном анализе с использованием коммерческих наборов: к вирусу краснухи – производства Siemens, Германия; к парвовирусу B19 – производства Virion/Serion, Германия. ДНК выделяли из 200 мкл клинического образца с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Нидерланды). Амплификацию фрагмента генома парвовируса B19 проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием наборов производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии «Parvovirus B19».

Результаты и их обсуждение. Несмотря на то, что ни у одной из женщин не было указаний на эпидемиологическую связь с лабораторно подтвержденным случаем краснухи или на поездку в эндемичные по этой инфекции страны, все они, в соответствии с принятой в стране тактикой, были обследованы на наличие IgM антител к вирусу краснухи. Положительный результат был получен лишь у одной (2,4%; 1/42) женщины с острой экзантемой в 2012 г. (рисунок). В этот период в стране был выявлен завозной случай краснухи, имевший ограниченное распространение, что, вероятно, и привело к инфицированию женщины. Срок беременности на момент ее заболевания составил 36 недель. Негативного влияния на развитие плода выявлено не было, беременность закончилась рождением здорового ребенка.

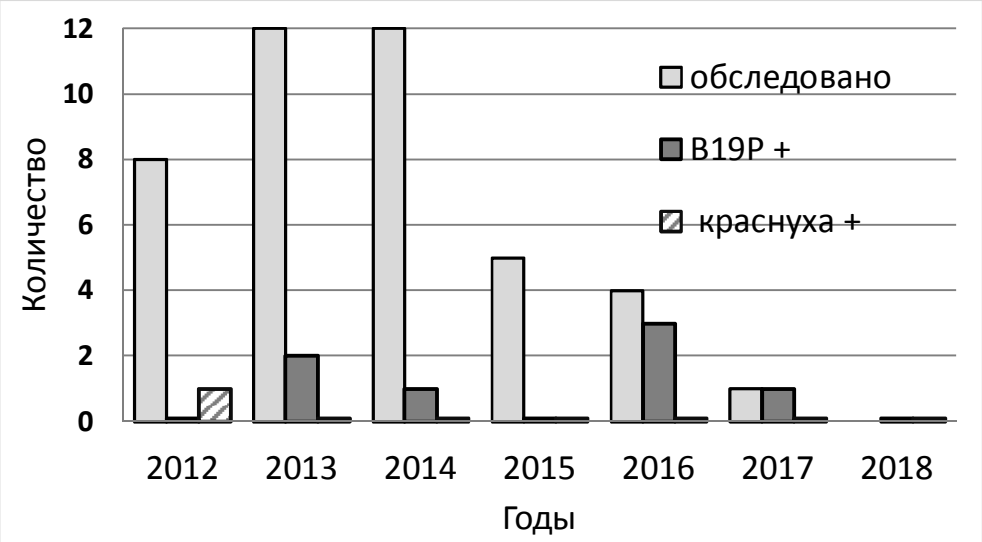


Рисунок. – Число лабораторно верифицированных случаев краснухи и парвовирусной инфекции у беременных женщин с пятнисто-папулезной сыпью или контактировавших с пациентами с сыпью, Республика Беларусь, 2012-2018 гг.

Дальнейшее обследование женщин с отрицательным результатом обследования на краснуху было направлено на диагностику парвовирусной инфекции. Лабораторные критерии острой парвовирусной инфекции были выявлены у 7 (16,7%) женщин, во всех случаях в сыворотке крови были обнаружены как IgM антител к B19P, так и вирусная ДНК.

Беременные женщины с клинически выраженной парвовирусной инфекцией были в возрасте от 22 до 38 лет (медиана 31 год) (таблица). Срок беременности в период инфицирования составлял у 5 женщин 2-12 недель (1 триместр), у одной – 18-19 недель (2 триместр) и у одной – 35 недель (3 триместр). Из 7 женщин 5 имели острую экзантему, у двух женщин экзантема отсутствовала, но наблюдались выраженная артралгия и симптомы ОРИ. Пять

(71,4%) из семи женщин указали на экзантемное заболевание у их старшего ребенка, серологическое обследование которого также подтвердило парвовирусную этиологию экзантемы. Одна женщина имела контакт вне семьи с пациентом детского возраста с острой экзантемой, однако его сыворотка крови не была предоставлена для исследования. Только в одном случае отсутствовали указания на какую-либо связь женщины с другими пациентами с экзантемой.

Таблица. – Характеристика случаев парвовирусной инфекции у беременных женщин с макуло-папулезной сыпью или контактировавших с пациентом с сыпью (n=7)

Возраст, годы (Me)	*22-38 (31)*	*%*
Имели клинические симптомы парвовирусной инфекции, в т.ч.:	7	100,0
макуло-папулезная сыпь	5	71,4
артралгии	2	28,6
Выявлены IgM к B19P	7	100,0
Выявлена ДНК B19P	7	100,0
Контакт с пациентом с сыпью или наличие еще одного случая заболевания, в том числе:	6	85,7
в семье (старший ребенок)	5	71,4
вне семьи	1	14,3

Полученные данные свидетельствуют о том, что наличие ребенка в семье является фактором риска заболевания женщины парвовирусной инфекцией в период беременности, поскольку 71,4% (5/7) заболевших уже имели ребенка на момент наступления текущей беременности. Вместе с тем, из 5 случаев, когда парвовирусная инфекция наблюдалась в одной семье у беременной женщины и ее ребенка, лишь в двух заболевание ребенка предшествовало заболеванию женщины, в одном – женщина и ребенок болели практически одновременно и в двух случаях макуло-папулезная сыпь у ребенка развилась через 12-14 дней после заболевания матери. Таким образом, только в двух из пяти случаев собственный ребенок мог явиться источником инфекции для женщины, в одном – они имели один общий источник инфекции и в двух – женщина была вероятным источником инфекции для ребенка. Несомненно, наличие ребенка повышает число контактов с детьми – основной группой распространения B19P, среди которых могут быть инфицированные и в клинически невыраженной форме.

Одна из заболевших женщин была госпитализирована в гинекологическое отделение в связи с жалобами на остро возникшие артралгии и отечность суставов, однако парвовирусная инфекция была заподозрена у нее только после выписки из стационара и появления острой экзантемы у ее старшего ребенка. Это свидетельствует о недостаточной информированности медиков о различных клинических формах парвовирусной инфекции и сложности ее диагностики у лиц без экзантемы.

Данные об исходе беременности удалось получить в 6 из 7 случаев клинически выраженной парвовирусной инфекции, которые развились в 1 и 3 триместре беременности. Все они имели благоприятный исход, закончившись рождением ребенка. Женщина, инфицированная во 2 триместре беременности, утеряна из-под наблюдения. Большинство имеющихся

в литературе данных свидетельствуют о том, что 1 и 3 триместр беременности наименее опасны для развития неблагоприятных исходов при парвовирусной инфекции [4]. В то же время, проведенное в последние годы в Шотландии исследование продемонстрировало потерю плода в 25% случаев при инфицировании женщины B19P в срок до 11 недель гестации [5].

Заключение. Представленные данные свидетельствуют о доминирующей роли парвовирусной инфекции в этиологии макуло-папулезной сыпи у беременных женщин и крайне низкой вероятности возникновения краснухи в настоящее время в условиях вакцинопрофилактики этой инфекции. Верификация парвовирусной инфекции служит, кроме того, дополнительным подтверждением отсутствия краснухи и позволяет сохранить беременность у женщин с макуло-папулезной сыпью. Этиологическая лабораторная диагностика парвовирусной инфекции у беременных женщин с клинически выраженной парвовирусной инфекцией не имеет каких-либо особенностей и основывается на выявлении как специфических IgM антител, так и вирусной ДНК в сыворотке крови.

Литература

1. Rubella and congenital rubella syndrome: global update / S.E. Robertson [et al.] // Rev. Panam. Salud. Publica. – 2003. – Vol. 14, No. 5. – P. 306-315.
2. Самойлович, Е.О. Краснуха в Республике Беларусь: этап верификации элиминации инфекции / Е.О. Самойлович // Здравоохранение. – 2014. – № 5. – С. 13-17.
3. Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases / M. Enders [et al.] // Prenatal Diagnosis. – 2004. – Vol. 24, No. 7. – P. 513-518.
4. Association of fetal loss with recent parvovirus infection and other demographic prognostic risk factors / A. Daniilidis [et al.] // J. Obstet. Gynaecol. – 2014. – Vol. 34, No. 1. – P. 40-44.
5. Increased number of parvovirus B19 infections in southeast Scotland in 2012-2013 / I. Al Shukri [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2015. – Vol. 21, No. 2. – P. 193-196.

ETIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF ACUTE EXANTEMIC INFECTIONS IN PREGNANT WOMEN

Yermalovich M.A., Svirchevskaya E.Yu., Samoilovich E.O.

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

The etiological diagnosis of rubella and parvovirus infection were carried out in 2012-2018 in 42 pregnant women with maculopapular rash (n=27) or those been in contact with patients with rash (n=15) followed by the epidemiological analysis of the cases. Only one Rubella case was revealed in 2012 at the gestation age 36 weeks with no negative influence to the pregnancy outcome. Parvovirus infection was diagnosed in 7 women (in 2013, 2014, 2016, 2017), all of them had both IgM to parvovirus B19 and virus DNA in blood serum. Women with parvovirus infection were 22-38 years of age (median 31 year), 5 women had maculopapular rash and 2 – fever with arthropathy. Six of 7 women had a contact with patient with rash or additional case of rash disease in the family. The data presented indicate the dominant role of parvovirus infection in the etiology of maculopapular rash in pregnant women in Belarus at present. Laboratory verification of parvovirus infection in pregnant women with manifest parvovirus infection does not have any peculiarities and is based on the detection specific IgM antibodies or viral DNA in the blood serum.

Keywords: rubella, parvovirus B19 infection, diagnosis, pregnant women, Belarus.

Поступила 30.10.2020

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА Е, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Колтунова Ю.Б., Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В.

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

Резюме. В рамках проведения молекулярно-эпидемиологического мониторинга за вирусным гепатитом Е (ВГЕ) на территории Республики Беларусь исследован биологический материал пациентов с инфекционными гепатитами неустановленной этиологии (n=212) и свиней (n=37), а также пробы пищевых продуктов, сточных вод, смывов с поверхностей объектов среды обитания человека (n=110). РНК вируса гепатита Е (ГЕ) была выявлена только в пробах биологического материала от пациентов, частота обнаружения которой составила 3,8%. Результаты проведенного далее секвенирования выявленных вирусов ГЕ позволили отнести их к генотипу GIII. Выполненный филогенетический анализ показал, что внутри данного генотипа исследуемые возбудители ВГЕ не принадлежали ни к одному из ранее классифицированных субгенотипов GIIIa – GIIIj, однако формировали общий кластер с вирусами ГЕ, идентифицированными в России в 2008-2010 гг.

Ключевые слова: вирус гепатита Е, ПЦР, молекулярно-генетический анализ, филогенетический анализ, генотип, Беларусь.

Введение. Вирус гепатита Е (ГЕ) принадлежит к виду Orhtohepevirus A рода Orthohepevirus, семейства Hepeviridae. В настоящее время выделяют 8 генотипов, из которых 5 (G1, GII, GIII, GIV и GVII) могут быть возбудителем острого вирусного гепатита Е (ВГЕ) у человека [1]. Генотипы GI и GII обнаруживаются исключительно у человека, в то время, как генотипы GIII, GIV и GVII способны заражать как человека, так и домашних животных, преимущественно домашних и диких свиней, грызунов, дельфинов (генотиипы GIII, GIV) и верблюдов (генотип GVII) [2].

Распространенность различных генотипов вируса ГЕ также различается: генотип GI циркулирует преимущественно на территории Азии, Южной и Северной Африки, генотип GII – в Центральной Африке и Америке, генотип GIII встречается по всему миру, однако наиболее характерен для территорий Европы, Азии, Южной и Северной Америки, Австралии. Генотип GIV распространен на территории Океании, Восточной Азии и в южных регионах Европы. Генотип GVII циркулирует на территории средней Азии, и в настоящее время имеются лишь единичные сведения о выявлении данного у людей [3].

В настоящее время внутри генотипа GIII выделяют 10 субгенотипов (GIIIa – GIIIj). Согласно литературным данным, субгенотип GIIIa преимущественно циркулирует в США, Нидерландах, Японии, Ю. Корее и Испани, субгенотип GIIIb – в Японии, GIIIc – в Нидерландах и на территории Западной Европы, GIIId – на о. Тайвань и в США, GIIIe – в Каталонии, Великобритании, Греции и Франции, GIIIf – в Испании и Дании, GIIIi – в Германии [4].

Что касается стран ближнего зарубежья, то имеющаяся в литературе информация о генетическом разнообразии циркулирующих вирусов ГЕ весьма ограничена. По данным Российских исследователей, на территории Российской Федерации у человека и животных выявляют, в основном, генотип GIII вируса ГЕ. Случаи выявления генотипа GIV признаны завозными [5, 6].

В Республике Беларусь исследования по молекулярной эпидемиологии ВГЕ только начинают разворачиваться [7, 8].

Настоящая работа посвящена изучению молекулярно-генетических характеристик циркулирующих в последние годы на территории Республики Беларусь вирусов ГЕ.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследований были сыворотки крови (n=137) и пробы фекалий (n=75) от пациентов с инфекционными гепатитами неустановленной этиологии, фрагменты тканей печени (n=18) и пробы фекалий (n=19) от домашних свиней, смывы с поверхностей объектов среды обитания человека (ОСОЧ, n=29), образцы пищевых продуктов (n=22), пробы сточных вод (n=59). Всего в реакции ОТ-ПЦР в режиме реального времени было исследовано 359 проб.

Для выделения вирусных нуклеиновых кислот применялись коммерческие наборы «НК-экстра» (ГУ РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь).

Детекцию РНК вируса ГЕ выполняли с помощью коммерческих ПЦР-тест-систем RealStar (Altona, Германия).

Молекулярное типирование вируса ГЕ выполняли согласно ранее разработанной методике. 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. Компьютерный анализ последовательностей (множественное выравнивание, определение степени сходства нуклеотидной и аминокислотной последовательностей) проводили с помощью программных продуктов MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis) версии 6.0.

Результаты и их обсуждение. В ходе выполненных ПЦР исследований биологического материала от домашних свиней, смывов с поверхностей ОСОЧ, пищевых продуктов и сточных вод РНК вируса ГЕ не была обнаружена ни в одной пробе. Частота ее выявления в пробах биологического материала от пациентов составила 3,8% (n=8). При этом генетический материал возбудителя был выявлен в 2,6% (n=2) исследованных проб фекалий и в 4,4% (n=6) исследованных сывороток крови. Все положительные пробы принадлежали реципиентам почечного аллографта, у которых в поздний посттрансплантационный период была зарегистрирована инфекция с выраженными признаками патологии печени на фоне отсутствия диагностически значимых маркеров вирусных гепатитов А, В и С.

Выявленные в биологическом материале вирусы ГЕ далее были подвергнуты молекулярному типированию методом секвенирования с последующим компьютерным анализом полученных нуклеотидных последовательностей (множественное выравнивание, определение степени сходства нуклеотидной и аминокислотной последовательностей).

По результатам проведенного молекулярного типирования анализируемые вирусы ГЕ были отнесены к генотипу GIII. Полученные данные соотносятся с имеющейся в литературе информацией о генотипическом спектре циркулирующих на территории европейского региона возбудителей ВГЕ [9].

В ходе далее выполненного биоинформационного анализа идентифицированных нами вирусов установлено, что все они, будучи практически идентичными между собой, достоверно группировались в пределах общего кластера генотипа GIII. При этом внутри генотипа GIII исследуемые вирусы не принадлежали ни к одному из ранее классифицированных субгенотипов GIIIa – GIIIj. По результатам проведенного сравнительного филогенетического анализа (рисунок) они достоверно формировали общий кластер с вирусами ГЕ, идентифицированными в России в 2008-2010 гг. (Екатеринбург, Архангельск) и в Эстонии [10]. Доля нуклеотидных различий между ними составила 6,5-13%, тогда как с вирусами ГЕ из других стран она была не менее 16,5%. Получен-

ные данные указывают на принадлежность «белорусских» и «российских» вирусов ГЕ к одному субгенотипу.

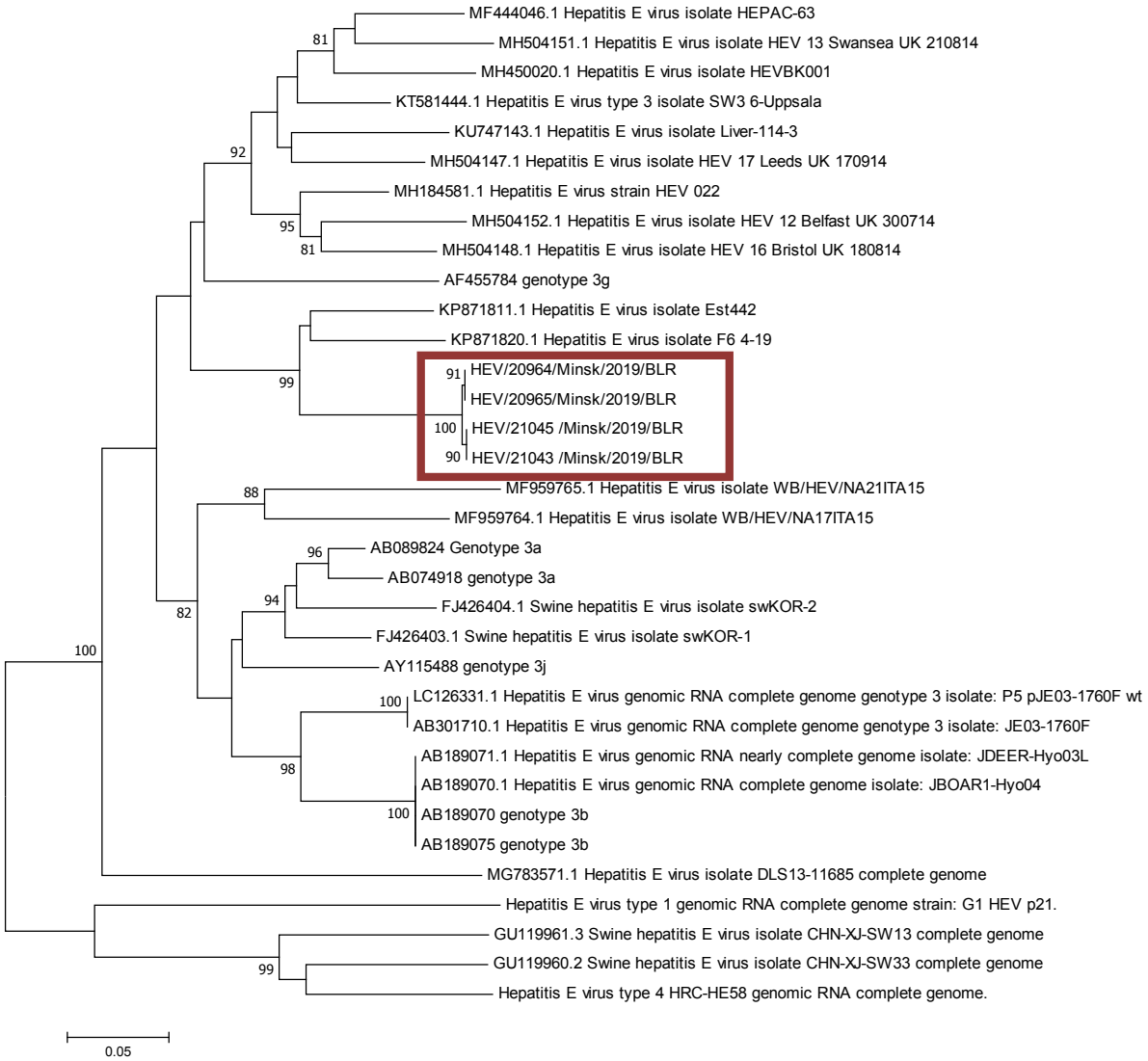


Рисунок. – Филогенетический анализ изолятов вируса ГЕ (HEV_Minsk20964, HEV_Minsk20965, HEV_Minsk21043 и HEV_Minsk21045)

Нуклеотидные последовательности были депонированы в международный банк данных с присвоением кодов доступа.

Заключение. В результате молекулярно-эпидемиологического анализа выявленных на территории Республики Беларусь возбудителей ВГЕ установлена их генетическая идентичность между собой (99-100% сходства нуклеотидных последовательностей). Все выявленные вирусы относились к генотипу GIII (87,31-89,47% сходства нуклеотидных последовательностей), внутри которого – к ранее не идентифицированному субгенотипу (GIIIa – GIIIj). По данным филогенетической реконструкции они не формировали общий монофилетический кластер ни с одним из ранее классифицированных генотипов, однако группировались в общий кластер с вирусами ГЕ, циркулирующими в России в 2008-2010 гг. (Екатеринбург, Архангельск) и Эстонии (с долей нуклеотидных различий 6,5-13%).

Литература

1. Chronic infection with camelid hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk / G.-H. Lee [et al.] // Gastroenterology. – 2016. – Vol. 2 – P. 355-357. doi: 10.1053/j.gastro.2015.10.048
2. Hepatitis E virus genotypes and evolution: emergence of camel hepatitis E variants / S. Sridhar [et al.] // J. Mol. Sci. – 2017. – Vol. 18, No. 4. – P. 869. doi: 10.3390/ijms18040869
3. Origin and dispersal of hepatitis E virus / D. Forni [et al.] // J. Emerg. Microbes Infect. – 2018. – Vol. 7. – P. 1-13. doi: 10.1038/s41426-017-0009-6
4. Diversity of hepatitis E virus genotype 3 / F. Nicot [et al.] // Rev. Med. Virol. – 2018. – Vol. 28, No. 5. – e1987. doi: 10.1002/rmv.1987
5. Поиск РНК аутохтонного для России вируса гепатита Е в наиболее вероятных источниках инфекции / О.Л. Воронина [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2014. – № 3. – С. 29-34.
6. Циркуляция вируса гепатита Е кроликов на территориях с разной степенью эндемичности по гепатиту Е / А.М. Мохаммед [и др.] [Электронный ресурс] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2-1. – Режим доступа: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=18395. – Дата обращения: 20.10.2020.
7. Обнаружение вируса гепатита Е среди кроликов в республике Беларусь / А.А. Арабей [и др.] // Военная медицина. – 2015. – № 2. – С. 51-53.
8. Филогенетический анализ последовательностей ВГЕ, выявленных в Республике Беларусь / А.А. Арабей. [и др.] // Молекулярная диагностика 2018: сб. науч. тр. междунар. науч.-практ. конф.; под ред. В.И. Покровского. – Минск, 2018. – С. 288-290.
9. WHO The Global Prevalence of Hepatitis E Virus Infection and Susceptibility: A Systematic Review [Eelectronic resource]. – Mode of access: http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e. – Date of access: 12.08.2020.
10. Hepatitis E Virus in domestic pigs, wild boars, pig farm workers, and hunters in Estonia / A. Ivanova [et al.] // Food Environ. Virol. – 2015. – Vol. 7, No. 4. – P. 403-412. doi: 10.1007/s12560-015-9210-8.

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF VIRAL HEPATITIS E PATHOGENS IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BELARUS

Kaltunova Yu.B., Amvrosieva T.V., Paklonskaya N.V.

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

Within the framework of molecular-epidemiological monitoring of viral hepatitis E (VHE) on the territory of the Republic of Belarus, biological material from patients with infectious hepatitis of unknown etiology (n=212) and domestic pigs (n=37), as well as samples of food products, wastewater, probes from the surfaces of human habitat objects (n=110). RNA of the hepatitis E virus (HEV) was detected only in samples of biological material from patients, where the detection rate reached 3.8%. The results of sequencing of the identified HEV pathogens allowed to attribute them to the GIII genotype. The performed phylogenetic analysis showed that within this genotype the investigated HEV pathogens did not belong to any of the previously classified subgenotypes GIIIa - GIIIj, however, they formed a common cluster with the HEV pathogens identified in Russia in 2008-2010.

Keywords: hepatitis E virus, PCR, molecular genetic analysis, phylogenetic analysis, genotype, Belarus.

Поступила 21.10.2020

ДЕТЕКЦИЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОГО РНК-ВИРУСА СЕМЕЙСТВА *TOTIVIRIDAE* В ИЗОЛЯТАХ ТРИХОМОНАД, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Мельник П.С., Рубаник Л.В., Полещук Н.Н.

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

Резюме. Проведено исследование белорусских изолятов урогенитальных трихомонад на предмет зараженности их РНК вирусом – *Trichomonas vaginalis* virus (TVV) из семейства *Totiviridae* и его типового разнообразия. Установлено наличие TVV в 61 (88,41%) образце. Отмечены случаи как моно- (63,77%), так и микстипового (24,64%) содержания вируса в простейшем. Доминирующим типом вируса являлся TVV3 (76,25%). TVV2 выявлен в 21.25%. TVV1 и TVV4 обнаруживались в равной степени редко (по 1,25%). Осуществлен анализ литературных данных касающийся молекулярной эпидемиологии и биологических свойств внутриклеточного вируса трихомонад.

Ключевые слова: *Trichomonas vaginalis,* внутриклеточный вирус, типированиеб Беларусь.

Введение. *Trichomonas vaginalis* – простейшее, поражающее урогенитальный тракт женщин и мужчин, вызывая при этом урогенитальный трихомониаз. Заболевание имеет повсеместный характер распространения и присуще преимущественно лицам репродуктивного возраста с вовлечением в эпидемиологический процесс более старшей возрастной группы (30-39 лет). На территории Республики Беларусь в 2018 и 2019 гг. было зарегистрировано 56,44 и 50,45 случаев на 100 тысяч населения соответственно [1].

По литературным данным *T. vaginalis* может инфицироваться внутриклеточным вирусом (*Trichomonas vaginalis* virus (TVV)). Внутриклеточные вирусоподобные частицы трихомонад впервые были обнаружены в 1985 г. Вирус трихомонад относят к семейству *Totiviridae*, для которого свойственно заражение ряда простейших [2]. Вирион вируса трихомонад состоит из геномной РНК и белкового капсида. Геномная РНК представлена линейной двухцепочечной нитью длинной 4500-5500 п.н. В диаметре вирион составляет примерно 33 нм, а также обладает икосаэдрической симметрией. Исследование изолятов *T. vaginalis* показало, что количество копий вируса на клетку простейшего варьируется от 280 до 1380 [2-4].

Считают, что присутствие вируса влияет на фенотипические свойства и экспрессию факторов патогенности трихомонад таких как: цистеиновые протеазы и высоко иммуногенный белок P270, которые связывают с цитотоксичностью и цитоадгезией [2, 5].

Распространенность TVV среди изолятов трихомонад в различных регионах мира варьирует от 13% до 100% [6]. Выделяют 4 типа данного вируса: TVV1, TVV2, TVV3 и TVV4. Они способны поражать клетку трихомонад как в моноварианте, так и микстварианте, т.е. одновременно несколькими типами вируса семейства *Totiviridae* [4, 7]. Предполагают, что существует типоспецифическое влияние вируса на патогенез трихомонадной инфекции [2, 8, 9].

В настоящее время распространенность вируса, его типовой пейзаж и взаимосвязь между TVV и изменением вирулентности патогена, влиянием на клинические проявления заболевания и эффективность лечения всесторонне исследуются. Работы по изучению распространенности вируса трихомонад и его типированию среди белорусских изолятов *T. vaginalis* до настоящего времени не проводились.

Целью исследования являлось идентификация и изучение типового разнообразия TVV среди изолятов *T. vaginalis*, выделенных на территории Республики Беларусь.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования служили 69 ПЦР-положительных на наличие ДНК *T. vagnalis* образцов биологического материала, полученного от женщин (мазок-соскоб из цервикального канала, влагалища, уретры) и мужчин (мазок-соскоб из уретры, секрет предстательной железы) в период 2019-2020 гг.

Перед постановкой реакции обратной транскрипции, РНК выделяли из биологического материала с помощью набора «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ) в соответствии с инструкцией производителя.

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реактивов «MMLV RT kit» (Евроген, РФ). При следующей постановке ПЦР использовали специфичные для каждого из 4 типов вируса праймеры (ОДО «Праймтех», РБ): TVV1F 5'-ATTAGCGGTGTTTGTGATGCA-3', TVV1R 5'-CTATCTTGCCATCCTGACTC-3'; TVV2F 5'-GCTTGAGCACTGCTCGCG-3', TVV2R 5'-TCTCTTTTGGCATCGCTT-3'; TVV3F 5'-AAATTAATCAACACCCTCC-3', TVV3R 5'-CAGATCACTTTGTGTGTC-3'; TVV4F 5'-ATGCCAGTTGCTTTCCG-3', TVV4R 5'-TTCCCCAATAGTTATCAG-3' [2].

Анализ продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм). Размер полученных участков ДНК определяли, ориентируясь на коммерческий маркер с шагом 100 п.н. (Маркер длин 100+ bp DNA Ladder, Евроген, РФ).

Результаты исследования и их обсуждение. По результатам исследования в 61 (88,41%) из 69 изолятов *T. vaginalis* подтверждено наличие TVV. В 8 (11,59%) образцах вируса трихомонад выявлено не было.

Среди положительных образцов отмечены случаи как монотипового (n=44; 63,77%), так и мксттипового (n=17; 24,64%) носительства вируса. Сочетание TVV2 и TVV3 типов встречалось в 15 из 17 мксттиповых образцов (21,74%). Три типа вируса одновременно были выявлены в 2 (2,90%) образцах: в первом – 1, 2, 3 типы, во втором – 2, 3, 4. Сочетание четырех типов вируса в простейшем выявлено не было. Ввиду определения 24,64% образцов как мксттиповых, общее количество случаев выявления вируса в трихомонадах было увеличено до 80 (рисунок).

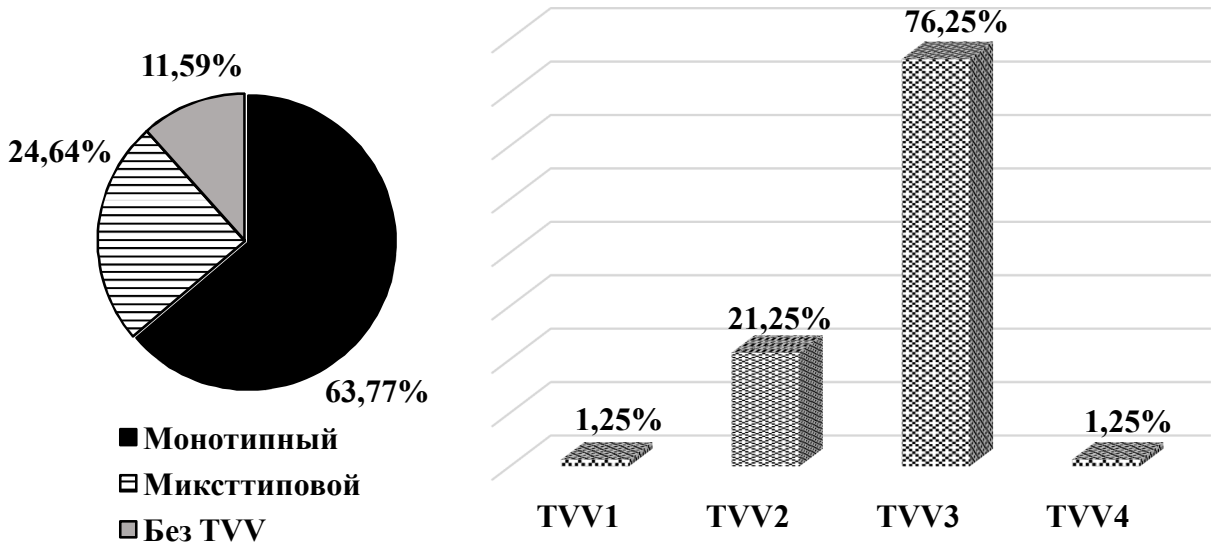


Рисунок. – Процентная структура выборки

Как видно из представленных диаграмм, доминирующим типом в проанализированной выборке являлся TVV3 – 61 из 80 случаев выявления вируса в простейшем

(76,25%). Реже встречался вирус 2 типа – 17 случаев (21,25%). TVV1 и TVV4 обнаруживались в равной степени – каждый по одному случаю (1,25%).

По литературным данным, в зависимости от региона мира распространенность зараженных TVV вирусом простейших варьирует. Так, в США диапазон верификации вируса составляет 30-100%, на Кубе – 55-100%, в Южной Африке – 81,9%, в Кении – 43,5%, в Бразилии – 60-100%, в Иране – 17-50%, в Индии – 23.3%, в Египте – 20-35%, в Китае – 50-100%, на Филиппинах – 19%, в Южной Корее – 13,6%, на Тайване – 50-100%, в Нидерландах – 50,4%, в Чехии – 33-100%, в Италии – 50% [6, 10]. Исходя из полученных в данном исследовании результатов в Республике Беларусь встречаемость вируса трихомонад среди изолятов простейшего высока и составляет примерно 90%, что коррелирует с вышеприведенными процентными значениями распространенности в ряде исследований, выполненных в различных странах мира.

В исследовании da Luz Becker et al. (2015), проведенном в Южной Бразилии, преобладающим типом вируса являлся вирус типа TVV1 (77,5%), далее в равной мере выявлялись TVV2 и TVV3 (30%). Реже всего встречался вирус TVV4 (10%) [11]. На Филиппинах, в соответствии с исследованием Rivera et al. (2017), по распространенности лидировали 1 и 2 типы вируса трихомонад (по 13% каждый), а 3 и 4 типы – составляли только 5% и 6% соответственно [12]. В то же время, Masha et al. (2017) показали, что в Кении распространенность TVV1 составляла 39,1%, TVV2 – 26,1%, TVV3 – 17,4%, TVV4 – 13% [13]. В исследовании, проведенном в Италии, Margarita et al. (2019) установили, что в проанализированной ими выборке чаще встречался вирус 2 типа (79,17%), за ним следовали вирус 1 и 3 типов (70,83% и 54,17% соответственно), вирус 4 типа был найден только в 2 случаях (8,33%) [10]. Среди изолятов *T. vaginalis,* изученных в настоящем исследовании, доминирующим типом являлся TVV3 (76,25%). Таким образом, популяция белорусских изолятов трихомонад имеет отличный от вышеприведенных типовой пейзаж TVV, что требует дальнейшего углубленного изучения и анализа.

Показано, что в одном штамме *T. vaginalis* могут находиться одновременно вплоть до всех 4 типов РНК-вируса [7]. В нашем исследовании сочетание в одном изоляте четырех типов вируса выявлено не было. Однако встречались микстиповые (24,64%) изоляты, содержащие различные сочетания вируса.

При урогенитальном трихомониазе, могут отмечаться как симптомные, так и бессимптомные формы. Связь между течением заболевания, клиническими проявлениями и наличием TVV в клетках простейшего интенсивно исследуется. Имеются противоречивые данные относительно корреляции между присутствием вируса и тяжестью течения инфекции [6]. Однако в ряде работ, вирус трихомонад 1 типа чаще обнаруживали у лиц с более выраженной и острой формой инфекции, а 2 типа – со слабо выраженным воспалительным процессом [2, 8, 9]. В отношении 3 и 4 типа такого анализа и взаимосвязи в доступной литературе найти не удалось.

Вирус трихомонад относится к одному из наиболее важных факторов вирулентности *T. vaginalis,* тем самым влияя на реакцию иммунного ответа организма и выраженность воспалительного процесса. Данный факт связан со способностью внутриклеточного РНК-вируса трихомонад регулировать синтез цистеиновых протеаз и главного поверхностного иммуногенного белка P270.

Цистеиновые протеазы являются протеолитическими ферментами, которые способствуют расщеплению базальной мембраны эпителиальных клеток, молекул гемоглобина, фибронектина и коллагена IV типа человека [6]. Именно благодаря этим ферментам трихомонады имеют сродство к эпителиоцитам, приобретают цитоадгезивные свойства и вызывают цитотоксический эффект.

Считают, что гиперактивный синтез P270 клеткой трихомонад чаще связан с наличием внутриклеточного вируса 2 и 3 типов, чем 1 и 4 [9]. В то же время, стоит отметить,

что при длительном культивировании среди изолятов трихомонад наблюдается тенденция к потере вируса, что подтверждается значительным снижением или полным отсутствием экспрессии белка P270 и представлении его на поверхности патогена [14].

Кроме того, с практической точки зрения важным является возможность влияния вируса трихомонад на восприимчивость простейшего к лекарственным средствам нитроимидазолового ряда (метронидазолу, тинидазолу и др.). В последнее время появляется все больше информации о распространении устойчивости у *T. vaginalis* к данным лекарственным средствам [15]. Известно, что резистентность к метронидазолу обуславливается наличием нуклеотидной замены в локусе ITS (C66T). Тем не менее, исследования Snipes et al. (2000) показали, что данная мутация не была выявлена в геноме *T. vaginalis,* являющихся носителями любого из типов TVV [15]. В связи с этим, отсутствие внутриклеточного вируса трихомонад связывают с резистентностью изолятов к метронидазолу [3].

Таким образом, наличие внутриклеточного РНК-вируса трихомонад семейства *Totiviridae* влияет на вирулентность на молекулярном уровне через механизмы цитотоксичности и цитоадгезии, клиническое течение заболевания, восприимчивость к метронидазолу. Исходя из этого, идентификация вируса трихомонад и изучение его типовой принадлежности являются актуальными для полного понимания патогенеза урогенитального трихомониаза.

Выводы

1) РНК-вирус трихомонад выявлен в 88,41% исследованных изолятов *T. vagnalis,* что свидетельствует о его широкой распространенности.

2) Отмечены случаи как монотипового (63,77%), так и мксттипового (24,64%) инфицирования простейшего вирусом.

3) Доминирующим типом в проанализированной выборке являлся TVV3 (76,25%), который детерминирует высокую степень вирулентности трихомонад. Реже встречался вирус 2 типа (21,25%). TVV1 и TVV4 обнаруживались в равной степени по 1,25% каждый.

4) Дальнейшее исследование позволит углубить знания о патогенетических аспектах заражения трихомонад внутриклеточным вирусом, в том числе определить его влияние на синтез такого фактора вирулентности *T. vaginalis* как P270.

Литература

1. Многолетняя динамика заболеваемости урогенитальным трихомониазом в Республике Беларусь и проблемы лабораторной диагностики / Л. В. Рубаник [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2019. – Т. 8, № 2. – С. 199-211.

2. *Trichomonas vaginalis* virus among women with trichomoniasis and associations with demographics, clinical outcomes, and metronidazole resistance / K.J. Graves [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2019. – Vol. 69, No. 12. – P. 2170-2176. doi: 10.1093/cid/ciz146

3. Wang, A. *Trichomonas vaginalis* phenotypic variation occurs only among trichomonads infected with the double-stranded RNA virus / A. Wang, C.C. Wang, J.F. Alderete // J. Exp. Med. – 1987. – Vol. 166, No. 1. – P. 142-150. doi: 10.1084/jem.166.1.142

4. Benchimol, M. *Trichomonas vaginalis:* observation of coexistence of multiple viruses in the same isolate / M. Benchimol, T.H. Chang, J.F. Alderete // FEMS Microbiol. Lett. – 2002. – Vol. 215, No. 2. – P. 197-201. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11391.x

5. Khoshnan, A. Characterization of double-stranded RNA satellites associated with the *Trichomonas vaginalis* virus / A. Khoshnan, J.F. Alderete // J. Virol. – 1995. – Vol. 69, No. 11. – P. 6892-6897. doi: 10.1128/JVI.69.11.6892-6897.1995

6. *Trichomonas vaginalis* virus: a review of the literature / K.J. Graves [et al.] // Int. J. STD AIDS. – 2019. – Vol. 30, No. 5. – P. 496-504. doi: 10.1177/0956462418809767

7. Clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* concurrently infected by strains of up to four Trichomonasvirus species (Family *Totiviridae*) / R.P. Goodman [et al.] // J. Virol. – 2011. – Vol. 85, No. 9. – P. 4258-4270. doi: 10.1128/JVI.00220-11

8. Species typing of Cuban *Trichomonas vaginalis* virus by RT-PCR, and association of TVV-2 with high parasite adhesion levels and high pathogenicity in patients / J. Fraga [et al.] // Arch. Virol. – 2012. – Vol. 156. – P. 1789-1795. doi: 10.1007/s00705-012-1353-4

9. Identification and characterization of a type III *Trichomonas vaginalis* virus in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis* / I.N. Bessarab [et al.] // Arch. Virol. – 2011. – Vol. 156. – P. 285-294. doi: 10.1007/s00705-010-0858-y

10. Prevalence of double-stranded RNA virus in *Trichomonas vaginalis* isolated in Italy and association with the symbiont *Mycoplasma hominis* / V. Margarita [et al.] // Parasitol. Res. – 2019. – Vol. 157. – P. 1789-1795. doi: 10.1007/s00705-012-1353-4

11. High rates of double-stranded RNA viruses and Mycoplasma hominis in *Trichomonas vaginalis* clinical isolates in South Brazil / B. da Luz Becker [et al.] // Infect. Genet. Evol. – 2015. – Vol. 34. – P. 181-187. doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.005

12. Detection and molecular characterization of doublestranded RNA viruses in Philippine *Trichomonas vaginalis* isolates / W.L. Rivera [et al.] // J. Microbiol. Immunol. Infect. – 2015. – Vol. 50. – P. 669-676. doi: 10.1016/j.jmii.2015.07.016

13. Molecular typing of Trichomonas vaginalis isolates by actin gene sequence analysis and carriage of *T. vaginalis* viruses / S.C. Masha [et al.] // Parasit. Vectors. – 2017. – Vol. 10, No. 537. – P. 1-9. doi: 10.1186/s13071-017-2496-7

14. Alderete, J.F. Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis* / J.F. Alderete // Infect. Immun. – 1999. – Vol. 67, No.8. – P. 4298-4302. doi: 10.1128/IAI.67.8.4298-4302.1999

15. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates / L.J. Snipes [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 38. – P. 3004-3009. doi: 10.1128/JCM.38.8.3004-3009.2000

DETECTION OF A DOUBLE-STRANDED RNA VIRUS OF THE *TOTIVIRIDAE* FAMILY IN *TRICHOMONAS VAGINALIS* ISOLATED IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Melnik P.S., Rubanik L.V., Poleshchuk N.N.

Republican Research & Practical Centre of Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

The study of Belarusian isolates of urogenital trichomonads for their infection with the RNA *Trichomonas vaginalis* virus (TVV) from the family *Totiviridae* and its type diversity was carried out. TVV was found in 61 (88.41%) samples. There were cases of both mono- (63.77%) and mixedtype (24.64%) virus content in the protozoan. The dominant virus type was TVV3 (76.25%). TVV2 was detected in 21.25%. TVV1 and TVV4 were equally rare (1.25% each). The literature data concerning the molecular epidemiology and biological properties of the intracellular trichomonas virus were analyzed.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, the intracellular virus, typing, Belarus.

Поступила 14.10.2020

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ *VARICELLA-ZOSTER*, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В г. МИНСКЕ В 2015-2020 гг.

Семейко Г.В., Гузовская Т.С., Дронина А.М., Самойлович Е.О.

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

Резюме. С использованием ПЦР идентифицирован вирус *Varicella Zoster* у пациентов с различными клиническими формами инфекции: первичным инфицированием, ветряной оспой новорожденного, опоясывающим лишаем. Выполнено генотипирование 7 вирусов на основании идентификации точечных мутаций, локализующихся в трех областях генома (ORF21, 22, 50). Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей показало, что у 6 вирусов они были идентичными, у одного присутствовала одна замена – A38262G. Все выявленные вирусы *Varicella Zoster* относились к клэйду 3 (или генотипу E2). Полученные результаты свидетельствуют об однородном генотипическом пейзаже циркулирующих вирусов в г. Минске в 2015-2020 гг.

Ключевые слова: ветряная оспа, вирус *Varicella Zoster*, генотипирование, Беларусь.

Введение. Ветряная оспа занимает ведущие позиции в структуре инфекционной патологии в Республике Беларусь, ежегодно в стране регистрируется от 50 000 до 80 000 случаев [1]. Отмечающееся после первичного инфицирования вирусом *Varicella Zoster* пожизненное персистирование вируса в чувствительных ганглиях с периодической реактивацией обуславливает развитие вторичной эндогенной инфекции – опоясывающего лишая. Особую опасность инфицирование вирусом *Varicella Zoster* несет во время беременности, как для женщины (высокая частота развития пневмонии), так и для плода [2].

Клиническая картина при ветряной оспе достаточно характерная, поэтому лабораторное обследование требуется лишь в редких случаях. Согласно рекомендациям ВОЗ, наиболее надежным методом для подтверждения диагноза является ПЦР, который принимается за «золотой стандарт». Предпочтительным материалом для исследования является содержимое везикул, но также подходящим является носоглоточный мазок, слюна, кровь, моча и цереброспинальная жидкость [3].

Вирус *Varicella Zoster* относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Alphaherpesvirinae*, роду *Varicellovirus.* Геном представлен двухцепочечной ДНК размером около 125 000 п.о. и содержит 72 открытые рамки считывания [4]. Несмотря на достаточно высокий уровень консервативности генома и отсутствие коротких вариабельных фрагментов, в геноме обнаружено около 500 однонуклеотидных полиморфных сайтов, имеющих различные аллельные состояния. Поэтому современные подходы к генотипированию реализованы либо через секвенирование всего генома, либо через точечную идентификацию нескольких ключевых аллелей, что в практическом плане означает амплификацию нескольких фрагментов, расположенных в различных областях генома вируса [4, 5]. Согласно современной классификации, принятой в Лондоне в 2008 г. и в дальнейшем дополненной, выделяют 7 утвержденных клэйдов, обозначаемых арабскими цифрами 1-6 и 9, и 2 предварительных, обозначаемых римскими цифрами VII и VIII, которые имеют преимущественное региональное распространение [4, 6]. В различных географических регионах мира циркулируют разные генотипы. В Европейском регионе выявляются вирусы шести клэйдов, доминирующим является клэйд 1 [7, 8].

Целью настоящего исследования явилось установить молекулярно-генетические характеристики циркулировавших в г. Минске в 2015-2020 гг. вирусов *Varicella Zoster*.

Материалы и методы исследования. Для идентификации вируса *Varicella Zoster* в биологическом материале пациентов исследовано 17 образцов биологического материала (12 – содержимое везикулы, 5 – носоглоточные мазки) от 13 пациентов в возрасте от 4 дней до 66 лет (9 детей и 4 взрослых) с подозрением на инфицирование. У 11 из 13 обследованных (8 детей и 3 взрослых) было заподозрено первичное инфицирование вирусом *Varicella Zoster*. У ребенка, обследованного в возрасте 4 дней, имела место ветряная оспа новорожденного, поскольку мама ребенка заболела первичной ветряной оспой за 18 дней до родов. У взрослого, обследованного в 66 лет, имел место опоясывающий лишай. Образцы от пациентов собраны на 1-9 день от появления первых элементов сыпи. Все обследованные пациенты проживали в г. Минске.

Обнаружение вируса *Varicella Zoster* в биологическом материале проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием тест-системы «РеалБест ДНК VZV» производства Вектор-БЕСТ, Российская Федерация. Выделение вирусной ДНК из биологического материала выполняли с помощью набора «АртРНК MiniSpin» (АртБиоТех, Беларусь) или QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Германия).

С целью последующего секвенирования и генотипирования вируса выполняли амплификацию трех фрагментов генома (ORF21, ORF22, ORF50) методом обычной или гнездовой ПЦР в зависимости от исходного количества вирусной ДНК в пробе с использованием описанных в литературе праймеров [9]. Реакционная смесь для первого и второго раунда ПЦР включала по 20 пмоль каждого праймера, 2 ед Taq-полимеразы (АртБиоТех, Беларусь), 400 мкмоль дНТФ, 2 мМ $MgCl_2$. Объем реакционной смеси составлял 50 мкл. В реакцию вносили 5 мкл ДНК. Амплификацию проводили в следующих условиях: начальная денатурация – 2 мин при 95°С, затем 40 циклов амплификации: денатурация – 30 с при 95°С, отжиг праймеров – 30 с при 55°С (для фрагментов ORF21 и ORF50 / 60°С для фрагмента ORF22) и элонгация –30 с при 72°С, завершающая элонгация – 5 мин при 72°С. Второй раунд ПЦР проводили в условиях, аналогичных первому раунду. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, для контроля размера полученных фрагментов использовали ДНК-маркер 100 bp (NEB, Великобритания).

Полученные фрагменты кДНК вируса вырезали из геля и очищали с использованием набора QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия). Секвенирование выполняли в обоих направлениях с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit на капиллярном секвенаторе 3500 (Life Technologies, США).

Редактирование полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием лицензионного программного обеспечения SeqScape v.3.0 (Applied Biosystems, США) и BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0.

Результаты исследования и их обсуждение.

Идентификация вируса Varicella Zoster в биологическом материале пациентов. Всего исследовано 17 образцов биологического материала (12 образцов содержимого везикулы и 5 носоглоточных мазков) от 13 заболевших. У 11 из них удалось обнаружить вирус *Varicella Zoster* в биологическом материале (3 мазках со слизистой носоглотки и 10 образцах содержимого везикул). У одного из детей (4 года) единственная из исследованных проб (носоглоточный мазок) оказалась отрицательной. У ребенка заболевание протекало в легкой форме, с единичными везикулами. Одновременно с девочкой (с разницей в 2 дня) ветрянкой заболел ее отец. Вероятно, у девочки и ее отца был единый источник инфицирования (в это время ветрянкой болели дети в группе детского сада, который посещала девочка). У отца имели место средне-тяжелые клинические

проявления инфекции. В обоих образцах биологического материала (носоглоточный мазок и содержимое везикул) выявлена ДНК вируса *Varicella Zoster*.

Еще у одного ребенка (9 лет) была заподозрена ветряная оспа, протекавшая в легкой форме, поскольку на коже обнаруживались несколько элементов сыпи. Диагноз не подтвердился – результат исследования и содержимого везикулы, и носоглоточного мазка, взятых на 3 день от начала заболевания, оказался отрицательным. В типичных случаях диагноз ветряная оспа не представляет трудностей, но в отдельных случаях может возникнуть необходимость в проведении лабораторной диагностики. Так, дифференциальная диагностика проводится, прежде всего, с простым герпесом, а также с поражениями кожи при системных заболеваниях.

Таким образом, в рамках проведенного исследования вирус *Varicella Zoster* был идентифицирован в биологическом материале пациентов с различными клиническими формами инфекции (первичное инфицирование, ветряная оспа новорожденного, опоясывающий лишай).

Генотипирование вируса Varicella Zoster от пациентов с различными клиническими формами инфекции. Для генотипирования вируса была выбрана стратегия идентификации 7 точечных мутаций, локализующихся в трех генах. С этой целью для 7 вирусов были секвенированы небольшие, длиной 400-500 п.о., фрагменты генов, кодирующих белки: оболочечный протеин UL37 (ORF21), большой оболочечный протеин (ORF22), поверхностный гликопротеин M (ORF50). Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей показало, что 6 вирусов имели идентичные нуклеотидные последовательности. Только у вируса VZV-3358 присутствовала одна замена в позиции 38262 – G (фрагмент ORF22), у референс-штамма Dumas и остальных 6 белорусских вирусов в этом положении находился A. Мутация локализовалась в 1 положении кодона и приводила к замене аминокислоты (метионин→валин). Данная замена не является значимой для определения генотипа вируса.

На основании анализа значимых позиций генома было установлено, что все выявленные вирусы *Varicella Zoster* относились к клэйду 3 (или генотипу E2 по старой классификации [5]) (таблица).

Таблица. – Генотипированные вирусов *Varicella Zoster* от пациентов

Лаб. номер	Диагноз	Номер позиции в геноме вируса							Генотип
		ORF21		ORF22				ORF50	
		33725	33728	37902	38055	38081	38177	87841	
Референс-штамм Dumas (NC001348)		T	T	A	T	A	G	C	Clade 1 / E1
1654	Ветряная оспа новорожденного	C	C	A	T	A	G	T	Clade 3 / E2
3278	Ветряная оспа	C	C	A	T	A	G	T	Clade 3 / E2
3352	Опояс. лишай	C	C	A	T	A	G	T	Clade 3 / E2
3358	Ветряная оспа	C	C	A	T	A	G	T	Clade 3 / E2
3384	Ветряная оспа	C	C	A	T	A	G	T	Clade 3 / E2
3388	Ветряная оспа	C	C	A	T	A	G	T	Clade 3 / E2
3393	Ветряная оспа	C	C	A	T	A	G	T	Clade 3 / E2

Известно, что различные генотипы вируса *Varicella Zoster* демонстрируют определенное географическое распространение. Так, вирусы, относящиеся к клэйду 1 и 3 (генотипы E1 и E2) имеют наиболее широкое распространение в Европе, клэйду 2 (генотип J) – распространены в Японии и странах Азии, клэйдам 4, 5, 6 и 9 (генотипы M1-M4) – в странах Африки и Центральной и Южной Америки [7-10]. Представленные в

литературе данные изучения регионального разнообразия циркулирующих генотипов вируса *Varicella Zoster,* выполненные на основании генотипирования 734 вирусов из 19 стран Европы, показали, что в регионе выявлялись вирусы, относящиеся к шести клэйдам (1-6), при этом доминирующим являлся клэйд 1. На его долю приходилось 50% генотипированных вирусов. Клэйд 3 являлся вторым по распространенности (37%). В данный анализ были включены и вирусы *Varicella Zoster* от пациентов из Беларуси, среди 15 генотипированных вирусов от случаев опоясывающего лишая, выявленных в период 1998-2006 гг., 80% (12/15) относились к клэйду 1 и 20% (3/15) – к клэйду 3 [7, 8].

Полученные данные свидетельствуют о том, что генотипический пейзаж циркулировавших в 2015-2020 гг. в г. Минске вирусов *Varicella Zoster* являлся однородным, и все выявленные вирусы относятся к одному клэйду 3. В сравнении с предшествующим периодом – концом 90-х – начале 2000-х гг. – произошла смена доминирующего генотипа вируса (с клэйда 1 на клэйд 3). Поскольку все обследованные пациенты проживали в г. Минске, представляет значительный интерес расширить географию исследований и изучить генотипический пейзаж вирусов *Varicella Zoster*, циркулирующих и в других регионах страны.

Заключение. С использованием ПЦР амплифицирован вирус от пациентов с различными клиническими формами инфекции: первичным инфицированием вирусом *Varicella Zoster*, ветряной оспой новорожденного, опоясывающим лишаем. Выполнено генотипирование 7 вирусов на основании идентификации точечных мутаций, локализующихся в трех областях генома. Все выявленные вирусы *Varicella Zoster* относились к клэйду 3 (или генотипу E2). Полученные результаты свидетельствуют об однородном генотипическом пейзаже и произошедшей в Республике Беларусь смене доминирующего генотипа вируса *Varicella Zoster* с клэйда 1, имевшего преимущественное распространение в конце 90-х – начале 2000-х годов, на клэйд 3.

Литература

1. Дронина, А. М. Тенденции в эпидемическом процессе ветряной оспы в условиях его естественного развития / А.М. Дронина, Т.С. Гузовская, Е.О. Самойлович // Мед. журн. – 2019. – № 4. – С. 53-57.

2. Management of varicella infection (chickenpox) in pregnancy / A. Shrim [et al.] // J. Obstet. Gynaecol. Canada. – 2012. – Vol. 34, No. 3. – P. 287-292.

3. WHO. Vaccine-preventable diseases surveillance standards. Varicella. – Last update: Sept. 5, 2018. – 12 p.

4. Revisiting the genotyping scheme for varicella-zoster viruses based on the whole-genome comparisons / N.J. Jensen [et al.] // J. Gen. Virol. – 2017. – Vol. 98. – P. 1434-1438.

5. Identification of five major and two minor genotypes of Varicella-Zoster virus strains: a practical two-amplicon approach used to genotype clinical isolates in Australia and New Zealand / V.N. Loparev [et al.] // J. Virol. – 2007. – Vol. 81, No. 23. – P. 12758-12765.

6. A proposal for a common nomenclature for viral clades that form the species varicella-zoster virus: summary of VZV Nomenclature Meeting 2008, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, 24-25 July 2008 / J. Breuer [et al.] // J. Gen. Virol. – 2010. – Vol. 91. – P. 821-828.

7. Distribution of varicella-zoster virus (VZV) wild-type genotypes in northern and southern Europe: evidence for high conservation of circulating genotypes / V.N. Loparev [et al.] // Virology. – 2009. – Vol. 383. – P. 216-225.

8. Schmidt-Chanasit, J. Evolution and world-wide distribution of varicella-zoster virus clades / J. Schmidt-Chanasit, A. Suuerbrei // Infect. Genet. Evol. – 2011. – Vol. 11. – P. 1-10.

9. Varicella-zoster virus circulating in Spain over two decades / I. Gonzalez [et al.] // J. Clin. Virol. – 2019. – Vol. 110. – P. 17-21.
10. Phylogenetic analysis of varicella-zoster virus: evidence of the intercontinental spread of genotypes and recombination / W. Barrett-Muir [et al.] // J. Virol. – 2002. – Vol. 76, No. 4. – P. 1971-1979.

MOLECULAR-GENETIC CHARACTERIZATION OF *VARICELLA-ZOSTER* VIRUS CIRCULATING IN MINSK DURING 2015-2020

Semeiko G.V., Guzovskaya T.S., Dronina A.M., Samoilovich E.O.

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

Using PCR *Varicella Zoster* virus was identified in patients with various clinical forms of infection: varicella, neonatal varicella, herpes zoster. Genotyping of 7 viruses was performed based on the identification of SNP localized in three regions of the genome (ORF21, 22, 50). Comparison of the obtained nucleotide sequences showed that they were identical in 6 viruses, only one had a substitution – A38262G. All identified *Varicella Zoster* viruses belonged to Clade 3 (or E2 genotype). These results indicate a homogeneous genotypic landscape of circulating viruses in Minsk during 2015-2020.

Keywords: chickenpox, *Varicella Zoster* virus, genotyping, Belarus.

Поступила 25.11.2020

ЕДИНИЧНЫЙ СЛУЧАЙ КРАСНУХИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2020 г.: КЛИНИЧЕСКАЯ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

[1]Семейко Г.В., [1]Самойлович Е.О., [2]Матиевская Н.В., [2]Кузнецова Е.В., [1]Ермолович М.А., [1]Свирчевская Е.Ю.

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

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

Резюме. Выполненное в 2020 г. (9 месяцев) лабораторное обследование 113 подозрительных на корь/краснуху пациентов позволило выявить 1 случай краснухи. Заболевший – студент, 21 г., из Республики Беларусь в течение инкубационного периода не выезжал. На основании эпидемиологических данных идентифицировать источник инфицирования не удалось. Выполненное секвенирование вариабельного участка E1 гена вируса краснухи, амплифицированного из клинического материала пациента, показало, что он относится к генотипу 2B. Проведенный филогенетический анализ установил, что выявленный в 2020 г. вирус генотипа 2B существенно на (2,44-4,19%) отличается от выявленных ранее (в 2014-2018 гг.) завозных вирусов этого же генотипа. На основании полученной характеристики вируса данный случай классифицирован как завозной (связанный с завозным вирусом). Низкая заболеваемость краснухой (менее 1 случая на млн за многолетний период) и результаты генотипирования вирусов подтверждают отсутствие эндемичной циркуляции вируса краснухи в Республике Беларусь.

Ключевые слова: краснуха, вирус краснухи, генотипирование, элиминация, Беларусь.

Введение. В последние годы краснуха относится к редким инфекционным заболеваниям в Республике Беларусь. Ежегодно регистрируются единичные завозные случаи этой инфекции или ни одного случая краснухи не регистрируется вовсе. Так, в 2014, 2015, 2017, 2018 гг. ежегодно выявлялись 1-2 завозных случая, в 2016 и 2019 гг. краснуха не регистрировалась вовсе. Данные по заболеваемости свидетельствуют об отсутствии эндемичной циркуляции вируса краснухи на территории страны [1].

Важные доказательства отсутствия эндемичной циркуляции вируса представляют и результаты его генотипирования. По результатам секвенирования и филогенетического анализа участка E1 гена вируса краснухи (739 н.о.), рекомендованного для генотипирования, выделяют 13 генотипов этого вируса: 10 генотипов в пределах клейда 1 (1a-1J) и 3 генотипа в пределах клейда 2 (2A-2C) [2].

В Республике Беларусь генотип вируса был установлен для всех выявленных в течение 2014-2018 гг. 5 завозных случаев краснухи. Четыре из них были вызваны вирусом, относящимся к клейду 2 (генотип 2B), один – к клейду 1 (генотип 1E).

В 2020 г., после 2 лет отсутствия регистрации краснухи (предыдущий случай был зарегистрирован в феврале 2018 г. у студента из Индии), заболевший краснухой был выявлен в г. Гродно.

Целью настоящего исследования было охарактеризовать данный случай клинико-эпидемиологически, провести генотипирование и филогенетический анализ вируса от заболевшего.

Материалы и методы исследования. Выявление подозрительных на краснуху пациентов и направление клинического материала на лабораторное исследование проводилось в соответствии с Санитарными нормами и правилами «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения кори и краснухи» от 26.12.2013,

№ 130. Лабораторное обследование выполнялось в Республиканской референс-лаборатории по кори и краснухе (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). В соответствии с рекомендациями ВОЗ все случаи, соответствующие стандартному определению случая кори и/или случая краснухи, были обследованы на наличие специфических IgM антител к обеим инфекциям [3].

Специфические антитела класса IgM определяли с использованием соответствующих иммуноферментных тест-систем производства Euroimmune (Германия), Вектор-БЕСТ (Российская Федерация), Диапроф-Мед (Украина).

Вирусную РНК выделяли из клинического материала (носоглоточный мазок, моча) с использованием набора «АртРНК MiniSpin» (АртБиоТех, Беларусь) [4].

Генотипирование вируса краснухи проводили на основании анализа нуклеотидной последовательности вариабельного участка E1 гена длиной 739 нуклеотидов. Поскольку участок для генотипирования является достаточно длинным, для получения необходимой нуклеотидной последовательности он разделен на два перекрывающихся фрагмента, которые амплифицировали с использованием описанной в инструкции методики [4]. Амплифицированные фрагменты кДНК вируса краснухи вырезали из геля, очищали с использованием набора «QIAEX II Gel Extraction Kit» (QIAGEN, Германия) и секвенировали в обоих направлениях с помощью набора «BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit» (Applied Biosystems, США) на капиллярном секвенаторе модели 3500 (Applied Biosystems, США).

Редактирование полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием лицензионного программного обеспечения SeqScape v.3.0 (Applied Biosystems, США), выравнивание – с помощью алгоритма Clustal W, встроенного в программу BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0. Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA версии 6 [5]. Эволюционные расстояния между последовательностями определяли на основании двухпараметрической модели эволюции Кимура. Достоверность топологий филограмм оценивали методом псевдореплик (анализировались 1000 псевдореплик).

Результаты исследования и их обсуждение. При обследовании в 2020 г. (январь-сентябрь) 113 пациентов, подозрительных на корь или краснуху, был выявлен единичный случай краснухи.

Заболевшим краснухой являлся мужчина 21 года из г. Гродно, студент. Из анамнеза заболевания установлено, что заболел остро вечером 01.03.2020, когда повысилась температура тела до 37,3ºС. На следующий день (02.03.2020) отмечено появление первых элементов пятнисто-папулезной сыпи на коже лица, шеи, грудной клетки на фоне нормотермии. С 03.03.2020 элементы сыпи распространились на кожу живота, спины, верхних конечностей; 04.03.2020 появились новые элементы на туловище и верхних конечностях. Пациент был осмотрен дерматологом, рекомендовано симптоматическое лечение (лоратадин, «болтушка» местно). Однако 05.03.2020 элементы сыпи появились на коже нижних конечностей. По направлению терапевта был доставлен медицинским транспортом в Гродненскую областную инфекционную клиническую больницу.

При детальном опросе пациента выяснено, что он проживает в студенческом общежитии, в ближайшем окружении (по месту проживания и учебы) все контактные лица были клинически здоровы. За пределы Республики Беларусь в течение инкубационного периода не выезжал. Приблизительно за две недели до заболевания навещал родителей, проживающих в Гомельской области, контакт с лицами с сыпью отрицает. На основании эпидемиологических данных идентифицировать предположительный источник инфицирования не удалось.

В приемном отделении инфекционной больницы выставлен предварительный диагноз: Корь? Пациент был госпитализирован в диагностическое отделение. Назначено

симптоматическое лечение, общеклинические лабораторные тесты. В общем анализе крови от 05.03.2020: лейкоциты 5,5 10*9/л; эритроциты 5,5; гемоглобин 161 г/л; СОЭ – 7 мм/час; гематокрит 45,4%; тромбоциты – 246; нейтрофилы палочкоядерные – 6%; нейтрофилы сегментоядерные – 62%; лимфоциты – 24%; моноциты – 8%.

С целью верификации диагноза биологический материал (мазок из носоглотки, моча, кровь от 06.03.2020) отправлен в Республиканскую лабораторию по диагностике кори и краснухи (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии).

После проведения лабораторной верификации диагноза корь/краснуха получены следующие результаты: сыворотка крови – IgM к вирусу кори не выявлены, носоглоточный мазок – РНК вируса кори не обнаружена, моча – РНК вируса кори не обнаружена; сыворотка крови – выявлены IgM к вирусу краснухи, носоглоточный мазок – РНК вируса краснухи не обнаружена, моча – обнаружена РНК вируса краснухи.

Выставлен окончательный диагноз: краснуха, типичная форма, легкой степени тяжести. Пациент выписан из стационара 09.03.2020 с выздоровлением.

Выполненное секвенирование вариабельного участка E1 гена длиной 739 нуклеотидов позволило установить, что данный вирус относится к генотипу 2B.

Сравнение нуклеотидных последовательностей четырех вирусов генотипа 2B, выявленных на территории Республики Беларусь в 2014-2020 гг., между собой выявило высокий уровень различий (1,76-4,19%), что свидетельствует о происхождении вирусов, завезенных в Республику Беларусь, из различных регионов мира, поскольку вирус краснухи характеризуется низкой изменчивостью.

Вирус RV-3373, выявленный в 2020 г., отличался на 2,44-4,19% от вирусов, завезенных из Польши, Китая и Индии в предыдущие годы. Поиск в базе данных GenBank и базе данных вирусов краснухи ВОЗ RubeNS показал отсутствие вирусов с индентичной RV-3373 нуклеотидной последовательностью.

Несмотря на существование 13 генотипов вируса краснухи, в настоящее время только 2 из них, 1E и 2B, имеют широкое географическое распространение, при этом генотип 2B встречается чаще. В частности, в Европейском регионе ВОЗ в 2018 г. на долю 2B приходилось 78,6% (11/14) генотипированных вирусов краснухи, в 2019 г. – 54,5% (6/11) [6, 7]. Такая ситуация, когда большая часть выявленных в разных странах мира вирусов относится к одному генотипу, создает значительные сложности с определением географического происхождения. Rivailler P. с соавт. разработали более детальную классификацию вирусов генотипа 2B с выделением 5 генетических линий (L0-L4) с учетом генетического разнообразия и географического положения [8]. Выполненный анализ филогенетических взаимоотношений, выявленных в Республике Беларусь вирусов краснухи, а также вирусов из базы данных GenBank с использованием данного подхода показал, что вирус RV-3373 наряду с вирусом RV-1985 (выявленный в 2018 г. от завозного случая из Индии) относились к генетической сублинии 2B-L2c [8, 9] (рисунок). Вирусы этой сублинии в настоящее время циркулируют в странах Африки, Азии и некоторых странах Европы. В частности, RV-3373 кластеризовался с вирусами, распространенными в 2012-2015 гг. в странах Центральной и Восточной Африки (Демократической Республики Конго, Уганде, Бурунди) (уровень различий составлял 0,95-1,22%, достоверности топологии 74) [9, 10]. С другими референс-штаммами сублинии 2B-L2c уровень различий составлял 1,5% и выше. Вирус RV-1985, принадлежащий также сублинии 2B-L2c, кластеризовался высоким уровнем достоверности (93) с вирусами, выявлявшимися именно в этой стране на протяжении 2010-2017 гг. Таким образом, полученные результаты молекулярно-генетического анализа вируса краснухи свидетельствуют о его принадлежности генотипу 2B, генетической сублинии L2c, и наиболее вероятном происхождении из Центрально-Африканского региона. Дальнейшего распространения в Республики Беларусь вирус краснухи не получил.

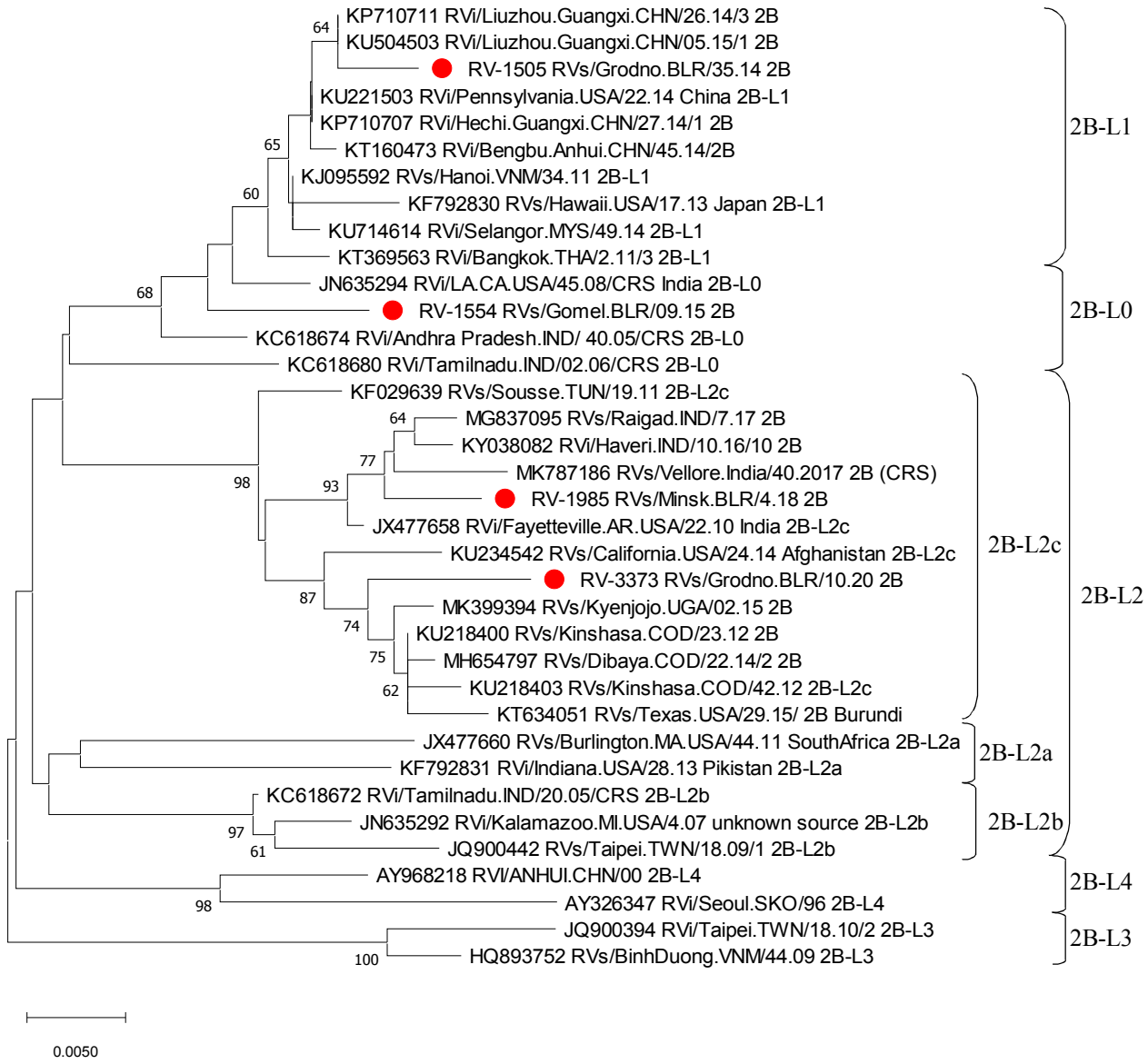


Рисунок. – Дендрограмма на основе анализа фрагмента E1 гена вирусов краснухи (739 н.о.) генотипа 2B, выявленных в Беларуси (●), референс-штаммов генетических линий L0-L4 и вирусов из базы данных GenBank. Построено с использованием алгоритма максимального правдоподобия, 3-параметрической модели Тамура-Ней, анализируя 1000 псевдореплик

Нуклеотидная последовательность вируса депонирована в Международную базу данных GenBank – код доступа MT463288.

Таким образом, после отсутствия случаев краснухи в Республике Беларусь на протяжении 24 месяцев в марте 2020 г. заболевший краснухой был выявлен в г. Гродно. Лабораторное подтверждение диагноза краснуха было получено выявлением IgM антител к краснухе и обнаружением РНК вируса краснухи в клиническом материале. Выполненное секвенирование вариабельного участка E1 гена показало, что данный вирус относится к генотипу 2B. Проведенный филогенетический анализ показал, что выявленный в 2020 г. вирус генотипа 2B существенно на (2,44-4,19%) отличается от выявленных ранее (в 2014-2018 гг.) завозных вирусов краснухи этого же генотипа. Несмотря на отсутствие эпидемиологических данных, подтверждающих завозной характер инфицирования, по-

лученная характеристика вируса позволила классифицировать данный случай как завозной (связанный с завозным вирусом). Низкая заболеваемость краснухой (менее 1 случая на млн за многолетний период) и результаты генотипирования вирусов подтверждают отсутствие эндемичной циркуляции вируса краснухи в Республике Беларусь.

Литература

1. Краснуха в Республике Беларусь в 2016-2019 гг. / Г.В. Семейко, Е.О. Самойлович, М.А. Ермолович, Е.Ю. Свирчевская // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В.А. Горбунова. — Минск: СтройМедиаПроект, 2019. — Вып. 12. – С. 74-77.
2. Rubella virus nomenclature update: 2013 // Wkly. Epidemiol. Rec. – 2013. – Vol. 88, No. 32. – P. 337-343.
3. Manual for the laboratory-based surveillance of measles, rubella and congenital rubella syndrome. – 3rd ed., June 2018 [Electronic resource]. – Mode of access: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/laboratory/manual/en/. – Date of access: 20.10.2020.
4. Методы лабораторной диагностики кори и краснухи и генотипирования возбудителей: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 19.12.2018, № 022-1118 [Электронный ресурс] / авт.-разраб.: Г.В. Семейко, Е.Ю. Свирчевская, М.А. Ермолович, Е.О. Самойлович. – Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2018. – 18 с. – Режим доступа: http://www.belriem.by/images/docs/instruction_main/022-1118_16.12.2018.pdf. – Дата доступа: 20.10.2020.
5. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2013. – Vol. 30, No. 12. – P. 2725-2729.
6. World Health Organization Regional Office for Europe. WHO EpiBrief. – 2019. – No. 1. – P. 1-9.
7. World Health Organization Regional Office for Europe. WHO EpiBrief. – 2020. – No. 1. – P. 1-11.
8. Rivailler, P. Genetic diversity of currently circulating rubella viruses: a need to define more precise viral groups / P. Rivailler, E. Abernathy, J. Icenogle // J. Gen. Virol. – 2017. – Vol. 98. – P. 396-404.
9. Use of FTA cards to transport throat swabs and oral fluid samples for molecular detection and genotyping of measles and rubella viruses / B. Benkamp [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2019. – Vol. 57, No. 5. – e00048-19.
10. Descriptive epidemiology of rubella disease and associated virus strains in Uganda / Ph. Tushabe [et al] // J. Med. Virol. – 2020. – Vol. 92, No. 3. – P. 279-287.

A SINGLE CASE OF RUBELLA IN THE REPUBLIC OF BELARUS IN 2020: CLINICAL AND VIROLOGICAL CHARACTERISTICS

[1]Semeiko G.V., [1]Samoilovich E.O., [2]Matievskaya N.V., [2]Kuznetsova E.V., [1]Yermalovich M.A., [1]Svirchevskaya E.Yu.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

[2]Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Laboratory examination of 113 measles/rubella-suspected patients carried out in 2020 (9 months) revealed 1 rubella case. The sick person was a student, 21 years old, did not leave the country during the incubation period. Sequencing of the variable region of E1 gene of the rubella virus from the patient showed that it belongs to genotype 2B. Phylogenetic analysis showed that the virus of genotype 2B detected in 2020 differs significantly (2.44-4.19%) from the imported viruses of the same genotype detected earlier (in 2014-2018). Based on the obtained characteristics of the virus, this case was classified as imported (associated with an imported virus). The low incidence of rubella (less than 1 case per million over a long-term period) and the results of virus genotyping confirm the absence of endemic rubella virus circulation in the Republic of Belarus.

Keywords: rubella, rubella virus, genotyping, elimination, Belarus.

Поступила 03.11.2020

ВЫЯВЛЕНИЕ ХРОМОСОМНО-ИНТЕГРИРОВАННОЙ ФОРМЫ ВГЧ-6А/В У ДЕТЕЙ НА ФОНЕ КЛИНИЧЕСКИ ПОДОЗРЕВАЕМОЙ РОЗЕОЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

[1]Шилова Ю.А., [1]Амвросьева Т.В., [1]Поклонская Н.В., [1]Аринович А.С., [2]Дивакова Е.В., [3]Кишкурно Е.П.

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

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

[3]Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Вирус герпеса человека 6 А/В типа может вызывать активную и латентную инфекции. Одним из факторов, позволяющих этому вирусу существовать в организме в латентной форме, является его способность интегрировать его геном в хромосомы человека. Люди с унаследованной хромосом-интегрированной формой ВГЧ-6А/В (хиВГЧ-6А/В) инфекции несут одну интегрированную копию генома ВГЧ-6А/В на соматическую клетку. В образцах крови таких людей ДНК вируса может обнаруживаться в высокой концентрации при отсутствии активной инфекции, что может привести к напрасному назначению противогерпетических препаратов. Для установления хиВГЧ-6А/В инфекции была проведена количественная детекция ДНК ВГЧ-6А/В в образцах крови, а для пациентов с её постоянно высоким уровнем – исследование образцов волос и ногтей, которое позволило подтвердить хиВГЧ-6А/В инфекцию у двух пациентов

Ключевые слова: вирус герпеса человека 6 А/В типа, хромосом-интегрированная форма вируса герпеса человека 6 А/В типа, трансплантология.

Введение. Диагноз классической первичной инфекции ВГЧ-6А/В, которая, как правило, не требует лечения, обычно основывается на оценке клинических проявлений. В то же время, верификация возбудителя необходима при развитии тяжелых клинических форм. В этом случае прогноз заболевания зависит от своевременно назначенного адекватного лечения. Подтверждение ВГЧ-6А/В как этиологического фактора осложнено высокой серопревалентностью у людей старше трех лет, наличием ДНК вирусов после первичного инфицирования в восприимчивых клетках и тканях [1], возможностью интеграции ДНК ВГЧ-6А/В в хромосомы [2]. Кроме того, бессимптомная реактивация ВГЧ-6А/В может происходить у здоровых детей, а также на фоне приема некоторых лекарственных средств, в том числе антиконвульсантов, перечень которых постоянно расширяется. Использующиеся на сегодняшний день в мире новейшие методы лабораторной диагностики (ПЦР в реальном времени и с обратной транскрипцией) позволяют установить наличие репликации ВГЧ-6А/В. Для установления активной формы инфекции необходима оценка количественных показателей уровней вирусной нагрузки. В некоторых случаях для доказательства этиологической роли ВГЧ-6А/В и определения времени заражения (например, острая первичная инфекция, реактивация или реинфекция) необходимо использование комбинации лабораторных тестов [3].

Согласно ранее полученным данным зарубежных исследователей, указанием на активную розеоловирусную инфекцию является обнаружение ДНК ВГЧ-6А/В в сыворотке в концентрации более 1000 геномных эквивалентов (ГЭ) на мл, либо более 100 ГЭ на 10^5 клеток при условии, что количество лейкоцитов находится в пределах нормы [4, 5].

Примерно у 1-5% человеческой популяции обнаруживается хромосомно-интегрированная форма ВГЧ-6А/В (хиВГЧ-6А/В), при этом развивается особая форма

инфекции, характеризующаяся необычно высокой вирусной нагрузкой в крови и других тканях организма [4, 5]. Имеются данные о том, что хромосомно-интегрированные ВГЧ-6А/В вирусы способны реактивироваться и могут вызывать тяжелые заболевания ЦНС, включая энцефалит [6] и энцефаломиелит [7]. Хромосомно-интегрированная форма ВГЧ-6А/В может передаваться потомству путем встраивания в ДНК гамет [4, 5]. Врожденная инфекция часто протекает бессимптомно, однако впоследствии возможно развитие нарушений нейропсихического развития, в частности, когнитивных нарушений к возрасту 12 месяцев [8].

Целью настоящего исследования было выявление хромосомно-интегрированной формы ВГЧ-6А/В у детей на фоне клинически подозреваемой розеоловирусной инфекции.

Материалы и методы исследования. Для исследования использовали биологический материал (сыворотку крови, клетки крови, волосы и ногти), полученный от пациентов ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». Всего было исследовано 561 образец биологического материала от 75 пациентов.

Выделение ДНК из образцов сыворотки крови, клеток крови проводилось с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» («Амплисенс», Россия), из образцов волос и ногтей – с помощью реагентов для очистки ДНК «АртДНК MiniSpin Эксперт» («АртБиоТех», Беларусь). Детекция в исследуемом биологическом материале ДНК ВГЧ-6А/В осуществлялось с помощью набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса (CMV) и вируса герпеса 6 типа (HHV6) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени "АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL"(Россия) согласно инструкции производителя.

Результаты исследования и их обсуждение. Как показано зарубежными исследователями, определение уровня вирусной нагрузки ВГЧ-6А/В в пробах в цельной крови/клетках крови необходимо для установления формы инфекции ВГЧ-6А/В [4, 5]. На первом этапе исследований проводили количественную детекцию ВГЧ-6А/В в образцах сыворотки и клеток крови. В сыворотке крови ДНК ВГЧ-6А/В была детектирована у 31,82% пациентов. Доля пациентов, у которых концентрация ДНК ВГЧ-6А/В превышала 1000 копий ГЭ/мл составила 16,44% (N=73) У 6 из них (9,23%) ДНК ВГЧ-6А/В постоянно присутствовала в концентрациях, указывающих на активную инфекцию: более 1000 ГЭ/мл цельной крови и/или более 100 ГЭ/10^5 клеток. У троих пациентов в разное время концентрация ДНК ВГЧ-6А/В в сыворотке/цельной крови существенно варьировала – определяемые уровни указывали как на активный (>1000 ГЭ/мл), так и на латентный (<1000 ГЭ/мл) характер инфекции. При этом концентрация ДНК ВГЧ-6А/В в клетках крови у этих пациентов свидетельствовала об активном инфекционном процессе (>100 ГЭ/10^5 клеток), причем у двоих она была чрезвычайно высокой (≈5 lg/10^5 клеток), позволяющей предположить хи-ВГЧ-6А/В.

Как указывалось выше, при хи-ВГЧ-6А/В форме инфекции концентрация ДНК в цельной крови превышает 5 lg копий ДНК/мл, при расчете на клетки крови – 5,5 lg копий ДНК/10^5 клеток, и определяется постоянно вне зависимости от проведения противовирусного лечения [4]. Среди 13 пациентов, у которых концентрация ДНК ВГЧ-6А/В в образцах крови свидетельствовала о наличие активной формы ВГЧ-6А/В инфекции, только у двух вирусная ДНК выявлялась при каждом исследовании образцов. У пациента № 1 отбор биологического материала проводился 7 раз на протяжении 1 года. В клетках крови концентрация ДНК ВГЧ-6А/В варьировала в пределах 4,6-5,2 lg копий ДНК/10^5 клеток. У пациента № 2 для исследования были доступны 2 образца клеток

крови, отобранных с разницей в полгода, в которых ДНК ВГЧ-6А/В определялась в концентрации 5,2 lg копий/10^5 клеток. Полученные на протяжении длительного времени повторные высокие значения концентрации ДНК ВГЧ-6А/В в клетках крови этих пациентов явились основанием для проведения дополнительных исследований по выявлению у них хи-ВГЧ-6А/В.

Для установления хи-ВГЧ-6А/В инфекции в мировой практике используют несколько подходов: первый – капельная ПЦР (Droplet digital PCR), которая позволяет установить точное соотношение количества копий ДНК вируса и человека в образце [4]. Второй подход основан на обнаружении ДНК ВГЧ-6А/В в биологических образцах, в которых даже при активной форме инфекции этого вируса, его генетический материал в норме не обнаруживается, например, волосяные луковицы и ногти пациента [9]. Для подтверждения наличия хи-ВГЧ-6А/В у обследуемых пациентов № 1 и № 2 были исследованы образцы их волос и ногтей. У пациента № 1 в образцах волос и ногтей содержание ДНК ВГЧ-6А/В составило 5,1 и 5,3 lg копий/10^5 клеток, соответственно. Для пациента № 2 данный показатель составил в 4,9 lg копий ДНК/10^5 клеток в образцах, как волос, так и ногтей. Полученные данные подтверждают наличие у этих пациентов хи-ВГЧ-6А/В формы инфекции.

Следует отметить, что в сыворотке крови пациента № 1 концентрация ДНК ВГЧ-6А/В составляла от 150 до 2513 копий/мл (средняя 1042 ГЭ/мл, медиана 859 ГЭ/мл), а у пациента № 2 – 774 и 4392 копии/мл. Высокие показатели содержания генома ВГЧ-6А/В в сыворотке крови у людей с хи-ВГЧ-6А/В могут объясняться попаданием генома из клеток крови в сыворотку при их разрушении [9]. В таких случаях результаты диагностики, основанные только на анализе сывороток крови, без учета данного показателя в клетках крови, могут приводить к ошибочному заключению об активной форме ВГЧ-6А/В инфекции.

Заключение. Исследования по выявлению концентрации ДНК ВГЧ-6А/В в образцах крови являются важным этапом дифференциальной диагностики розеоловирусной инфекции, позволяющим выявить пациентов с высокой вирусной нагрузкой (более 5 lg копий/10^5 клеток). В отношении этих пациентов необходимо проведение дальнейшего количественного ПЦР анализа волос и ногтей для подтверждения или опровержения наличия у них хи-ВГЧ-6А/В формы инфекции. В настоящей работе такое подтверждение было получено для 2 пациентов с клинически подозреваемой розеоловирусной инфекцией на фоне регистрируемых у них стабильно высоких количественных показателей ДНК ВГЧ-6А/В.

Литература

1. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation / C.B. Hall [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1994. – Vol. 331, No. 7. – P. 432-438.

2. Diagnostic assays for active infection with human herpesvirus 6 (HHV-6) / M.T. Caserta [et al.] // J. Clin. Virol. – 2010. – Vol. 48, № 1. – P. 55-57.

3. Agut, H. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections / H. Agut, P. Bonnafous, A. Gautheret-Dejean // Clin. Microbiol. Rev. – 2015. – Vol. 28, No. 2. – P. 313-335.

4. Identification of chromosomally integrated human herpesvirus 6 by droplet digital PCR / R.H. Sedlak [et al.] // Clin. Chem. – 2014. – Vol. 60. – P. 765-772.

5. Human herpes virus-6 DNA in cerebrospinal fluid of children undergoing therapy for acute leukaemia / B. Wittekindt [et al.] // Brit. J. Haematol. – 2009. – Vol. 145, No. 4. – P. 542-545.

6. Severe encephalomyelitis in an immunocompetent adult with chromosomally integrated human herpesvirus 6 and clinical response to treatment with Foscarnet plus Ganciclovir / S.B. Troy [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 47, No. 12. – P. e93-e96.
7. Congenital infections with human herpesvirus 6 (HHV6) and human herpesvirus 7 (HHV7) / C.B. Hall [et al.] // J. Pediatr. – 2004. – Vol. 145, No. 4. – P. 472-477.
8. De Bolle, L. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy / L. De Bolle, L. Naesens, E. De Clercq // CMR. – 2005. – Vol. 18, No. 1. – P. 217-245.
9. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles / K.N. Ward [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, No. 4. – P. 1571-1574.

DETECTION OF THE CHROMOSOM-INTEGRATED HHV-6A/B IN CHILDREN WITH CLINICALLY SUSPECTED ROSEOLOVIRUS INFECTION

[1]Shilova Yu.A., [1]Amvrosieva T.V., [1]Paklonskaya N.V., [1]Arinovich A.S., [2]Divakova E.V., [3]Kishkurno E.P.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus
[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[3]Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Human herpesvirus type 6 A/B (HHV-6A/B) can cause active and latent infections. One of the factors that allows this virus to exist in the body in a latent form is its ability to integrate its genome into human chromosomes. People with inherited chromosome-integrated form of HHV-6A/B (ici-HHV-6A/B) infections carry one integrated copy of the genome HHV-6A/B per somatic cell. In blood samples from these people, the DNA of the virus can be detected in high concentrations in the absence of active infection, which can lead to unnecessary prescriptions. To establish ici-HHV-6A/B infection, quantitative detection of HHV-6A/B DNA in blood samples was carried out, and for patients with its constantly high level, a study of hair and nails was carried out, which made it possible to confirm ici-HHV-6A/B infection in two patients

Keywords: human herpesvirus 6 A/B, inherited chromosome-integrated form of human herpesvirus 6 A/B, transplantology.

Поступила 21.10.2020

ИММУНОЛОГИЯ

Оригинальные исследования

COVID-19 И ПОСТИНФЕКЦИОННЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ

[1]Амвросьева Т.В., [1]Поклонская Н.В., [1]Богуш З.Ф., [1]Казинец О.Н., [1]Бельская И.В., [1]Колтунова Ю.Б., [1]Шилова Ю.А., [2]Анисько Л.А., [2]Рогачева Т.А.

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

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

Резюме. Крупнейшая пандемия, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, диктует необходимость проведения системных исследований по изучению механизмов и особенностей формирования гуморального иммунитета при COVID-19. В настоящей работе проанализированы накопленные мировой наукой и практикой данные по проблеме гуморального иммунного ответа на новый возбудитель. Изложены результаты собственных серодиагностических исследований, полученных при обследовании 2329 человек на территории Минского региона в период с апреля 2020 г. по настоящее время. Установлена кинетика иммунного ответа и серопревалентность у пациентов с COVID-19 (IgM – 29,3%, IgG – 74,7%), контактных лиц (IgM – 13,3%, IgG – 13,3%), лиц, не зарегистрированных, как переболевшие данной инфекцией (IgM – 3,0%, IgG – 18,4%), и в группе медицинских работников (IgM – 2,6%, IgG – 25%). Полученные результаты имеют высокую актуальность в связи с продолжающимся глобальным ростом заболеваемости COVID-19 и будут продолжены в масштабе страны.

Ключевые слова: коронавирус SARS-CoV-2, гуморальный иммунитет, иммуноглобулины M, G.

Введение. Новый коронавирус SARS-CoV-2 впервые был зарегистрирован во время вспышки тяжелого респираторного заболевания в китайском городе Ухань в конце 2019 г., впоследствии распространился на все страны и континенты и вызвал пандемию COVID-19 – крупнейшую за последние десятилетия. На октябрь 2020 г. в мире насчитывалось более 37 млн. зараженных, больше 1 млн. человек умерло.

Коронавирус SARS-CoV-2 принадлежит к роду бета-коронавирус в составе семейства *Coronaviridae*. Он имеет 79,6% сходства нуклеотидной последовательности с коронавирусом SARS-CoV и 96% сходства с коронавирусом летучих мышей, что указывает на его зоонозное происхождение [1, 2].

Коронавирус SARS-CoV-2 – оболочечный, РНК-содержащий вирус, геном представлен одноцепочечной (+)РНК, кодирующей 25 белков, включающих 4 основных структурных белка – белки шипа (S), оболочки (E), мембраны (M) и нуклеокапсида (N). Вирусный белок шипа S играет основную роль в связывании с рецептором ACE2 и проникновении вируса в клетку [3]. После репликации в клетке и выхода вирусного потомства часть вирионов захватывается и процессируется антиген-презентирующими клетками (АПК) – макрофагами, дендритными клетками. Затем антигены презентируются Т-хелперам, которые инициируют активацию В-лимфоцитов. Активированные В-лимфоциты пролиферируют и дифференцируются в В-лимфоциты плазмы, или В-лимфоциты памяти, несущие высокоаффинные рецепторы к антигенам SARS-CoV-2. В-лимфоциты плазмы продуцируют IgM, IgG, IgA антитела к N- и S-белкам вируса, часть

из которых нейтрализует вирус и предотвращают его дальнейшее распространение. Антитела защищают хозяина, связываясь со специфическими белками-антигенами на поверхности вируса и препятствуя его проникновению в клетку, или облегчая его распознавание и уничтожение фагоцитирующими клетками иммунной системы. Механизмы и динамика образования антител к SARS-CoV-2 в настоящее время продолжают оставаться предметом изучения.

Результаты, полученные различными исследователями, по выявлению РНК SARS-CoV-2 и основных классов антител к вирусу при COVID-19, свидетельствуют о том, что вирусная РНК, как правило, обнаруживается вплоть до 14 дня от начала заболевания [4, 5]. Ранний иммунный ответ – IgM к SARS-CoV-2 могут быть выявлены с 3 дня от начала заболевания, достигают пика между 2 и 3 неделями [6, 7] и сохраняются в течение минимум 1 месяца от начала заболевания [8]. Характерной особенностью кинетики сероконверсии при COVID-19 является практически одновременное образование всех основных классов антител. Так, IgG, IgA могут быть выявлены параллельно с IgM начиная с 4 суток, а максимальная частота их обнаружения регистрируется спустя 2 недели от начала заболевания [9].

В Республике Беларусь работы по изучению гуморального иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2 только начинают разворачиваться. Проведенные нами на ограниченной выборке пациентов с COVID-19 исследования кинетики сероконверсии (n=45) свидетельствовали о том, что на 0-6 сутки от начала заболевания суммарные антитела обнаруживались у 10% пациентов. В период с 7 по 11 сутки IgM и IgG выявлялись уже у 71,4% заболевших, а после 16 суток доля IgG серопозитивных достигала 100%, тогда как частота выявления IgM снижалась до 62,5%.

Следует отметить, что в условиях продолжающейся пандемии COVID-19 серопревалентность к возбудителю изучается в различных группах населения достаточно широко. Создан специальный интернет-ресурс SeroTracker, на котором аккумулируются накопленные в разных странах данные [10]. На сегодняшний день там представлены результаты исследований из 22 стран, в том числе, Канады, США, Бразилии, Нигерии, Кении, Малави, Ирана, Иордании, Китая, Испании, Франции, Италии, Великобритании, Нидерландов, Бельгии, Австрии, Венгрии, Румынии, Германии, Швейцарии, Швеции, Дании. Они достаточно сильно различаются в зависимости от обследуемого контингента, его количественного и качественного состава, используемых методов исследований (таблица 1).

Таблица 1. – Серопревалентность к SARS-CoV-2 по данным SeroTracker

Страна	*Количество проведенных исследований*	*Число обследованных*	*Доля серопозитивных к SARS-CoV-2*	*Характеристика обследованных*
США	217	1 858 960	0-29,2%	
Италия	1	904	0,99%	Доноры крови
Франция	12	5 734	1,32-4,12%	Доноры крови
Испания	74	1 018 251	2,7-37,4%	Общая популяция
Бельгия	5	16 532	2,9-6,9%	Общая популяция
Великобритания	31	17 228	0-6,7%	Общая популяция
Китай	1	10 449	0,8%	Общая популяция

В России изучение серопревалентности проведено в 27 субъектах, охвачено более 70 тысяч человек. Установлено, что иммунитет к коронавирусу имели от 24 до 26% протестированных россиян. Наиболее высокий уровень серопревалентности был заре-

гистрирован в 4 российских регионах: Татарии (31,5%), Санкт-Петербурге (26%,1), Тульской (27,5%) и Тюменской (24,5%) областях. Исследования, проведенные в различных округах Москвы, позволили выявить 11,2-13,6% серопозитивных лиц.

Научно-исследовательские работы по изучению показателей гуморального иммунитета осуществляются нами на территории Минского региона с апреля 2020 г. по настоящее время. Проведено серологическое тестирование 2329 человек, в том числе, 594 пациента с лабораторно подтвержденным диагнозом COVID-19 и 1207 лиц, которые не были зарегистрированы как переболевшие. Всего методом ИФА на предмет обнаружения основных классов антител к коронавирусу SARS-CoV-2 исследовано 2834 сыворотки крови.

В таблице 2 представлены результаты детекции антивирусных IgM, IgG и суммарных антител (IgM, IgG, IgA) в сыворотках крови различных групп населения. Наиболее высокий уровень серопревалентности (74,7% по IgG) выявлен у пациентов, которые в это время находились на лечении в инфекционном стационаре с подтвержденным диагнозом COVID-19 (средне-тяжелая и тяжелая форма). При этом доля серопозитивных среди контактов 1 уровня была относительно невысокой (13,3%).

Таблица 2. – Результаты оценки серопревалентности в различных группах населения

Группа обследованных лиц	*Количество обследованных*	*Доля IgM-позитивных, %*	*Доля IgG-позитивных, %*	*Доля IgM+IgG позитивных, %*
Пациенты с COVID-19	474	29,3	74,7	20,4
Контактные лица 1 уровня	15	13,3	13,3	8,3
Пациенты с ОРИ, ОРВИ неустановленной этиологии	33	11,8	23,5	6,6
Лица, не зарегистрированные, как переболевшие COVID-19	1084	3,0	18,4	0,9

Неожиданными оказались результаты серологического обследования пациентов с ОРИ, ОРВИ неустановленной этиологии и лиц, не зарегистрированных, как переболевшие COVID-19. Частота выявления антиSARS-CoV-2 IgG в этих группах составила 23,5% и 18,4%, а IgM – 11,8% и 3,0% соответственно. Полученные данные, свидетельствуют о произошедшем контакте выявленных серопозитивных лиц с возбудителем и указывают на наличие скрытой, нерегистрируемой заболеваемости COVID-19, которая может протекать под маской других респираторных инфекций или бессимптомно.

Изучение показателей серопревалентности в разных возрастных группах лиц, не зарегистрированных, как переболевшие COVID-19 (сформирована методом простой случайной выборки), показало, что среди людей в возрасте 18-34 года IgG к SARS-CoV-2 были обнаружены у 12,5%, 35-49 лет – у 14,6%, 50-65 лет – у 10,9%, старше 65 лет – у 41,2%.

Очевидно, что максимальные значения серопревалентности будут регистрироваться либо в регионах, наиболее пострадавших во время пандемии, либо в группах населения, для которых риск заражения максимален. К таким группам, в первую очередь, относятся медицинские работники, которые непосредственно контактируют с за-

болевшими в силу своей профессиональной деятельности. По данным многочисленных зарубежных исследований на эту тему серопревалентность среди медицинских работников может варьировать в достаточно широких пределах – от 1,3% в Австрии до 33% в США (таблица 3).

Таблица 3. – Результаты оценки серопревалентности к SARS-CoV-2 среди медработников разных стран по данным SeroTracker

Страна	***Количество обследованных***	***Результат, %***
Швеция	2149	19,1
Испания	578	9,3
Италия	3985	13,1
Австрия	235	1,3
Франция	85	5,9
Германия	316	1,6
Румыния	371	2,96
Великобритания	516	24,4
США	285	33
Китай	797	4,4

По результатам проведенных нами исследований по детекции антител к SARS-CoV-2 у медицинских работников (n=144), имевших контакт с пациентами с COVID-19, IgM выявлялись у 2,6% из них, IgG – у 25,0%.

Для оценки напряженности специфического иммунитета к SARS-CoV-2 в разных группах пациентов был проведен сравнительный анализ значений коэффициента позитивности (КП), который определялся как отношение значения показателя оптической плотности (ПОП) исследуемой сыворотки к граничному значению ПОП для положительного результата. Установлено, что среднее значение КП для IgG у пациентов со средне-тяжелым и тяжелым течением (n=147) достигало 7,73±0,52, тогда как у пациентов с легким и бессимптомным течением(n=66) оно составило 2,2±0,19 ($p<0,0001$). Среди пациентов с легким и бессимптомным течением преобладали низкие значения КП. Так, в этой группе КП менее 3 регистрировался у 83,3%обследованных, тогда как в группе со средне-тяжелым и тяжелым течением COVID-19 значения КП преимущественно были высокими: КП>3 регистрировался у 68,7% пациентов. Эти результаты совпадают с данными других исследователей, свидетельствующих о том, что напряженность иммунного ответа была тем выше, чем тяжелее протекала инфекция [11].

Заключение. Накопленный на сегодняшний день мировой и отечественный опыт изучения характеристик и особенностей формирования гуморального иммунитета при COVID-19, позволяет сделать первые выводы:

- кинетика сероконверсии в условиях заболеваемости данной инфекцией характеризуется практически одновременным (или с интервалом в несколько дней) появлением основных классов антител к возбудителю;

- сроки и последовательность образования разных противовирусных иммуноглобулинов часто носят индивидуальный характер и зависят от общего иммунного статуса организма, дозы заражения, тяжести течения инфекции;

- у части населения COVID-19 может протекать под маской других респираторных инфекций или бессимптомно с образованием постинфекционного гуморального иммунитета к возбудителю;

- показатели напряженности иммунитета у тяжело переболевших пациентов выше, чем у лиц, которые перенесли инфекцию бессимптомно или в легкой форме;

- во время первой волны пандемической заболеваемости уровень серопревалентности к коронавирусу SARS-CoV-2 среди медицинских работников в большинстве стран мира оказался достаточно высоким, что указывает на значительный процент переболевших инфекцией в той или иной форме.

Несмотря на имеющиеся сегодня успехи в изучении гуморального иммунного ответа при COVID-19, ряд вопросов, касающихся механизмов образования противовирусных антител и их характеристик, остается открытым. Особую актуальность имеют исследования по изучению защитной функции антиSARS-CoV-2 иммуноглобулинов разных классов и длительности их циркуляции в крови переболевших. Несомненный интерес представляют исследования как по изучению популяционного иммунитета к новому коронавирусу в масштабах страны, так и в разрезе отдельных групп населения, что позволит проанализировать и оценить последствия пандемического его распространения для выработки адекватной стратегии и тактики сдерживания и профилактики заболеваемости.

Литература

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 / Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses // Nat. Microbiol. – 2020. – Vol. 5, No. 4. – P. 536-544.

2. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding / R. Lu [et al.] // Lancet. – 2020. – Vol. 395, No. 10224. – P. 565-574.

3. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis / Y. Chen [et al.] // J. Med. Virol. – 2020. – Vol. 92, No. 4. – P. 418-423.

4. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples / Y. Pan [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2020. – Vol. 20, No. 4. – P. 411-412.

5. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients / L. Zou [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2020. – Vol. 382, No. 12. – P. 1177-1179.

6. Antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: the perspective application of serological tests in clinical practice / Q.X. Long [et al.] // MedRxiv. – 2020. doi: 10.1101/2020.03.18.20038018

7. Immune phenotyping based on neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19 / B. Zhang [et al.] // Front. Mol. Biosci. – 2020. – Vol. 7. – P. 157. doi: 10.3389/fmolb.2020.00157

8. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans / F. Amanat [et al.] // MedRxiv. – 2020. doi: 10.1101/2020.03.17.20037713

9. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients / N.M.A. Okba [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2020. – Vol. 26, No. 7. – P. 1478-1488.

10. SeroTracker: a global SARS-CoV-2 seroprevalence dashboard / R.K. Arora [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2020. doi: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30631-9

11. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with differing severities of coronavirus disease 2019 / E. Kowitdamrong [et al.] // PLoS ONE. – 2020. – Vol. 15, No. 10. – e0240502. doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0240502.

COVID-19 and POST-INFECTIOUS HUMORAL RESPONSE

[1]Amvrosieva T.V., [1]Paklonskaya N.V., [1]Bogush Z.F., [1]Kazinets O.N., [1]Belskaya I.V., [1]Koltunova Yu.B., [1]Shilova Yu.A., [2]Anisko L.A., [2]Rogacheva T.A.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus
[2]City Clinical Infectious Diseases Hospital, Minsk, Republic of Belarus

The largest pandemic caused by the new coronavirus SARS-CoV-2 requires the large-scale research of the mechanisms and features of the formation of humoral immune response in COVID-19 patients.

This work analyzes the data accumulated by the world science on the problem of humoral immune response to a new pathogen and the results of our own studies of humoral immunity investigation in 2329 people in the Minsk region since April 2020 to the present day. The kinetics of the immune response and seroprevalence of antibodies to SARS-CoV-2 were established in patients with COVID-19 (IgM – 29.3%, IgG – 74.7%), contact persons (IgM – 13.3%, IgG – 13.3%), in those who were not registered as positive (IgM – 3.0%, IgG – 18.4%), and in the group of medical workers (IgM – 2.6%, IgG – 25%).

The results obtained are highly relevant due to the ongoing global increase in the incidence of COVID-19 and the research will be continued nationwide.

Keywords: SARS-CoV-2 coronavirus, humoral immunity, immunoglobulins M, G.

Получена 15.10.2020

ПАТОГНОМОНИЧНЫЕ МАРКЕРЫ РЕНАЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ НЕФРОПАТИЯХ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Асташонок А.Н., Полещук Н.Н.

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

Резюме. Проведен электронно-микроскопический анализ нефробиоптатов, полученных за период 2018-2020 гг. от 94 детей (возраст – от 7 месяцев до 16 лет) с различными заболеваниями почки. Охарактеризованы изменения коркового (гломерулярной базальной мембраны, мезангия, подоцитов), мозгового (эпителиоцитов канальцев) вещества почки. Определена степень вовлеченности различных структур (мезангиального матрикса, эндотелиальной выстилки капилляров) и органелл (митохондрий, промежуточных филаментов гломерулярной базальной мембраны, гранулярного эндоплазматического ретикулума подоцитов и канальцевого эпителия) в патогенез, что позволило уточнить тип гломерулярного повреждения ткани почки. Полученные результаты актуальны для определения прогноза заболевания, темпов прогрессирования хронических деструктивных процессов ренальной ткани и выбора на этом основании адекватного протокола терапии.

Ключевые слова: диагностика, нефропатии, патоморфоз, ультраструктура.

Введение. Патологии органов мочевыделительной системы в настоящее время относятся к одной из важнейших проблем медицинской науки. При этом заболевания почек (ЗП) в структуре всех внутренних болезней у детей занимают одно из лидирующих мест [1]. Это обусловлено их значительной распространенностью, склонностью к быстрому и прогрессирующему течению, наличию большого разнообразия патогенетических механизмов образования [2].

Современные представления об этиологии, патогенезе и клиническом течении заболеваний почек во многом связаны с необходимостью использования более углубленного субклеточного исследования ренальной ткани. Патоморфоз нефропатий многообразен, а их верификация остается проблематичной [3]. Для этого перспективно использование электронно-микроскопического анализа. До сих пор ряд аспектов, связанных с субклеточными изменениями структурно-функциональных элементов почечной ткани при нефропатиях, остаются малоизученными. Таким образом, назрела необходимость поиска более информативных диагностических маркеров, позволяющих дифференцировать различные варианты почечной патологии для выбора оптимальной тактики этиопатогенетической терапии.

Цель работы – провести электронно-микроскопический анализ пункционных нефробиоптатов и выявить субклеточные маркеры нарушения фильтрационной функции почки у детей при нефропатиях различного генеза.

Материалы и методы исследования. В настоящее исследование включены результаты ультраструктурного анализа материала нефробиопсий, полученного от 94 пациента (возраст – от 7 месяцев до 16 лет) с различными заболеваниями почки. Критериями для выполнения нефробиопсии являлось наличие в анамнезе у детей нефротического синдрома (протеинурии), микрогематурии, изолированной гематурии, нефритического синдрома. Клиническое обследование детей и взятие нефробиоптатов осуществлялось на базе УЗ «2-я Городская детская клиническая больница г. Минска». Гистологический и иммуногистохимический анализ ренальной ткани выполнен на базе УО «Белорусский государственный медицинский университет» (кафедра паталогической анатомии, заведующий – к.м.н., доц. Летковская Т.А.).

Электронная микроскопия. Для выявления субклеточных изменений в ткани почек были приготовлены 2870 ультратонких срезов из 400 блоков, залитых в специальные смолы. Материал фиксировался в 2,5%-глутаровом альдегиде, приготовленном на 0,1 М Na-какодилатном буфере (pH 7,4), постфиксировался 1% OsO_4, обезвоживался в спиртах восходящей концентрации, далее заливался в смолы марки Spurr для получения специальных блоков для нарезки. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме «Ultracut» («Reichert-Jung», Австрия), контрастировали 1% уранилацетатом и цитратом свинца. Анализ образцов проводили с помощью микроскопа «JEM-1011» («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВт и инструментальных увеличениях х6 000-х80 000. С использованием цифровой фотокамеры микроскопа и программы ITEM 5.0 (Olympus, Германия) проанализировано 2642 электронных микрофотографий, содержащих различные элементы почечной ткани.

Результаты и их обсуждение. Основой исследования являлся анализ: 1) состояния матрикса и филаментов базальной мембраны (толщина, дисперсность, осмиофобность и осьмиофильность, структура коллагеновых пучков, наличие внутри- и внемембранных депозитов); 2) патоморфоза висцеральных клеток гломерул – подоцитов; 3) дистрофии соединительно-тканных структур, расположенных между капиллярами клубочка (мезангия); 4) состояния эндотелия, выстилающего стенки капилляров клубочка; 5) тубулоинтерстициального компонента.

Структурные изменения ренальной ткани при повреждении гломерулярной базальной мембраны (ГБМ). Наиболее характерными признаками при данной патологии являлось: 1) прерывистость контуров ГБМ из-за потери структурированности пучков коллагеновых волокон; 2) изменение электронной плотности наружных и внутренних ее слоев из-за лизиса отдельных пучков коллагена; 3) аномалии в толщине ГБМ (от 120 до 280 нм, в отдельных случаях – до 800 нм) за счет перераспределения осевых фибрилл. В то же время другие ключевые элементы клубочка оставались неизменными как при проведении гистологического, так и иммуногистохимического анализа. Основываясь на полученных данных был сделан вывод о наличии наследственной формы гломерулярной патологии – синдром Альпорта.

Патоморфоз висцеральных клеток клубочка – подоцитов. В эту наиболее многочисленную группу вошли пациенты, у которых при электронно-микроскопическом исследовании выявлена нефропатия с минимальными изменениями (НМИ) и фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС).

При НМИ обращали на себя внимание наличие следующих признаков: распластывание и слияние цитоподий подоцитов на ГБМ, гиперплазия фибриллярных структур цитоплазмы и микроворсинчатая трансформация. Дополнительными маркерами являлось проявление стаза, характеризующегося наличием в просвете гломерулярных капилляров эритроцитов, реже моноцитов, адсорбированных на эндотелиальной выстилке сосудов.

При фокально-сегментарном гломерусклерозе (ФСГС) отмечалось сочетание полиморфных признаков: 1) дистрофия подоцитов в виде потери и повреждении субклеточных органелл (митохондрий, аппарата Гольджи, гранулярного эндоплазматического ретикулума), нарушения трабекулярного строения на фоне гиперплазии фибриллярных структур. Отмечалась также более выраженная микроворсинчатая трансформация, дистрофия микровиллей); 3) отслоение подоцитов от ГБМ; 4) накопление коллагеновых структур вблизи ГБМ.

Дистрофия соединительно-тканных структур клубочка (мезангия). При данной патологии характерные признаки значительно варьировали: от минимальных (0-1 балл), средних (2 балла), до более выраженных (3-4 балла). Наиболее патогномоничными были следующие изменения: 1) наличие депозитов электронно-плотного гранулированного

или наоборот дисперсного материала в мезангиальном матриксе или реже парамезангиальных зонах, а также канальцевом эпителии; 2) активная пролиферация мезангиальных клеток (до 4-7 мезангиоцитов в одном участке мезангия); 3) увеличение количества поверхностных структур (отростков) мезангиоцитов. Этот комплекс изменений в совокупности с ранее выявленными преобразованиями позволил установить наличие признаков мезангиопролиферативного гломерулонефрита (МПГН).

Повреждения эндотелия капилляров клубочка. При данной патологии в цитоплазме эндотелиоцитов регистрировались многочисленные, разного калибра, концентрические структуры в виде негомогенных отложений материала, с чередующимися темными и светлыми зонами. В мочевом пространстве капсулы также выявлялись подобные структуры в виде «фибриллярных образований». В субэпителиальном слое нередко визуализировались элементы по типу фаголизосом. Реже наблюдались более выраженные признаки дистрофии, которые проявлялись в виде: 1 – коллапса капилляров; 2 – линейных отложений электронно-плотного вещества вблизи ГБМ; 3 – склероза стромы; 4 – атрофии канальцевого эпителия. Основываясь на полученных данных в сочетании с иммуногистохимическим методом был сделан вывод о наличии волчаночного нефрита.

Ультраструктурные изменения интерстициального компонента. Ультраструктурные изменения тубулоинтерстициального аппарата как правило не системный характер. Обращало на себя появление коллагеновых фибрилл, умеренная инфильтрация иммунокомпетентными клетками (главным образом моноцитами и лимфоцитами).

Таким образом, проведенный электронно-микроскопический анализ позволил охарактеризовать 5 основных структурных типов поражения клубочкового аппарата: 1 – незначительные изменения гломерул (нефропатия минимальных изменений); 2 – очаговые и/или сегментарные гломерулярные повреждения (фокально-сегментарный гломерулосклероз; 3 – диффузные нарушения, связанные с пролиферацией мезангиального матрикса, поражением капилляров клубочка, эндотелия гломеруллярных капилляров, интерстиция (мезангиопролиферативный гломерулонефрит, интерстициальный нефрит); 4 – наиболее выраженные морфологические изменения, связанные с наличием сегментарных депозитов в субэпителиальном слое, диффузных или множественных склеротических изменений клубочков (волчаночный нефрит); 5 – нефрит, связанный с генетически детерминированными изменениями организации ГБМ (синдром Альпорта).

Заключение. Описан морфодистрофический паттерн, связанный с вовлечением в патологический процесс 5 основных элементов почечного клубочка: ГБМ, мезангия, подоцитов клубочка, эндотелия капилляров, интерстиция. Охарактеризованы субклеточные маркеры нарушения фильтрационной функции почек, общими из которых являются изменение цитоархитектоники мезангиального матрикса, нарушения структурной организации поверхностных отростков подоцитов, явление стаза в гломерулярных капиллярах). Частными ультраструктурными изменениями являлись: потеря структурированности внутренних фибрилл ГБМ, цитостаз транспортной системы, дисбаланс энергетического и белоксинтезирующего аппарата канальцевого эпителия клубочка, формирование концентрических мембранных структур в цитоплазме клеток различных отделов коркового и мозгового вещества почки. Анализ динамики развития дистрофических процессов актуален для прогноза течения заболевания, темпов прогрессирования деструктивных процессов в паренхиме почки и коррекции тактики этиопатогенетической терапии.

Литература

1. Баранов, А.А. Достижения и перспективы развития нефрологии детского возраста / А.А. Баранов, Т.В. Сергеева // Вопр. соврем. педиатр. – 2007. – Т. 6, № 6. – С. 1–5.

2. Детская нефрология: руководство для врачей / под ред. М.С. Игнатовой. – 3-е изд. – М.: МИА, 2011. – 692 с.
3. Игнатова, М.С. Актуальные вопросы педиатрической нефрологии / М.С. Игнатова // Нефрология. – 2011. – Т. 15, № 1. – С. 11-16.

PATHOMORPHOLOGICAL MARKERS IN RENAL TISSUE IN PATIENTS WITH NEPHROPATHIES OF DIFFERENT GENESIS

Astashonok A.N., Poleshchuk N.N.

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

An electron microscopic analysis of the renal biopsy specimen, obtained from the period 2018-2020 years from 94 children at the age from 7 months till 16 years with various kidney diseases, was carried out. Changes in the cortical (glomerular basement membrane, mesangium, podocytes) and cerebral (tubular epithelial cells) substances of the kidney were characterized. The degree of involvement of various structures (mesangial matrix, endothelial lining of capillaries) and organelles (mitochondria, intermediate filaments of the glomerular basement membrane, granular endoplasmic reticulum of podocytes and tubular epithelium) in the pathogenesis was determined. The obtained results are relevant for determining the prognosis of the disease, the rate of progression of chronic destructive processes of the renal tissue and the choice of an adequate treatment protocol on this basis.

Keywords: diagnosis, nephropathy, pathomorphosis, ultrastructure.

Поступила 15.10.2020

БИОМАРКЕРЫ НЕИМУННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ТКАНИ ПОЧКИ ПРИ ГЛОМЕРУЛОПАТИЯХ У ДЕТЕЙ

[1]Асташонок А.Н., [1]Полещук Н.Н., [2]Сукало А.В., [2]Козыро И.А.

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

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

Резюме. Проведена идентификация биомаркеров апоптоза (фактор sAPO-1/FAS, аннексин V) в образцах сывороток крови, полученных от 56 детей (возраст – от 3 до 17 лет) с первичными и вторичными гломерулопатиями. В группе пациентов (n=34, 60,7%) выявлено повышение в концентрации sAPO-1/FAS (от 0,046 до 0,24 нг/мл) при нормальных значениях данного показателя (0,023±0,002 нг/мл). По аннексину V у 7 пациентов (14,2%) отмечены превышения в 1,1-3,1 раза его референсных значений (от 0 до 6,7 нг/мл). Полученные результаты являются актуальными для совершенствования тактики лабораторной диагностики ренальных заболеваний, прогнозированию риска развитию быстропрогрессирующих форм гломерулопатий, а также могут иметь существенное значение для разработки новых подходов к этиопатогенетической терапии.

Ключевые слова: апоптоз, гломерулопатии, диагностика, иммунобиохимический анализ.

Введение. Почки – жизненно важные органы, участвующие в поддержании гомеостаза за счет синтеза различных физиологически-активных соединений (простагландинов, эритропоэтина, ренина и др.), фильтрации и реабсорбции плазмы крови и других биологических субстанций, выведения мочи, продуктов азотистого обмена, а также других чужеродных веществ [1]. Они обеспечивают поддержание водно-электролитного баланса, кислотно-основного равновесия, секретируют в кровь вещества, обладающие гормональной активностью и др. [1, 2].

Известны ряд патогенетических звеньев, связанных с хроническими заболеваниями почек. Среди факторов прогрессирования выделяют как иммунные, так и не иммунные (НФП). Предполагается, что НФП развиваются вследствие сочетанного воздействия нескольких патологических процессов, таких как: артериальная гипертензия, гемодинамические нарушения, протеинурия, наличие пролиферативных процессов [2]. До сих пор многие аспекты, касающиеся изменений в экспрессии биомаркеров апоптоза, эндотелиальной дисфункции и других наномолекулярных белковых компонентов в биологических жидкостях организма (крови, моче) при гломерулопатиях, остаются малоизученными. Поиск наиболее информативных диагностических маркеров, позволяющих по количественным значениям прогнозировать течение и скорость прогрессирования патологических процессов в ренальной ткани важен для выбора оптимальной тактики этиопатогенетической терапии.

Цель работы – провести иммунобиохимический анализ биомаркеров апоптоза у детей с различными гломерулопатиями, определить их количественные значения и оценить роль в патогенезе заболеваний почек.

Материалы и методы исследования. Клиническое обследование детей проводилось на базе УЗ «2-ая городская детская клиническая больница г. Минска и включало уточнение жалоб, анамнеза, результаты клинического, лабораторного, иммунологического, инструментального, морфологического исследования. Во всех случаях параллельно оценивали показатели крови и мочи (общий анализ, суточная экскреция с мочой белка, кристаллов солей, проба Зимницкого), а также биохимические показатели сыворотки крови, включающие уровень мочевины, креатинина, показатели белкового обмена

(общий белок, альбумин), липидный спектр, маркеры воспалительного ответа (СОЭ, С-реактивный белок, антистрептолизин О), электролитный баланс и др. Также в сыворотке крови по показаниям выполнялись определение уровня иммуноглобулинов основных классов A,M,G, комплемента С3 и С4, антинуклеарных и антител к цитоплазме нейтрофилов.

Для иммунобиохимического анализа исследованы образцы 56 сывороток крови у детей (возраст – от 3 до 17 лет) с первичными (n=21) и вторичными(n=25) гломерулопатиями на биомаркеры sAPO-1/FAS и аннексин V. Количественное определение их концентрации проводили с использованием тест-систем: Human sFas/sAPO-1 Elisa kit (E-EL-H5537, Elabscience, США) и Human ANXA 5 ELISA kit (E-EL-H0422, Elabscience, США).

Результаты и их обсуждение. Проанализированы образцы сывороток крови от пациентов с гломерулярными заболеваниями почек. Выявлены колебания в концентрации белкового факторов (sAPO-1/FAS, аннексин V) у детей с первичными и вторичными гломерулопатиями. Результаты представлены в таблице.

Таблица. – Количественные значения белкового фактора sAPO-1/FAS в сыворотке крови у детей с гломерулопатиями

Анализируемый биомаркер	*Концентрация биомаркера в группах (нг/мл)*		*Референсные значения (нг/мл)*
	Первичные гломерулопатии	*Вторичные гломерулопатии*	
sAPO-1/FAS	0,029-0,2 нг/мл	0,2-0,24 нг/мл	0,023±0,002 нг/мл

Установлено, что у 34 детей (60,7%) отмечались колебания в концентрации белка sAPO-1/FAS (от 0,046 до 0,24 нг/мл) при нормальных значениях данного биомаркера для сыворотки крови, не превышающих 0,023±0,002 нг/мл. У 22 детей (39,3%) уровень анализируемого белка был в норме. Наибольший разброс количественных значений фактора sAPO-1/FAS установлен у детей с первичными гломерулопатиями (нефропатией минимальных изменений, фокально-сегментарным гломерулосклерозом, мезангиопролиферативным гломерулонефритом).

При анализе концентрации другого биомаркера (аннексина V) установлено, что уровень данного белка в большинстве анализируемых проб (n=49, 87,5%) соответствовал нормальным значениям (от 0 до 6,7 нг/мл). В то же время у 6 пациентов (10,7%) концентрация биомаркера превышала показатели нормы в 1,1-1,2 раза (7,5-8,49 нг/мл). У одного пациента (1,8%) выявлено превышение в 3,1 раза (до 21,06 нг/мл) данного показателя.

Известно, что процесс апоптоза при гломерулопатиях реализуется через ряд патологических процессов в почках: поражении гломерул, тубулоинтерстициального компонента, аутоиммунных и воспалительных заболеваниях [3]. Интенсивность апоптоза прямо коррелирует со снижением фильтрационной функции почек, что лежит в основе хронических заболеваний ренальной ткани. Кроме того, выраженность апоптоза напрямую связана с другими клиническими признаками (активностью протеинурии, изменением клиренса эндогенного креатинина, наличием нефритического синдрома и др.) [4].

Апоптоз или запрограммированная клеточная гибель может запускаться как по внешнему рецепторному механизму (через рецептор Fas и связанный с ним лиганд), так и внутреннему опосредованному митохондриями пути (активация аннексина V и др.). Первый путь является относительно коротким по времени, второй – более длительный и связан с реализацией более грубых дистрофических процессов (повреждением ДНК, активным воспалительным процессом, формированием патологически-измененных клеток и др.) [5]. Известно, что аннексин V не экспрессируется в нормальных или активно-пролиферирующих клетках. Его источником являются только апоптотические клетки [6].

Таким образом, по результатам проведенных исследований установлено, что в развитии гломерулопатий могут быть вовлечены как Fas-опосредованный, так и митохондриальный путь апоптоза клеточных элементов почек. При этом первый рецепторный путь имеет доминирующее положение. Качественная и количественная оценка биомаркеров апоптоза важна для выявления тонких звеньев молекулярного повреждения структурных элементов ренальной ткани.

Заключение. Проведен иммунобиохимический анализ 56 образцов сывороток крови у детей с гломерулярными заболеваниями почек. Установлены вариации в экспрессии белковых факторов (sAPO-1/FAS, аннексина V). Показано, что у детей с гломерулопатиями в доминирующем положении имеет место реализация рецептор-зависимого (через белок sAPO-1/FAS) пути реализации апоптоза по сравнению внутренним митохондриальным (через активацию аннексина V) звеном программируемой клеточной гибели. Полученные данные актуальны для совершенствования методов диагностики ренальных заболеваний, а также поиска наиболее информативных биомаркеров острого и хронического почечного повреждения. В совокупности со стандартными клинико-лабораторными показателями это позволит проводить раннее выявление патологических изменений в почках и определять их характер, дифференцировать поражение разных отделов нефрона, оценить выраженность воспаления и интенсивность диспластических процессов ренальной ткани.

Литература

1. Смирнов, А.В. Нефрология: фундаментальная и клиническая / А.В. Смирнов, Ю.В. Наточин // Нефрология. – 2019. – Т. 23, № 4. – С. 9-26.

2. Fogo, A.B. Mechanisms of progression of chronic kidney disease / A.B. Fogo // Pediatr. Nephrol. – 2007. – Vol. 2. – P. 2011-2022.

3. Роль нарушений процессов апоптоза в прогрессировании хронической болезни почек у детей / О.В. Комарова [и др.] // Нефрология и диализ. – 2013. – № 15. – С. 135-139.

4. Mechanisms of neutrophil apoptosis in uremia and relevance of the Fas (APO-1, CD95)/Fas ligand system / B.L. Jaber [et al.] // J. Leuk. Biol. – 2001. – Vol. 69. – P. 1006-1012.

5. Green, D.R. The pathophysiology of mitochondrial cell death / D.R. Green, G. Kroemer // Science. – 2004. – Vol. 305. – P. 626-629.

6. Jakubowska, A. Importance of Annexin V in kidney diseases / A. Jakubowska, K. Kiliś-Pstrusińska // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2015. – Vol. 28. – P. 153-157.

BIOMARKERS OF THE NON□IMMUNE MEDIATED KIDNEY INJURY IN CHILDREN WITH GLOMERULOPATHIES

[1]Astashonok A.N., [1]Poleshchuk N.N., [2]Sukalo A.V., [2]Kozyro I.A.

[1]Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Blood serum, obtained from the 56 children (age – from 3 to 17 years old) with primary and secondary glomerulopathies, for apoptosis biomarkers (factor sAPO-1/ FAS, annexin V) were analyzed. The fluctuations in the concentration of sAPO-1/FAS (from 0.046 to 0.24 ng/ml) with normal values of this indicator (0.023±0.002 ng/ml) in some patients (n=34, 60.7%) were showed. According to another biomarker (annexin V), the 1.1-3.1 times excess in 7 patients (14.2%) from the reference values (from 0 to 6.7 ng/ml) were revealed. The obtained results are relevant for improving the tactics of laboratory diagnostics of renal diseases, searching for new molecular markers of renal pathophysiology, identifying the risk for developing rapidly progressive forms of glomerulopathies, and may also be of the significant importance for the development of a new approaches to etiopathogenetic therapy.

Keywords: apoptosis, glomerulopathies, diagnostics, immunobiochemical analysis.

Поступила 22.10.2020

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ОСТРОЙ ЦМВ ИНФЕКЦИИ

[1]Зверко В.В., [1]Григорьева Е.Е., [1]Фомина Е.Г., [2]Гуцалюк И.Я., [3]Доценко М.Л., [3]Пехтерева Л.А., [3]Доценко Э.А., [4]Шапетько М.М.

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

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

[3]Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

[4]Государственное учреждение «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Цитомегаловирусная инфекция – широко распространенная инфекция человека с различным механизмом передачи. Многообразие клинических проявлений заболевания обусловлено способностью цитомегаловируса человека инфицировать практически все клетки организма. Часто цитомегаловирус поражает лиц с иммунодефицитным состоянием. Следствием этого является продолжающийся рост цитомегаловирусной инфекции не только среди детей, но и среди взрослых. В данной статье изложены результаты определения следующих субпопуляций лейкоцитов: (Г-МЛСК (Lin^- $HLA\text{-}DR^-CD33^+CD11b^+CD15^+$), активированных ($CD3^+HLA\text{-}DR^+$) и регуляторных Т-клеток ($CD4^+CD25^{hi}CD127^-$)) в периферической крови пациентов с острой ЦМВ-инфекцией в сравнении со здоровыми добровольцами.

Ключевые слова: цитомегаловирус, цитомегаловирусная инфекция, проточная цитометрия, иммунный статус.

Введение. Цитомегаловирус (ЦМВ) является распространенным патогеном, инфицирующим человека. По данным ВОЗ, смертность от герпетической инфекции среди вирусных заболеваний находится на втором месте (15,8%) после гепатита (35,8%) [1, 2]. На сегодняшний день известно 80 представителей семейства вирусов герпеса, из которых 8 типов опасны для человека.

Как правило, первичное заражение ЦМВ происходит в раннем возрасте через биологические жидкости, при этом инфекция протекает бессимптомно либо в мягкой форме, сходной с таковой при инфекционном мононуклеозе, может сопровождаться лихорадкой и гепатитом. У иммунокомпетентных лиц первичное заражение приводит к установлению латентной формы инфекции. Основными мишенями вируса являются моноциты, дендритные клетки, $CD34^+$ гемопоэтические стволовые клетки, Т-лимфоциты, секреторные клетки слюнных желез, в которых он может персистировать на протяжении всей жизни человека. В различных регионах в зависимости от социо-экономического положения число серопозитивных людей в популяции колеблется от 20 до 100% [3].

Развитие острой формы ЦМВ-инфекции в основном регистрируется у иммунокомпрометированных индивидуумов: беременных женщин, пациентов, получающих иммуносупрессивные препараты после проведения трансплантаций, ВИЧ-инфицированных пациентов и пациентов с другими вторичными иммунодефицитами. Реактивация вируса приводит к развитию цитомегаловирусного мононуклеоза, поражению различных органов и систем, установлению хронических продуктивных

форм инфекции, которые увеличивают риск смертельных исходов при иммунодефицитных состояниях. Лечение острой ЦМВ-инфекции у иммунокомпрометированных пациентов включает назначение противовирусных препаратов (генцикловир, валганцикловир). У иммунокомпетентных лиц при переходе инфекции в острую форму в подавляющем числе случаев происходит естественная элиминация свободных вирусных частиц и затухание инфекционного процесса. Считается, что в данном случае вирус не представляет значительной опасности, поэтому назначение противовирусных препаратов не проводится и не включено в протоколы лечения иммунокомпетентных пациентов во всем мире, в том числе и в Республике Беларусь.

В то же время, сегодня нет полного представления о всех осложнениях острой ЦМВ-инфекции. Из-за широкого тканевого тропизма вируса инфекция имеет разнообразные клинические проявления, сходные с таковыми при других заболеваниях, что может приводить к ошибкам и увеличению сроков постановки правильного диагноза. Так, зафиксированы случаи, когда в отсутствии выраженной симптоматики ЦМВ-инфекции были поставлены первоначально неверные диагнозы карциномы толстой кишки [4], ишемического колита [5], миокардита [6], пневмонии [7].

Наиболее серьезным и угрожающим жизни осложнением при острой ЦМВ-инфекции является развитие венозной тромбоэмболии (ВТЭ). Связанный с ЦМВ тромбоз ранее был зарегистрирован в основном у пациентов с ослабленным иммунитетом, редко у иммунокомпетентных людей. Результаты некоторых исследований свидетельствуют, что выявляются иммунокомпетентные пациенты в возрасте 34,9±10,8 лет, у которых на фоне ЦМВ инфекции наблюдают развитие ВТЭ [8-10].

Тромбоэмболии при ЦМВ могут быть индуцированы как непосредственным поражением клеток эндотелия и стимуляцией в них экспрессии адгезивных молекул, так и опосредовано через модуляцию функциональной активности иммунных клеток. Роль функционального состояния иммунной системы в развитии ВТЭ, сопровождающей ЦМВ-инфекцию, остается недостаточно изученной.

Целью настоящего исследования являлось изучение содержания субпопуляций гранулоцитарных миелоидных супрессорных клеток (Г-МЛСК), активированных и регуляторных Т-клеток у пациентов с острой ЦМВ-инфекцией.

Материалы и методы исследования. В исследовании использованы образцы периферической крови 18 иммунокомпетентных пациентов с подтвержденной острой ЦМВ-инфекцией, госпитализированных в инфекционный стационар, и 10 образцов крови здоровых добровольцев. Все пациенты, с подтвержденной в последующем острой ЦМВ-инфекцией, поступали в инфекционный стационар с высокой температурой/лихорадкой.

Наличие острой ЦМВ-инфекции подтверждали в диагностических тестах по выявлению ДНК цитомегаловируса в сыворотке/клетках крови и/или по наличию специфических противовирусных IgM, а также в тестах по идентификации антител к pp65 антигену вируса, экспрессирующемуся на поверхности инфицированных клеток.

Выделение генетического материала осуществляли с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Российская Федерация). Выделение ДНК производили из 100 мкл сыворотки крови и клеток, полученных из 1 мл крови. Постановку ПЦР осуществляли с использованием набора реагентов для определения ДНК цитомегаловируса методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК ЦМВ» (Вектор-Бест, Российская Федерация).

Определение IgM осуществляли с помощью тест-системы DIA-CMV-IgM для определения антител класса IgM к цитомегаловирусу человека («НПК «ДИАПРОФ-МЕД», Украина).

Определение IgG проводили с помощью набора реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-G» «Тест система иммуноферментная для качественного и количественного определения антител класса G к цитомегаловирусу» (НПО «Диагностические системы», Россия).

Для определения клеток, инфицированных вирусом, по экспрессии на их поверхности белка pp65 использовали набор CMVBriteTurboKit (iQProducts, Нидерланды). Исследование проводили методом иммунофлуоресцентной микроскопии.

У здоровых добровольцев и пациентов, включенных в исследование, осуществляли забор 5–10 мл венозной крови в асептических условиях, в две пробирки. Одна пробирка с антикоагулянтом (раствором гепарина или этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА)), вторая пробирка с активатором свертывания крови. Подготовку материала для исследования, пробоподготовку, иммунофенотипирование клеток крови проводили согласно разработанному в лаборатории алгоритму определения субпопуляционного состава клеток в образцах крови. В исследовании использовались антитела согласно составленной панели и в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя антител: Lin-маркеры, HLA-DR, CD15, CD3, CD4 (Exbio, Чехия); CD33, CD11b, CD25(Elabscience, США) (таблица).

Таблица. – Панели антител

Панель	Канал флуоресценции			
	FITC	*PE*	*PerCP*	*APC*
1	Lin-маркеры HLA-DR	CD15	CD33	CD11b
2	CD3	CD25	CD4	HLA-DR

Иммунофенотип клеток периферической крови определяли методом проточной цитометрии на цитофлюориметре FACSCalibur (BD, Амстердам, Нидерланды). Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения FACSDiva версии 7.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica версии 10 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде Me (25 – 75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро-Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных использовали непараметрические методы. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p<0,05$ [11].

Результаты и их обсуждение. Исследование показателей клеточного иммунитета включало определение гранулоцитарных миелоидных супрессорных клеток (Г-МЛСК), активированных и регуляторных Т-клеток.

Миелоидные супрессорные клетки – гетерогенная популяция активированных незрелых клеток миелоидного происхождения, которая подавляет эффекторный иммунный ответ. Известно, что Г-МЛСК являются незрелыми миелоидными клетками, не несущими популяционных маркеров зрелых гранулоцитов и молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКС), но экспрессирующими молекулы CD11b, CD33/CD15. Наиболее часто иммунофенотип Г-МЛСК описывают как $Lin^{-}HLA\text{-}DR^{-}CD33^{+}CD11b^{+}CD15^{+}$.

В результате проведенного иммунофенотипирования был определен процент содержания Г-МЛСК ($Lin^{-}HLA\text{-}DR^{-}CD33^{+}CD11b^{+}CD15^{+}$) у пациентов с ЦМВ-инфекцией и контрольной группы. Полученные данные представлены на рисунке 1.

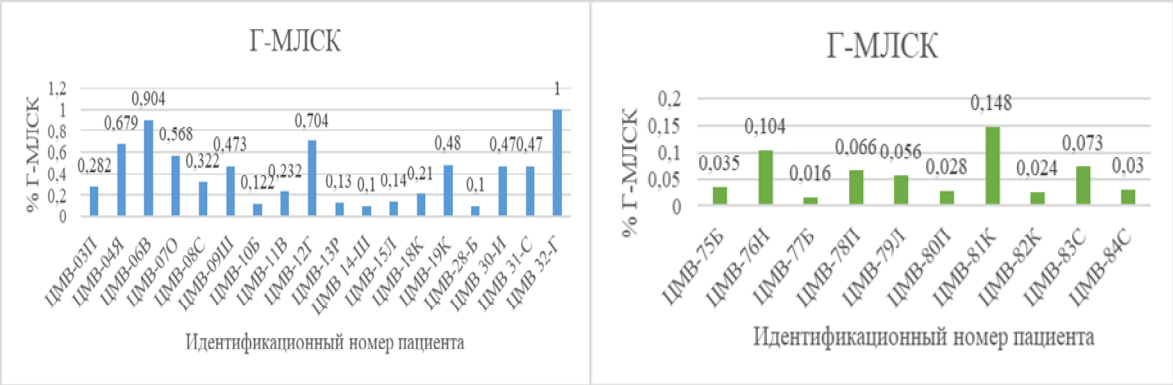


Рисунок 1. – Содержание Г-МЛСК ($Lin^{-}HLA\text{-}DR^{-}CD33^{+}CD11b^{+}CD15^{+}$) в венозной крови у исследованных пациентов с ЦМВ-инфекцией (А) и контрольной группы (Б), представленное в % от лейкоцитов

При анализе полученных данных установлено, что содержание Г-МЛСК ($Lin^{-}HLA\text{-}DR^{-}CD33^{+}CD11b^{+}CD15^{+}$) в крови пациентов с ЦМВ-инфекцией превышает этот показатель в сравнении с группой здоровых добровольцев в 8,8 раза ($p<0,001$) (медианы показателей составили 0,396 (0,157; 0,546) и 0,045 (0,028; 0,071), соответственно), что в последующем может приводить к подавлению иммунного ответа.

Фенотипически активированные Т-лимфоциты можно представить в виде $CD3^{+}HLA\text{-}DR^{+}CD45^{+}$. После проведения иммунофенотипирования у исследованных пациентов наблюдался следующий процент активированных Т-клеток, отображённый на рисунке 2.

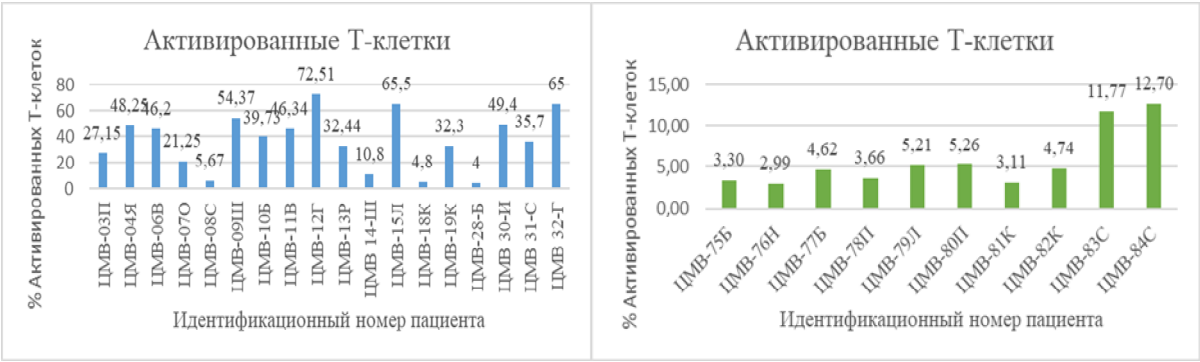


Рисунок 2. – Содержание активированных Т-клеток ($CD3^{+}HLA\text{-}DR^{+}$) в венозной крови у пациентов с ЦМВ-инфекцией (А) и контрольной группы (Б), выраженное в % от лимфоцитов

Анализ содержания активированных Т-клеток ($CD3^{+}HLA\text{-}DR^{+}$) в образцах периферической крови пациентов с ЦМВ-инфекцией показал их возрастание в 8,1 раза ($p<0,001$) по отношению к условно здоровым пациентам (медианы показателей: 37,71 (22,72; 49,11) и 4,68 (3,39; 5,25) соответственно).

Т-регуляторные клетки – основные клетки периферической крови, выполняющие регуляторную функцию и опосредующие периферическую иммунологическую толе-

рантность. Эти клетки способны подавлять аутоиммунные и аллергические реакции, отторжение трансплантата, но, вместе с тем, существенно уменьшают резервы противоопухолевого и противоинфекционного иммунитета. Фенотипически Т-регуляторные клетки характеризуются наличием на мембране молекулы CD25 (α-цепь рецептора к ИЛ-2), экспрессируют транскрипционный фактор FoxP3, в то время как экспрессия молекулы CD127 (рецептор к ИЛ-7) отсутствует, что отличает Т-регуляторные клетки от активированных Т-клеток. Таким образом, фенотип Т-регуляторных клеток может быть представлен в виде $CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{-}FoxP3^{+}$.

Для оценки содержания Т-регуляторных клеток у пациентов с ЦМВ-инфекцией использовали моноклональные антитела к антигену CD 25 и CD4. Полученные результаты представлены на рисунке 3.

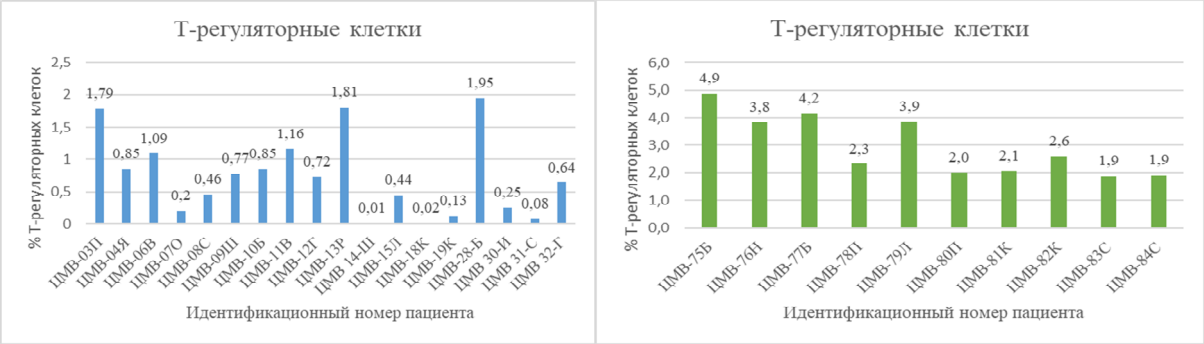


Рисунок 3. – Содержание Т-регуляторных клеток в венозной крови у пациентов с ЦМВ-инфекцией (А) и контрольной группы (Б), выраженное в % от лимфоцитов

Анализ содержания регуляторных Т-клеток ($CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{-}$) в образцах периферической крови пациентов с ЦМВ-инфекцией показал их уменьшение в 3,6 раза ($p<0,001$) по сравнению с группой здоровых добровольцев (медианы показателей: 0,68 (0,21; 1,03) и 2,45 (2,005; 3,845), соответственно), что может свидетельствовать о развитиии транзиторного иммунодефицита у пациентов с ЦМВ и снижении противовирусного иммунитета.

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлены статистически значимые различия содержания Г-МЛСК ($Lin^{-}HLA\text{-}DR^{-}CD33^{+}CD11b^{+}CD15^{+}$), активированных ($CD3^{+}HLA\text{-}DR^{+}$) и регуляторных Т-клеток ($CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{-}$) в образцах крови в группе пациентов с острой ЦМВ-инфекцией и контрольной группе (рисунок 4).

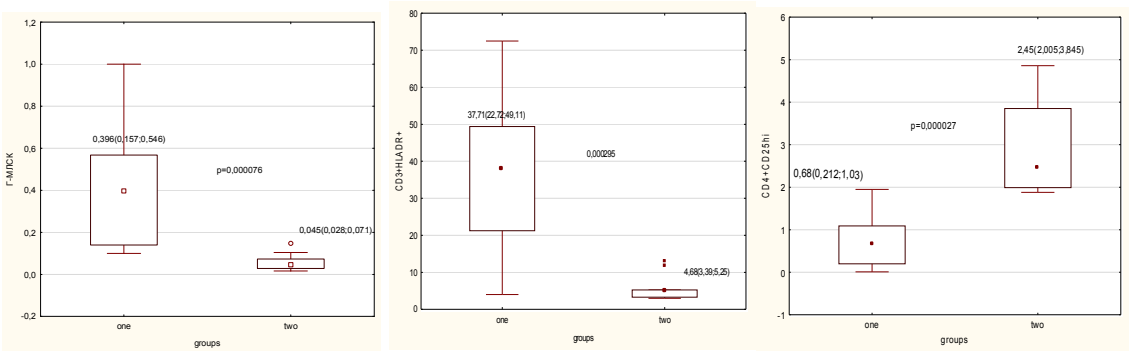


Рисунок 4. – Содержание Г-МЛСК ($Lin^{-}HLA\text{-}DR^{-}CD33^{+}CD11b^{+}CD15^{+}$), активированных Т-клеток ($CD3^{+}HLA\text{-}DR^{+}$), регуляторных Т-клеток ($CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{-}$) в образцах периферической крови пациентов с острой ЦМВ-инфекцией (one) и условно здоровых добровольцев (two)

Заключение. Работы, посвященные изучению иммунного статуса пациентов с ЦМВИ, не многочисленны и неоднозначны. Как правило, выделяют два вида изменений, приводящих к иммунному дисбалансу: повышение активности отдельных звеньев иммунной системы и/или недостаточность других. Важным аспектом является тропность ЦМВ, к иммунокомпетентным клеткам, что может приводить к различным формам иммунопатологии, прежде всего — к иммунной недостаточности. ЦМВ способны латентно персистировать в гемопоэтических и иммуноиндифферентных клетках.

У обследованных пациентов с острой ЦМВ инфекцией выявлена значительная внутригрупповая гетерогенность колебаний показателей иммунитета в пределах одного компонента звена. Это может быть связано с адаптивными функциональными возможностями, которые формируют индивидуальные приспособительные реакции к вирусной персистенции.

В полученных результатах выявлены следующие признаки напряженности иммунной системы у пациентов с острой ЦМВ инфекцией в сравнении с условно здоровыми людьми: значительное увеличение количества гранулоцитарных миелоидных супрессорных клеток (Г-МЛСК, с фенотипом $Lin^{-}HLA\text{-}DR^{-}CD33^{+}CD11b^{+}CD15^{+}$) и активированных Т-клеток ($CD3^{+}HLA\text{-}DR^{+}$), а также снижение числа регуляторных Т-клеток ($CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{-}$). Представленные данные позволяют расширить знания об иммунологическом состоянии организма при активной персистенции вируса, а также о способности ЦМВ избегать адекватного иммунного ответа.

Литература

1. Human Cytomegalovirus (HCMV) / V. Schottstedt [et al.] // Transfus. Med. Hemother. – 2010. – Vol. 37, No. 6. – P. 365-375.

2. Арова, А.А. Современный арсенал антигерпетических лекарственных средств / А.А. Арова, А.В. Петров // Лекарственный вестник. – 2006. – № 5. – С. 10-12.

3. Griffiths, P. The pathogenesis of human cytomegalovirus / P. Griffiths, I. Baraniak, M. Reeves // J. Pathol. – 2015. – Vol. 235, No. 2. – P. 288-297.

4. Cytomegalovirus colitis mimicking colon carcinoma in an HIV-negative patient with chronic renal failure / M.E. Falagas [et al.] // Am. J. Gastroenterol. – 1996. – Vol. 91, No. 1. – P. 168-169.

5. Cytomegalovirus colitis in immunocompetent patients: a clinical and endoscopic study / T.H. Seo [et al.] // Hepatogastroenterology. – 2012. – Vol. 59, No. 119. – P. 2137-2141.

6. Vanstechelman, F. Cytomegalovirus myocarditis in an immunocompetent patient / F. Vanstechelman, H. Vandekerckhove // Acta Cardiol. – 2012. – Vol. 67, No. 2. – P. 257-260.

7. Cytomegalovirus pneumonia in immunocompetent host: case report and literature review / E. Grilli [et al.] // J. Clin. Virol. – 2012. – Vol. 55, No. 4. – P. 356-359.

8. Inherited and acquired predispositions for thrombosis in immunocompetent patients with cytomegalovirus-associated thrombosis / L. Atzmony [et al.] // Eur. J. Intern. Med. – 2010. – Vol. 21, No. 1. – P. 2-5.

9. Venous thromboembolism and associated high plasma factor VIII levels: linked to cytomegalovirus infection / C.M. Schambeck [et al.] // Thromb. Haemost. – 2000. – Vol. 83, No. 3. – P. 510-511.

10. Cytomegalovirus infection in immunocompetent critically ill adults / A. Al-Omari [et al.] // Ann. Intensive Care. – 2016. – Vol. 6, No. 1. – P. 110-111.

11. A guide to modern statistical analysis of immunological data / B. Genser [et al.] // BMC Immunol. – 2007. – Vol. 8, No. 27. doi: 10.1186/1471-2172-8-27

DYNAMICS OF CHANGES IN INDIVIDUAL LEUCOCYTES SUBPOPULATIONS IN ACUTE CMV INFECTION

[1]Zverko V.V., [1]Grigorieva E.E., [1]Fomina E.G., [2]Gutsalyuk I.Ya., [3]Docenko M.L., [3]Pekhtereva L.A., [3]Docenko E.A., [4]Shapetko M.M.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology», Minsk, Republic of Belarus

[2]City Clinical Infectious Diseases Hospital, Minsk, Republic of Belarus

[3]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

[4]Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus

Cytomegalovirus (CMV) infection is a widespread human infection with different transmission mechanism. The variety of clinical manifestations of the disease is due to the ability of human cytomegalovirus to infect almost all the body cells. Cytomegalovirus often infects persons with an immunodeficiency state, which has resulted in an ongoing increase in CMV infection incidence not only among the pediatric, but also among the adult population. This article presents the results of determining the following subpopulations of leukocytes: (G-MLSK ($Lin^-HLA\text{-}DR^-CD33^+CD11b^+CD15^+$), activated ($CD3^+HLA\text{-}DR^+$) and regulatory T-cells ($CD4^+$ $CD25^{hi}CD127^-$)) in the peripheral blood of patients with acute CMV infection compared with healthy volunteers.

Keywords: cytomegalovirus, cytomegalovirus infection, flow cytometry, immune status.

Поступила 04.11.2020

ОБЩИЙ И АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ Е И ИНТЕРЛЕЙКИН-13 У ПАЦИЕНТОВ С РЕСПИРАТОРНОЙ АЛЛЕРГИЕЙ

Новикова Т.П.

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

Резюме. Респираторные аллергические заболевания являются классическим представителем иммуноглобулин Е-опосредованных аллергических реакций. Маркерами аллергического воспаления чаще всего выступают уровни общего и аллергенспецифического сывороточного иммуноглобулина Е. Но у некоторых пациентов они не способны выявить атопию, поэтому необходимо использование дополнительных маркеров. Определение уровня интерлейкина-13 в сыворотке крови пациентов позволяет повысить специфичность диагностических методов респираторных аллергических состояний.

Ключевые слова: аллергический ринит, астма, иммуноглобулин Е общий, интерлейкин-13, атопия, аллерген, специфические иммуноглобулины Е.

Введение. Респираторные аллергические заболевания являются классическим представителем иммуноглобулин Е (ИГЕ)-опосредованных аллергических реакций, типичные формы которых – аллергическая бронхиальная астма (АБА) и аллергический ринит (АР). Распространенность АБА колеблется от 8% в Европе до 20% в Скандинавских странах [1, 2]; распространенность АР составляет от 6 до 11% [2, 3]. Распространенность АР в Республике Беларусь составляет 3-4%, АБА менее 1% [3].

В основе диагностики лежит обнаружение причинно-значимых аллергенов, вызывающих аллергическое заболевание. Наиболее чувствительными являются методы аллергообследования *in vivo*, включающие кожные и провокационные тесты. Контакт аллергена с сенсибилизированным организмом несет риск развития системных реакций, может способствовать развитию гиперчувствительности к новым аллергенам; кроме того, имеются возрастные ограничения и противопоказания [3].

Аллергодиагностика *in vitro*, основанная на определении ИГЕ [5], как ключевого звена развития реагиновой аллергии – менее чувствительна, но гораздо более безопасна и позволяет выявлять аллергическую сенсибилизацию к большему спектру аллергенов одномоментно. Наиболее широко применяют методы определения общих ИГЕ (оИГЕ) и аллергенспецифических ИГЕ (аИГЕ). В первом случае мы не можем говорить об аллергенной специфичности, в связи с чем в большинстве клинических руководств рекомендуется определять аИГЕ [4, 5]; тем не менее, определение оИГЕ полезно для оценки аллергического статуса пациента [3, 5]. В клинической практике врач-аллерголог работает со стандартными коммерческими наборами, что ограничивает спектр тестируемых аллергенов наиболее распространенными. Ложноотрицательные результаты определения, аИГЕ, неэффективность специфической иммунотерапии могут зависеть от сенсибилизации организма к отдельным детерминантам, среди которых выделяют мажорные и минорные [4, 6]. С этой точки зрения, определение оИГЕ, без указания на аллергенную специфичность, может подтвердить или опровергнуть аллергический фенотип болезни. Метод определения оИГЕ обладает высокой чувствительностью, но недостаточной специфичностью, поэтому остается актуальным использование дополнительных маркеров ИГЕ опосредованных аллергических состояний [4].

По данным литературы, у пациентов аллергическими состояниями, интерлейкин-13 (ИЛ-13) повышается в зависимости от активности аллергического воспаления [4, 5]. Уровень ИЛ-4 и ИЛ-13 в сыворотке крови пропорционально возрастают при наличии у

пациента воспаления 2-го типа [5]. Имеются также данные о том, что подавление продукции синтеза одного из интерлейкинов, в частности ИЛ-4, приводит к снижению сывороточной концентрации другого, и как следствие снижению активности аллергического воспаления у пациента [4, 5]. Максимальные концентрации этого интерлейкина имеют пациенты с тяжелым, неконтролируемым течением ИГЕ-опосредованных аллергических реакций [6].

В ряде публикаций представлена информация о том, что рецептор иммунных клеток к ИЛ-13 обладает генетическим полиморфизмом и, в зависимости от его модификации, у пациента развиваются аллергические реакции разной интенсивности. Показана особая роль ИЛ-13 у пациентов с генетически детерминированной астмой [6, 7]. Именно полиморфизм рецепторов ИЛ-13 рассматривается в настоящее время, как механизм генетической передачи предрасположенности пациентов к атопии [7].

В настоящее время снижение уровня ИЛ-13 в сыворотке крови рассматривается как перспективное направление в терапии ИГЕ-опосредованных аллергических реакций, таких как бронхиальная астма, атопический дерматит взрослая форма, особенно при их тяжелом, неконтролируемом течении [4, 5, 7]. Терапию проводят иммунобиологическими препаратами, ингибирующими синтез ИЛ-4, ИЛ-13 и блокирующими клеточные рецепторы к этим интерлейкинам [5, 6].

По данным литературы, до 35% пациентов с нормальным уровнем сывороточного оИГЕ имеют признаками аллергических заболеваний [3]. В связи с чем интересен вопрос об участии цитокинов в формировании аллергического воспаления и использование цитокинов, как маркеров диагностики подобных состояний.

Цель настоящей работы – оценка диагностической ценности определения о ИГЕ и ИЛ-13 у пациентов с аллергической формой бронхиальной астмы, аллергическим ринитом.

Материал и методы исследования. Обследовано 153 пациента, из которых АБА страдали 68, АР (сезонный и круглогодичный) – 46; контрольную группу составили 39 практически здоровых лиц. В зависимости от особенностей клинической картины обследованных пациентов разделили на несколько групп: группа А (n=114), пациенты, страдающие атопией – АБА в сочетании с АР; группа Б (n=46), пациенты, страдающие только АР; группа Г (n=39), пациенты без клинических признаков аллергии. В зависимости от спектра сенсибилизации внутри каждой группы выделяли подгруппы пациентов, сенсибилизированных к единственному аллергену (А1, Б1, моносенсибилизация) и к нескольким аллергенам одновременно (А2, Б2, полисенсибилизация).

Определение оИГЕ проводили электрохемилюминисцентным методом с использованием закрытого анализатора COBAS e 411 (Рош, Германия). Содержание оИГЕ измеряли в МЕ/мл (международная единица на миллилитр), в качестве нормы использовали международный стандарт для лиц старше 16 лет – 0-100 МЕ/мл.

Определение аИГЕ проводили методом иммуноферментного анализа с использованием тест системы стандартизированного иммуноблоттинга RIDA qLine Allergy (производство R-Biopharm a.g., Германия), оценку результатов проводили на сканере Epson Perfection Phono 600 с помощью специального программного обеспечения RIDA qSoft. Уровень аИГЕ оценивали в классах; наличие уровня аИГЕ 2 класса (0,7 МЕ/мл) и выше расценивали как подтверждение клинически значимой сенсибилизации к аллергенам. Панель респираторных аллергенов включала: пыльца луговых трав (колосок душистый обыкновенный, ежа сборная, тимофеевка луговая, рожь посевная), пыльца деревьев и кустарников (ольха, береза, лещина, дуб), пыльца сорных трав (амброзия полыннолистная, полынь, подорожник), бытовые клещи (*Dermatophagoides pteronissinus* et farina), индивидуальные аллергены животных (кошка, собака, лошадь), плесневые грибки

(*Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternate*). В группе контроля уровень, а ИГЕ не превышал 1-й класс.

Количественное определение уровня ИЛ-13в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем eBioscience (производство Bender MedSystems, Германия). Повышенным, считали уровень ИЛ-13 в сыворотке крови пациентов двукратно превышающий медиану (Ме) значений, полученных в контрольной группе пациентов.

Статистическая обработка проводилась при помощи программы Statistica 10. При анализе данных, имеющих распределение, отличное от нормального, использовались непараметрические статистические методы. Для величин с распределением, отличным от нормального, рассчитывали медиану (Ме) и межквартальный диапазон [25%; 75%]. Для сравнения двух групп применялся U-критерий Манна-Уитни, оценку чувствительности и специфичности методом 4-х польной таблицы с использованием критерия $\chi 2$. Статистически значимыми считались различия данных и корреляции между данными при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Социально-демографические и клинические характеристики пациентов между группами не различались. Медиана возраста обследованных лиц с аллергией составила 32 [22; 45] года, не отличаясь от такового у пациентов с АБА 29 [21; 44] лет и АР 36 [26; 46] лет соответственно. Возраст пациентов в группах с моно- и полисенсибилизацией не различался. В группе А 47 (41%) пациентов имели моносенсибилизацию, 67 (59%) – полисенсибилизацию, в группе Б соответствующие показатели составили 23 (34%) и 45 (66%) соответственно.

Далее всем пациентам определили уровень сывороточного о ИГЕ. Поскольку общепризнанной верхней границей нормы является уровень о ИГЕ 100 МЕ/мл, по результатам теста мы выделили 2 группы пациентов с верифицированной аллергией: выше 100 МЕ/мл и ниже 100 МЕ/мл. При определении уровня о ИГЕ уровень выше верхней границы нормы имело 64,5% обследованных (таблица 1).

Таблица 1. – Распределение пациентов в группах в зависимости от уровня ИГЕ

Группа	*ИГЕ>100 МЕ/мл n (%)*	*ИГЕ≤00 МЕ/мл n (%)*
А (АБА+АР) Моно/ поли	74 (64,5%) 23 (49%)/ 50 (76%)*	40 (35,5%) 24/17
Б (АР) Моно/ поли	21 (47,8%) 9 (37,5%)/ 12 (54,6%)*'**	23 (52,2%) 15/10
Г (Контроль)	4 (10,3%)	35 (89,7%)

Примечания: * – имеются статистически значимые различия между подгруппами в группе; ** – имеются статистически значимые различия между группами пациентов

У здоровых лиц повышенный уровень о ИГЕ был выявлен в 10,3%, а у пациентов с атопией этот показатель был существенно выше: максимальным он был у пациентов с АБА на фоне полисенсибилизации – 86,7%, на втором месте были пациенты группы А (АБА в сочетании с АР) на фоне полисенсибилизации – 76,0%. Что касается пациентов с АР определение оИГЕ при существующей норме 100 МЕ/мл для постановки диагноза не имеет существенного значения, т.к. повышение выявлено только у половины пациентов при наличии полисенсибилизации, и менее чем у половины пациентов (37,5% и 45,7% соответственно) в общей группе исследования и при наличии моносенсибилизации.

Для подтверждения наличия и уточнения характера сенсибилизации пациентов всем исследуемым пациентам определили уровень аИГЕ. Если при наличии атопии в целом (АБА+АР) большая часть пациентов имели повышенный о ИГЕ, то при наличии только ринита (АР), особенно при сенсибилизации к одной группе аллергенов меньше половины пациентов имели уровень оИГ Е выше стандартной нормы (таблица 2).

Таблица 2. – Количество пациентов с выявленным повышенным уровнем специфических иммуноглобулинов Е в группах исследования

Уровень аИГЕ МЕ/мл	*оИГЕ>100 МЕ/мл n=74*	*оИГ≤100 МЕ/мл n=40*	*Контроль n=39*
0 класс	1	22	36
1 класс	2	2	1
2 класс	1*	4*	1*
3 класс	14*	5*	1*
4 класс	34*	4*	0
5 класс	18*	3*	0

Примечание: * – сенсибилизация подтверждена

При оценке результатов определения аИГЕ в группе пациентов с нормальным уровнем оИГЕ еще 16 пациентов (40%) имели сенсибилизацию к одной или нескольким группам аллергенов. Выявленная зависимость является подтверждением того, что при существующей норме 100 МЕ/мл, определение уровня о ИГЕ не отражает наличие или отсутствии аллергического состояния у пациента в полной мере. Настоящая норма приводит к тому, что значимая часть пациентов с атопией (40%) не выявляется.

При расчете чувствительности и специфичности с помощью четырехпольной таблицы с использованием критерия $\chi 2$ метод определения оИГЕ показал высокую чувствительность, но низкую специфичность, поэтому возникла потребность исследования дополнительного маркера аллергического воспаления в группах исследования.

В литературе показано, что ИЛ-13 является менее специфичным маркером высоких титров с оИГЕ, чем ИЛ-4. Но именно уровень ИЛ-13 имеет значимые корреляции с повышением оИГЕ, поэтому в качестве дополнительного маркера аллергического воспаления был выбран уровень ИЛ-13. Показано, что у пациентов с аллергическими состояниями ИЛ-13 повышается в зависимости от активности аллергического воспаления [5, 6].

Далее в исследовании принимали участие только пациенты с нормальным о ИГЕ. Пациентам группы исследования с нормальным уровнем о ИГЕ определили уровень ИЛ-13 (таблица 3).

Таблица 3. – Уровень ИЛ-13 (пг/мл) у пациентов с нормальным оИГЕ, Me [Q25; Q75]

Группа	*Все*	*Моно*	*Поли*
А (АБА+АР)	2,5 [1,2; 2,8]*	1,2 [0,5; 2,5]*	2,2 [1,52; 2,5]*
Б (АР)	1,2 [0,52; 2,5]*	0,8 [0,52; 2,5]	1,4 [0,52; 2,5] *
Г (Контроль)	0,4 [0,22; 1,01]		

Примечание: * – имеются статистически значимые различия между группой исследования и здоровым контролем, $p<0,05$

В группах исследования ИЛ-13 был выше, чем в контрольной группе. Минимально значение 1,2 [0,52; 2,5] пг/мл было получено в общей группе обследованных с АР и у пациентов комбинированной группы АБА+АР при условии моносенсибилизации. Уровни ИЛ-13 были повышены статистически значимо выше у всех пациентов с атопией и полисенсибилизацией 1,4 [0,52; 2,5] пг/мл в группе пациентов с АР и 2,6 [2,2; 4,5] пг/мл

у пациентов с АБА. Максимальным исследуемый показатель был в группе пациентов с АБА 3,2 [2,5; 4,5] пг/мл в общей группе исследования при условии полисенсибилизации.

При анализе распределения пациентов в зависимости от уровня ИЛ-13 и оИГЕ в группах исследования было установлено, что в обеих группах исследования уровень ИЛ-13 был выше, чем в контрольной группе. Учитывая, что средний уровень ИЛ-13 в контрольной группе составил 0,4 [0,22; 1,01] пг/мл, двукратное превышение среднего значения было принято за повышенный уровень ИЛ-13.

В контрольной группе 6 пациентов (15%) имели превышение среднего значения ИЛ-13 более чем в 2 раза. В группе пациентов с оИГЕ выше нормы такое значение имели 66 пациентов, что составило 89% пациентов группы. В группе пациентов с нормальным уровнем оИГЕ пациентов, имеющих двукратное превышение ИЛ-13 по сравнению с контрольной группой, было 22 человека, или 55% всей группы.

Заключение. У пациентов с респираторными аллергическими заболеваниями нормальным уровнем оИГЕ имеет место повышение уровня маркера аллергических состояний ИЛ-13.

Повышение уровня ИЛ-13 не зависит от вида респираторной аллергии и характера сенсибилизации. Показатель статистически значимо отличается от контрольного у здоровых пациентов во всех трех группах исследования без привязки к варианту сенсибилизации (моно- или полисенсибилизация) и в группах пациентов как с астмой, так и с ринитом.

Литература

1. Поллиноз / Э.А. Доценко [и др.] // Здравоохранение. – 2001. – № 2. – С. 35-39.
2. IgE in Clinical Allergy and Allergy Diagnosis [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.worldallergy.org/education-and-programs/education/allergic-disease-resource-center/professionals/ige-in-clinical-allergy-and-allergy-diagnosis#. – Date of access: 02.11.2020.
3. Amarasekera, M. Immunoglobulin E in health and disease / M. Amarasekera // Asia Pac Allergy. – 2011. – Vol. 1. – P. 12-15.
4. Ribatti, D. The discovery of immunoglobulin E / D. Ribatti // Immunol. Lett. – 2016. – Vol. 171. – P. 1-4.
5. Аллергический ринит (АР): клинич. рекомендации: утв. РААКИ 2018 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://nrcii.ru/docs/2.allergic_rhinitis.pdf. – Дата доступа: 02.11.2020.
6. Wise, S.K. International consensus statement on allergy and rhinology: allergic rhinitis, executive summary / S.K. Wise, S.Y. Lin, E. Toskala // Int. Forum Allergy Rhinol. – 2018. – Vol. 8. – P. 85-107.
7. Махарадзе, Д.Ш. Современные клинические аспекты оценки уровней общего и специфических IgE / Д.Ш. Махарадзе // Педиатрия. – 2017. – Т. 96, № 2. – С. 121-127.

GENERAL AND ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOGLOBULINS E AND INTERLEUKIN-13 IN PATIENTS WITH RESPIRATORY ALLERGIES

Novikova T.P.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Respiratory allergic diseases are classic representatives of immunoglobulin E-mediated allergic reactions. Markers of allergic inflammation are most often the levels of serum total and allergen-specific immunoglobulin E. But in some patients they are not able to detect allergy, therefore, additional markers should be used. Determination of the level of interleukin-13 in the blood serum of patients makes it possible to increase the specificity of diagnostic methods for respiratory allergic conditions.

Keywords: allergic rhinitis, asthma, total immunoglobulin E, interleukin-13, allergy, allergen, specific immunoglobulins E.

Поступила 05.11.2020

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОМАРКЕРОВ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ В МОЧЕ У ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

[1]Пархомчук О.Ю., [1]Романова И.В., [1]Григорьева Е.Е., [1]Фомина Е.Г., [2]Рябцева Т.В., [2]Сорока Н.Ф., [3]Буторина И.И., [2]Чиж К.А.

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

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

[3]Государственное учреждение «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Поражение почек при системной красной волчанке является актуальной проблемой современной медицины. Волчаночный нефрит часто определяет течение этого серьезного заболевания (в 30-70% случаев), в 10% случаев приводя к развитию терминальной стадии хронической болезни почек. Поэтому перспективным представляется исследование новых маркеров воспаления и репарации почечной ткани при этом заболевании с целью своевременной диагностики и лечения люпус-нефрита. В данной статье изложены результаты определения потенциальных биомаркеров (подоциты ($CD45^{-}PODXL^{+}$), антигенпрезентирующие клетки ($CD3^{-}HLA\text{-}DR^{+}$)) повреждения почечной ткани в моче у пациентов, страдающих волчаночным нефритом.

Ключевые слова: системная красная волчанка, волчаночный нефрит, подоциты, антигенпрезентирующие клетки.

Введение. Системная красная волчанка (СКВ) представляет собой аутоиммунное заболевание, характеризующееся системным иммунокомплексным поражением соединительной ткани и её производных и, как следствие, иммуновоспалительным повреждением внутренних органов с развитием полиорганной недостаточности. Распространённость заболевания среди лиц европеоидной расы составляет 30:100 000; среди жителей стран Африки и Карибского бассейна 200:100 000. Превалирует заболевание у пациентов женского пола (90%). Клиническая картина и лабораторные изменения при СКВ весьма разнообразны и могут существенно различаться у разных пациентов. Достаточно частым и тяжелым проявлением заболевания является волчаночный нефрит (ВН), характеризующийся иммунокомплексным поражением почечных клубочков [1-3].

На сегодняшний день «золотым стандартом» оценки почечного повреждения является проведение прижизненной пункционной нефробиопсии с определением гистопатологического класса ВН. Однако этот метод исследования связан с риском возникновения ряда осложнений (прежде всего кровотечения) и требует наличия специальных методов окраски почечной ткани, а также квалифицированных специалистов. Кроме того, этот метод еще не стал рутинным в повседневной клинической практике и не может широко использоваться для динамического наблюдения (повторные нефробиопсии) за меняющимися процессами в ткани почек. В этой связи особый интерес представляют исследования, основанные на неинвазивных методах диагностики, а также выявления обострений и особенностей течения ВН. В последние годы появилось много данных, полученных в результате изучения различных субпопуляций клеток крови, обнаруживаемых в моче таких пациентов [2, 4].

ВН возникает в результате отложения иммунных комплексов в почках, сопровождаемого активацией комплемента, что вызывает воспаление тканей, приводящее к повреждению почечных клубочков. Результаты многочисленных исследований показали

значимость повреждения подоцитов (висцеральных эпителиальных клеток клубочков почек) при люпус-нефрите [1, 4].

Подоциты – важные клеточные компоненты гломерулярного фильтрационного барьера, относятся к высоко дифференцированным клеткам и практически не возобновляются. Эти клетки играют ключевую роль в поддержании селективной клубочковой фильтрации. Их повреждение и экскреция с мочой ведет к обнажению базальной мембраны клубочков, и, как следствие, возникновению протеинурии. Потеря 20-40% клеток является критической и приводит к гломерулосклерозу, вызывающему в последующем облитерацию клубочков и развитие почечной недостаточности [5-7].

Сравнительно недавно появились данные, указывающие на значительное увеличение числа Т-клеток в моче пациентов с ВН, в сравнении со здоровыми добровольцами, пациентами с диабетической нефропатией и АНЦА-ассоциированными васкулитами (АНЦА – антинейтрофильные цитоплазматические антитела). Исследователями из ряда ведущих медицинских центров и университетов Европы показана корреляция содержания Т-регуляторных клеток и CD8+ цитотоксических лимфоцитов в моче с активностью заболевания [2, 8-10].

Целью настоящего исследования являлось уточнение возможности использования подоцитов ($CD45^{-}PODXL^{+}$) и антигенпрезентирующих клеток ($CD3^{-}HLA\text{-}DR^{+}$) в качестве потенциальных биомаркеров повреждения почечной ткани в моче у пациентов, страдающих ВН.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено в серии экспериментов *in vitro*, в которых использован 21 образец клеток осадка мочи пациентов, страдающих СКВ с наличием ВН и 10 образцов клеток осадка мочи здоровых добровольцев. Биологический материал использовался только с информированного согласия пациента.

Забор мочи у пациентов с СКВ осуществлялся в ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии». Подготовку материала для исследования, пробоподготовку, иммунофенотипирование клеток мочи проводили согласно разработанному в лаборатории алгоритму определения субпопуляционного состава клеток в образцах осадка мочи.

В исследовании использовались антитела согласно составленной панели и в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя антител: CD8, HLA-DR (Exbio, Чехия); CD4, CD3, CD45 (Elabscience, США); Anti-TRA-PODXL (Miltenyi Biotec, Германия) (таблица).

Таблица. – Панели антител

Панель	Канал флуоресценции			
	FITC	*PE*	*PerCP*	*APC*
1	CD8	HLA-DR	CD4	CD3
2	CD45	Anti-TRA-PODXL	-	-

Субпопуляционный состав клеток мочи определяли методом проточной цитометрии на цитофлуориметре FACSCalibur (BD, Амстердам, Нидерланды). Анализировали полученные данные с использованием программного обеспечения FlowJo версии 10.0.7, США.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica версии 12 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде Me (25-75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Нормальность распределения величин оценивали с использованием

W-критерия Шапиро-Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных использовали непараметрические методы. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p<0,05$ [11].

Результаты исследования и их обсуждение. В настоящее время имеется возможность быстрой и достоверной идентификации подоцитов (подоцитурия) и антигенпрезентирующих клеток в моче при помощи проточного цитометра с использованием панели антител к специфичным маркерам. Для выявления подоцитов широкое распространение получили моноклональные антитела к подокаликсину, гломерулярному эпителиальному белку-1 (GLEPP-1), CD2AP, C3b-рецептору (CR1, CD35), нефрину, P-кадгерину, CD80, нефрилизину (CD10), T-(H-) кадгерину (CDH13), интегрину альфа-3 (CD49C) и др. [2, 9-10]. В нашем исследовании общий фенотип антигенпрезентирующих клеток представлен как $CD3^{-}HLA\text{-}DR^{+}$.

В исследовании принял участие 31 пациент, из них 21 человек с СКВ, осложнённой ВН (основная группа) и 10 – условно здоровые люди (контрольная группа). Женщины в основной группе составляли 81%, мужчины – 19%; в контрольной – 80% и 20%, соответственно. Эти данные согласуются с данными литературы, согласно которым основную массу заболевших составляют женщины.

Репрезентативный пример определения подоцитов ($CD45^{-}PODXL^{+}$) с использованием моноклональных антител к подокаликсину в составе осадка мочи пациента с ВН представлен на рисунке 1.

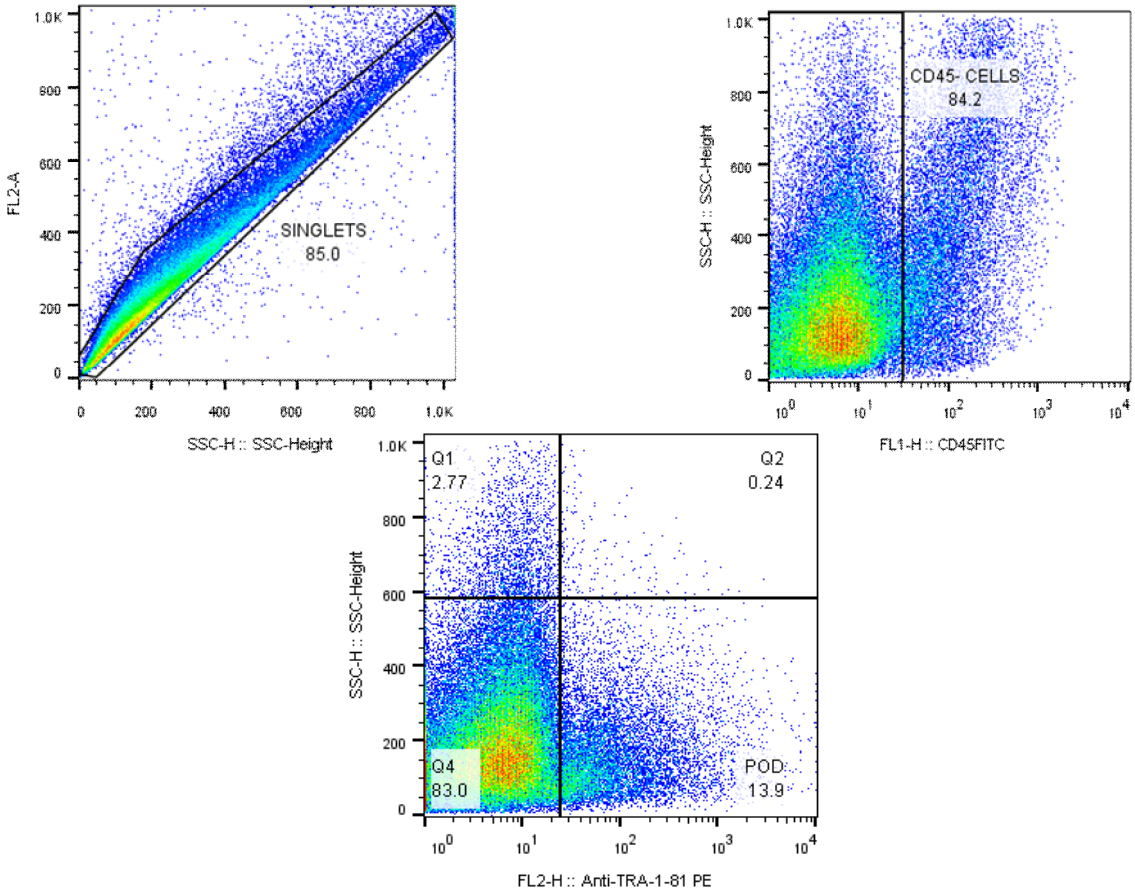
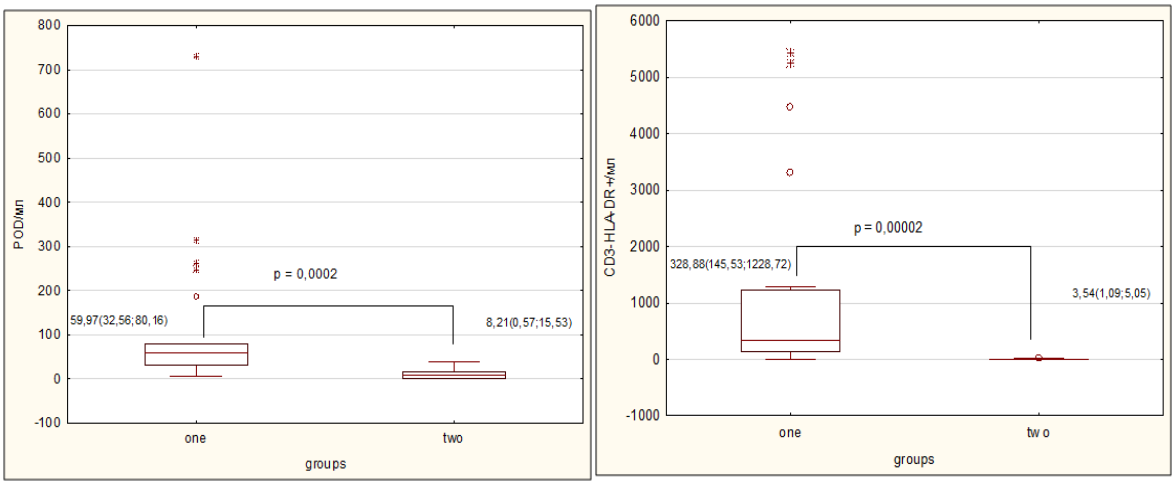


Рисунок 1. – Идентификация подоцитов в осадке образцов мочи

При анализе полученных данных установлено, что содержание подоцитов ($CD45^{-}$ $PODXL^{+}$) в осадке мочи пациентов с системной красной волчанкой, осложненной люпус-нефритом, превышает этот показатель в сравнении с группой здоровых добровольцев в 7,3 раза (медианы показателей составили 59,97 (32,56; 80,16) – 8,21 (0,57; 15,53) соответственно).

Анализ содержания антигенпрезентирующих клеток ($CD3^{-}HLA\text{-}DR^{+}$) в образцах мочи пациентов с люпус-нефритом показал их возрастание в 92,9 раза по отношению к условно здоровым пациентам (медианы показателей: 328,88 (145,53; 1228,72) – 3,54 (1,09; 5,05) соответственно).

Данные статистического анализа по субпопуляционному составу (подоциты ($CD45^{-}PODXL^{+}$), антигенпрезентирующие клетки ($CD3^{-}HLA\text{-}DR^{+}$) исследуемых образцов мочи пациентов представлены на рисунке 2.



А Б

Рисунок 2. – Абсолютное содержание подоцитов (POD) (А) и антигенпрезентирующих клеток ($CD3^{-}HLA\text{-}DR^{+}$) (Б) в образцах мочи пациентов с ВН (one) и условно здоровых добровольцев (two)

Выявлены статистически значимые различия содержания подоцитов ($CD45^{-}$ $PODXL^{+}$) и антигенпрезентирующих клеток ($CD3^{-}HLA\text{-}DR^{+}$) в образцах мочи в группах пациентов с ВН.

Заключение. В настоящее время биопсия почек остается «золотым стандартом» для диагностики и прогноза осложнений волчаночного нефрита. Однако данный метод является инвазивным, в связи с чем остро встаёт необходимость поиска новых неинвазивных лабораторных тестов для выявления поражения почек. Внедрение и разработка таких методов в рутинную практику осложняется их высокой стоимостью, необходимостью чёткой верификации метода и стандартизацией условий проведения [7, 12].

Полученные предварительные результаты позволяют предположить, что количественная оценка содержания подоцитов в осадке мочи может быть потенциально полезным неинвазивным маркером для оценки прогрессирования гломерулярной болезни при СКВ.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлены потенциальные биомаркеры повреждения почечной ткани в моче у пациентов, страдающих СКВ с наличием ВН: подоциты ($CD45^{-}PODXL^{+}$) и антигенпрезентирующие клетки ($CD3^{-}HLA\text{-}DR^{+}$). Наличие в образцах мочи этих субпопуляций клеток может являться подтверждением повреждения почечной ткани при СКВ.

Литература

1. Podocyte injury in lupus nephritis / H. Sakhi[et al.] // J. Clin. Med. – 2019. – Vol. 8, No. 9. – P. 1340. doi:10.3390/jcm8091340

2. Urinary CD8+ T-cell counts discriminate between active and inactive lupus nephritis / S. Dolff [et al.] // Arthritis Res. Ther. – 2013. – Vol. 15, No. 1. – R36. doi:10.1186/ar4189

3. Трудности диагностики системной красной волчанки / М.М. Тлиш [и др.] [Электронный ресурс] // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2014. – № 3. – С. 36-41. – Режим доступа: https://cyberleninka.ru/article/n/trudnosti-diagnostiki-sistemnoy-krasnoy-volchanki-1. – Дата доступа: 26.08.2019.

4. Sekulic, M. A compendium of urinary biomarkers indicative of glomerular podocytopathy patients / M. Sekulic, S.P. Sekulic // Patholog. Res. Int. – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 782395. doi:10.1155/2013/782395

5. Trimarchi, H. Podocyturia: potential applications and current limitations / H. Trimarchi // World J. Nephrol. – 2017. – Vol. 6, No. 5. – P. 221-228.

6. Peterman, A. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity / A. Petermann, J. Floege // Nephron. Clin. Pract. – 2007. – Vol. 106. – P. 61-66.

7. Urinary podocyte microparticles are associated with disease activity and renal injury in systemic lupus erythematosus / J. Lu [et al.] // BMC Nephrol. – 2019. – Vol. 20, No. 1. – P. 303. doi: 10.1186/s12882-019-1482-z

8. The cellular signature of urinary immune cells in Lupus nephritis: new insights into potential biomarkers / K. Kopetschke [et al.] // Arthritis Res. Ther. – 2015. – Vol. 17, No. 1. – P. 94. doi: 10.1186/s13075-015-0600-y

9. Urinary CD4 T cells identify SLE patients with proliferative lupus nephritis and can be used to monitor treatment response / P. Enghard [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2014. – Vol. 73, No. 1. – P. 277-283.

10. CD4+CD25-Foxp3+ T cells: a marker for lupus nephritis? [Electronic resource] / M. Bonelli [et al.] // Arthritis Res. Ther. – 2014. – Vol. 16, No. 2. – R104. doi: 10.1186/ar4553

11. A guide to modern statistical analysis of immunological data / B. Genser [et al.] // BMC Immunol. – 2007. – Vol. 8. – P. 27. doi: 10.1186/1471-2172-8-27.

12. Urinary dedifferentiated podocytes as a non-invasive biomarker of lupus nephritis / J. Perez-Hernandez [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. – 2016. – Vol. 31, No. 5. – P. 780-789. doi: 10.1093/ndt/gfw002

DETERMINATION OF POTENTIAL BIOMARKERS OF RENAL TISSUE DAMAGE IN URINE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATHOSUS

[1]Parkhomchuk O.Yu., [1]Romanova I.V., [1]Grigorieva E.E., [1]Fomina E.G., [2]Ryabtseva T.V., [2]Soroka N.F., [3]Butorina I.I., [2]Chizh K.A.

[1]Republican Scientific & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

[3]Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus

Kidney damage in systemic lupus erythematosus is an urgent problem of modern medicine. Lupus nephritis often determines the course of this serious disease (in 30-70% of cases), in 10% of cases leading to the development of end-stage chronic kidney disease. Therefore, it seems promising to study new markers of inflammation and repair of renal tissue in this disease in order to timely diagnose and treat lupus nephritis. This article presents the results of identifying potential biomarkers (podocytes ($CD45^{-}PODXL^{+}$), antigen presenting cells ($CD3^{-}HLA\text{-}DR^{+}$)) of renal tissue damage in urine in patients with lupus nephritis.

Keywords: systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, podocytes, antigen presenting cells.

Поступила 15.10.2020

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ВНЕГОСПИТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ

[1]Русина В.В., [1]Кабанова Ю.А., [2]Захарова А.Г., [2]Доценко Э.А.

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

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

Резюме. Внегоспитальная пневмония – широко распространенное заболевание у взрослых, занимающее ведущее место в структуре заболеваемости и смертности от инфекционных болезней в развитых странах. Наибольшую проблему для врачей представляют пациенты с тяжелой внегоспитальной пневмонией (ТВП), т.к. летальность у данной категории больных остается высокой, а лечение является сложным и дорогостоящим. Одной из ведущих причин осложненного и затяжного течения пневмонии в настоящее время является изменение иммунологической реактивности организма. Раньше все внимание ученых было направлено на изучение избыточной активации иммунной системы, однако сейчас все большие усилия направляются на изучение бактериально-индуцированной иммуносупрессии. Поиск надежных прогностических маркеров иммуносупрессии при пневмонии в будущем позволит наиболее эффективно использовать препараты, ориентированные на коррекцию иммунного статуса пациента. В ходе исследований показано, что у пациентов с внегоспитальной пневмонией тяжелого течения уменьшается количество Т-лимфоцитов, Т-хелперов, естественных киллеров (NK-клеток), NKT-клеток, регуляторных Т клеток, а также субпопуляции В1-клеток с одновременным увеличением истощенных Т-лимфоцитов, которые характеризуются пониженной продукцией цитокинов и пролиферативной активностью.

Ключевые слова: пневмония, иммунная система, клеточный иммунитет, иммуносупрессия, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, прогностический критерий.

Введение. Тяжелая внегоспитальная пневмония (ТВП) – это особая форма пневмонии, характеризующаяся выраженной дыхательной недостаточностью, как правило, в сочетании с признаками сепсиса и органной дисфункцией. В настоящее время для оценки тяжести течения и риска неблагоприятного исхода при пневмонии могут использоваться разнообразные критерии и шкалы, из которых наиболее распространенными являются: индекс тяжести пневмонии (PSI); шкала PORT (Pneumonia Outcomes Research Team); шкалы CURB/CRB-65 и др. [1]. Шкалы предусматривают оценку определенных клинических, лабораторных, физических и рентгенологических признаков, однако не учитывают изменения иммунологической реактивности организма. Несмотря на достигнутые определенные успехи в современной медицине в части ранней диагностики и лечения внегоспитальной пневмонии, остается достаточно высокий уровень неблагоприятных последствий и летальных исходов [2]. В связи с этим, представляет интерес поиск новых иммунологических диагностических маркеров, определяющих тяжесть течения заболевания и необходимость проведения дополнительной иммунокоррекции [3].

Цель исследования заключается в анализе изменений основных и дополнительных показателей клеточного иммунитета у лиц с внегоспитальной пневмонией тяжелого течения.

Материалы и методы исследования. Для проведения исследований были сформированы 2 группы пациентов: условно здоровые пациент (n=10), пациенты с внегоспитальной пневмонией тяжелого течения (по шкале CURB≥3 балла) на момент поста-

новки диагноза (n=20). Все пациенты получали лечение в соответствие с клиническими протоколами [4]. Отбор крови проводился не позднее 10 дня от начала заболевания.

Иммунологическое исследование включало определение содержания основных и дополнительных субпопуляций лейкоцитов крови. Для исследования использовалась линейка антител в соответствии с инструкцией производителя (Exbio, Чехия); (Elabscience, США) (таблица).

Таблица. – Панели антител для определения показателей клеточного иммунитета

Панель антител	*Канал флуоресценции*			
	FL1 (FITC)	*FL2 (PE)*	*FL3 (PerCP\PC7)*	*FL4 (APC)*
Панель 1	CD3	CD16+CD56	CD45	CD19
Панель 2	CD4	CD8	CD3	HLA-DR
Панель 3		CD28	CD4	CD25
Панель 4	CD19	CD5		CD27
Панель 5	Lin-маркеры HLA-DR	CD15	CD33	CD11b
Панель 6	CD3	CD62L	CD279 (PD-1)	CD45RA

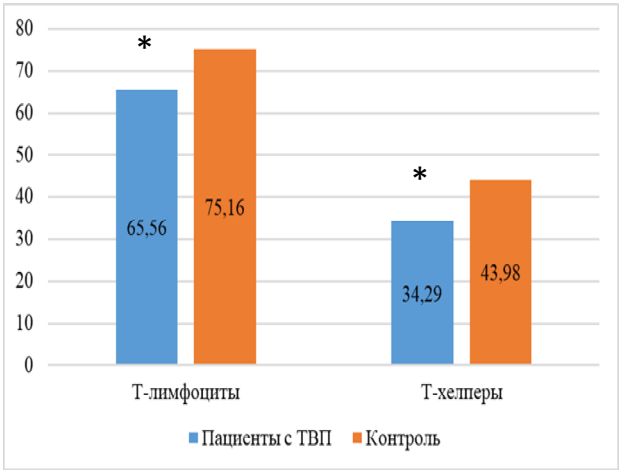
Образцы клеток учитывали на цитофлуориметре FACSCalibur в соответствии с инструкцией производителя (США). Анализ включал следующие этапы: контроль работоспособности/калибровку прибора; настройку параметров светорассеяния на цитограмме, построенной в координатах FSC\SSC; настройку параметров порога учета («threshold») по каналу FSC, чтобы исключить из анализа клеточный детрит; настройку напряжения на каналах флуоресценции с использованием неокрашенного контрольного образца; настройку спектральной компенсации с использованием «single-stain» контролей; учет исследуемого образца с подсчетом 100 000 клеток. Данные анализировали при помощи программного обеспечения BD FACSDiva 7.0.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Statistica версии 12 (StatSoft, США) и IBM SPSS Statistics 22 (IBM, Российская Федерация). Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро-Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для обработки и сравнения групп данных использовали непараметрические методы. Значения показателей представлены в виде Me (25-75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Для сравнения двух независимых выборок применяли U-критерий Манна-Уитни. Критическое значение уровня значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 5% ($p<0,05$). Для выявления возможных прогностических показателей развития патологического процесса использовали ROC-анализ. Диагностическую ценность показателей оценивали с использованием параметра AUC (area under curve) – площадь под кривой (0,9-1,0 – отличная; 0,8-0,9 – очень хорошая; 0,7-0,8 – хорошая, 0,6-0,7 – средняя, 0,6 и меньше – неудовлетворительная) [5].

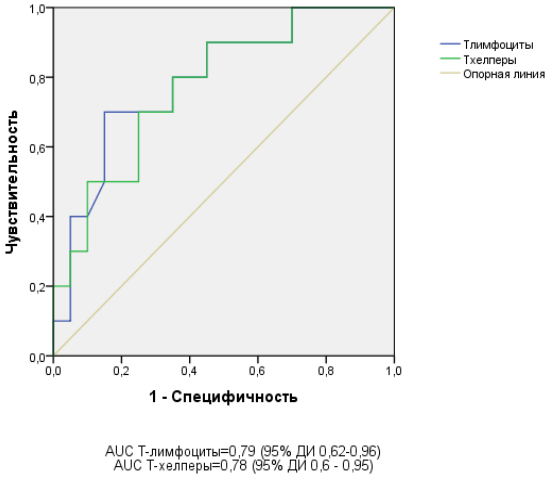
Результаты исследования и их обсуждение. В ходе исследования были проанализированы показатели клеточного иммунитета у двух групп пациентов: 1-я – группа пациентов с внегоспитальной пневмонией тяжелого течения на момент постановки диагноза, 2-я – лица без инфекционной патологии и гнойно-септического процесса, у которых показатели клеточного иммунитета находились в пределе референтных показателей (контрольная группа).

Результаты исследования показали, что относительное содержание лимфоцитов у пациентов в обеих группах находилось в пределах диапазона физиологической нормы. Анализ показателей клеточного иммунитета группы пациентов с внегоспитальной пневмонией тяжелого течения на момент постановки диагноза выявил достоверное снижение (p=0,011) количества Т-лимфоцитов до 69,1% (57,7; 73,5) по сравнению с контрольной группой: 76,6% (72,9; 78,5). Кроме того, установлено, что у больных с пневмонией статистически значимо снижено (p=0,017) количество Т-хелперов по сравнению с пациентами контрольной группы: 34,6% (27,5; 42,7) и 45,0% (41,7; 48,9) соответственно.

AUC уровня Т-лимфоцитов и Т-хелперов, рассчитанная с помощью ROC-анализа, у больных с пневмонией составила 0,79 (95% ДИ 0,62-0,96) и 0,78 (95% ДИ 0,6-0,95), соответственно, что указывало на относительно высокое диагностическое значение показателя при данном состоянии (рисунок 1).



А



Б

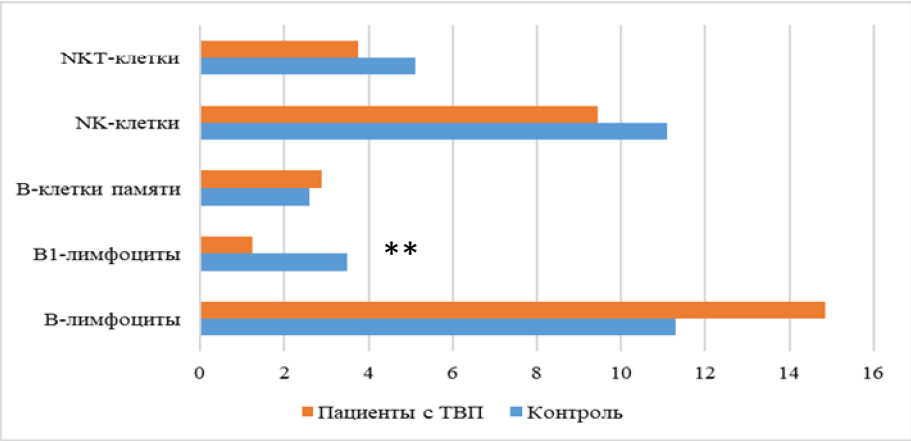
* – различия между группами статистически значимы при p<0,05

Рисунок 1. – Относительное содержание Т-лимфоцитов и Т-хелперов (А), а также результаты ROC-анализа уровня Т-лимфоцитов и Т-хелперов (Б) у пациентов с ТВП

У пациентов с внегоспитальной пневмонией тяжелого течения на момент постановки диагноза наблюдалась тенденция к уменьшению количества естественных киллеров (NK-клеток): 7,4% (6,1; 11,1) при 11,0% (7,3; 13,8) в контрольной группе, а также NKT-клеток: 3,6% (2,7; 5,0) при значении аналогичного показателя в группе контроля 4,5% (3,6; 6,1) (рисунок 2).

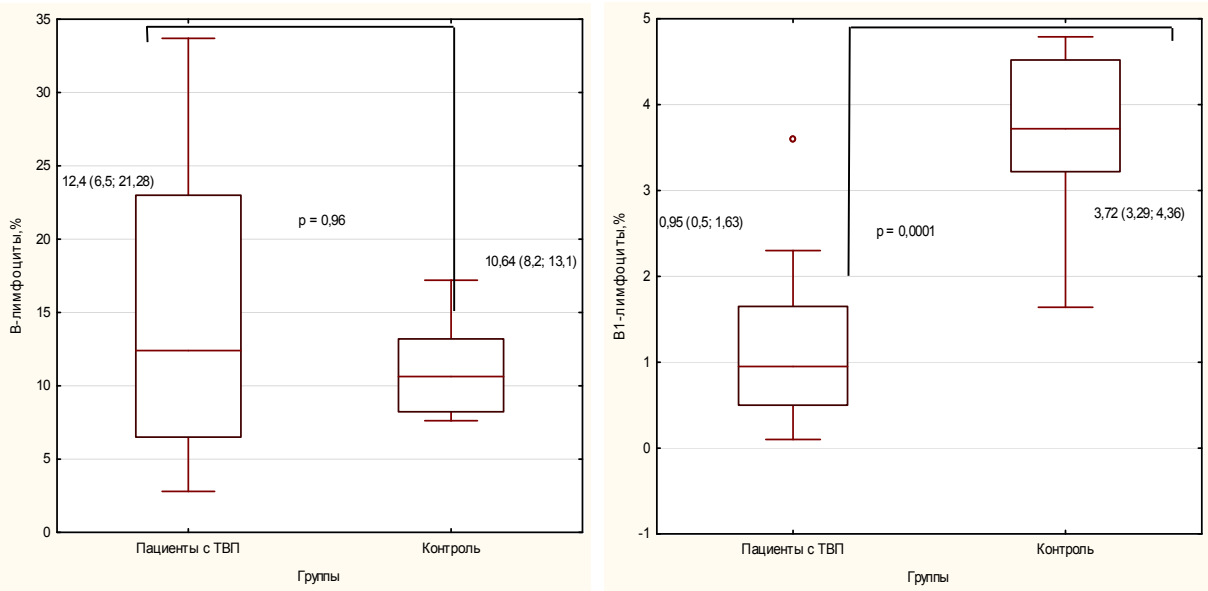
У пациентов с внегоспитальной пневмонией определялось достоверное снижение (p<0,001) содержания субпопуляции В1-клеток (CD19+ CD5+) (0,95% (0,5; 1,6)) по сравнению с контрольной группой (3,72% (3,29; 4,4)), при этом статистически значимых различий в количестве В-лимфоцитов и В-клеток памяти между исследованными группами выявлено не было (рисунок 2, 3).

Результаты ROC-анализа также показали, что AUC В1-лимфоцитов у пациентов с пневмонией составила 0,94 (95% ДИ 0,85-1,0). Такой результат указывает на то, что данный показатель можно использовать как прогностический критерий с высокой степенью диагностической значимости тяжести течения пневмонии. Уровень В-лимфоцитов, В-клеток памяти не позволял с доказанной точностью предсказать риск тяжелого течения пневмонии: AUC В-лимфоцитов 0,49 (95% ДИ 0,29-0,7) и В-клеток памяти 0,5 (95% ДИ 0,29-0,72) соответственно (рисунок 4).



** – различия между группами статистически значимы при p<0,001

Рисунок 2. – Относительное содержание субпопуляций В-лимфоцитов, NK- и NKT-клеток в группе пациентов с ТВП и контрольной группе



А **Б**

Рисунок 3. – Процентное содержание В-лимфоцитов (А) и В1-лимфоцитов (Б) у пациентов с ТВП и у пациентов контрольной группы

Анализ содержания цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+), соотношения CD4+/CD8+ субпопуляций, а также активированных Т-лимфоцитов (CD3+ HLA-DR+), несущих маркер «поздней активации» HLA-DR+, не выявил статистически значимых различий этих показателей в изучаемых группах.

Несмотря на то, что регуляторные Т-клетки более устойчивы к апоптозу, чем обычные CD4+ Т-клетки, их содержание в основной группе было значимо ниже (p = 0,011) по отношению к контрольной группе: 1,1% (0,8; 2,1) и 2,5% (2,0; 3,9), соответственно. При проведении ROC-анализа для Т-регуляторных клеток площадь под ROC-кривой составила 0,79 (95% ДИ 0,63-0,95), что свидетельствует о достаточно высоком прогностическом значении данного маркера у пациентов с тяжелой внегоспитальной пнемонией.

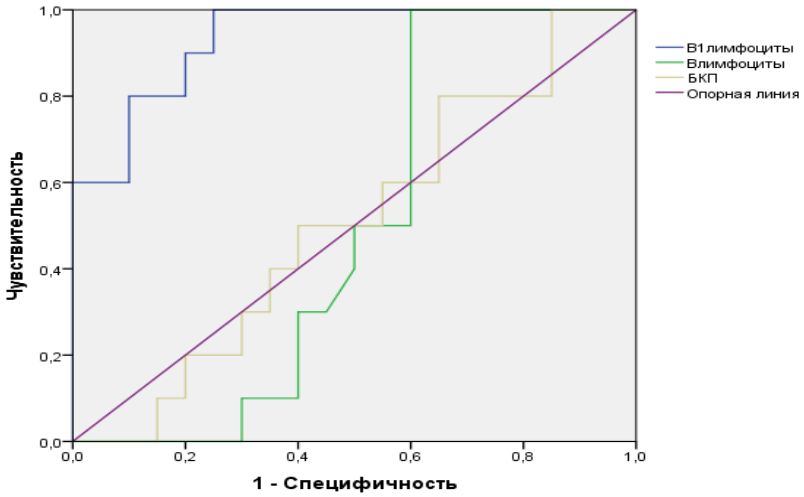


Рисунок 4. – Результаты ROC-анализа уровня субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с внегоспитальной пневмонией тяжелого течения

Во время иммунного ответа у пациентов с тяжелым инфекционным заболеванием формируются антигенспецифические цитотоксические Т-лимфоциты (истощенные Т-лимфоциты), которые характеризуются пониженной продукцией цитокинов и пролиферативной активностью. При анализе содержания истощенных Т-клеток у пациентов с внегоспитальной пневмонией было выявлено существенное увеличение их доли в основной группе (8,9% (7,1; 13,0)) по сравнению с контрольной группой: 1,9% (1,7; 2,4), (p<0,001) (рисунок 5).

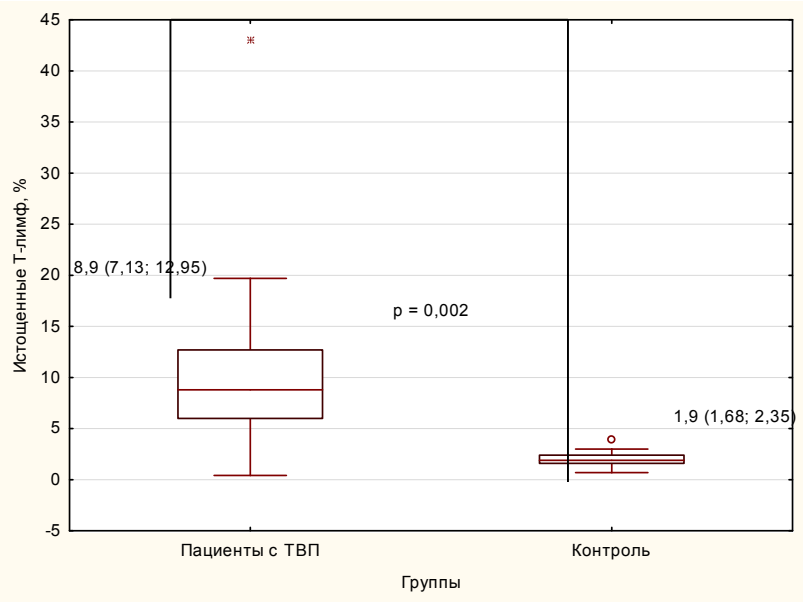


Рисунок 5. – Процентное содержание истощенных Т-лимфоцитов у пациентов из группы с ТВП и пациентов контрольной группы

Стоит обратить внимание на определенные изменения в соотношении субпопуляций Т-клеток, имевшие место у пациентов с инфекционной патологией. Доля претерминально-дифференцированных эффекторных Т-клеток (TEM; CD3+CD62L-CD45RA-) и терминально-дифференцированных эффекторных Т-клеток (TEMRA; CD3+CD62L-CD45RA+) была выше у пациентов с внегоспитальной пневмонией (25,0% (18,3; 31,0) и 14,0% (9,2; 23,0) соответственно), по сравнению с контрольной группой (17,3% (16,3;

21,4) и 7,8% (5,9 и 10,3) соответственно). При этом доля наивных Т-клеток (naïve; CD3+CD62L+CD45RA+), а также клеток центральной памяти (TCM; CD3+CD62L+CD45RA-) у пациентов основной группы исследования ниже (23,0% (12,6; 38) и 28,5% (22,3; 36,2), соответственно), чем в контрольной группе (41,9% (34,6; 46,8) и 33,2% (30,14 35,0) соответственно).

Заключение. При внегоспитальной пневмонии тяжелого течения результаты исследования иммунофенотипа лейкоцитов показали снижение как клеточного (в частности, уменьшение количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, естественных киллеров (NK-клеток), NKT-клеток, регуляторных Т клеток с одновременным увеличением истощенных Т-лимфоцитов), так и гуморального звена иммунитета, а именно субпопуляции В1-клеток. Таким образом, у пациентов с внегоспитальными пневмониями тяжелого течения имеет место бактериально-индуцированная иммуносупрессия.

Литература

1. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых [Электронный ресурс] / Российское респираторное общество (РРО), Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ). – 2014. – Режим доступа: https://minzdrav.gov-murman.ru/documents/poryadki-okazaniya-meditsinskoy-pomoshchi/TyagelayaVP%20(1).pdf. – Дата доступа: 02.11.2020.

2. Антонов, В.Г. Патогенез онкологических заболеваний: иммунные и биохимические феномены и механизмы. Внеклеточные и клеточные механизмы общей иммунодепрессии и иммунной резистентности / В.Г. Антонов, В.К. Козлов // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 8-20.

3. Синдром полиорганной недостаточности у больных перитонитом / В.А. Гологорский [и др.] // Хирургия. – 1988. – № 2. – С. 73-76.

4. Клинический протокол диагностики и лечения пневмоний: приложение 2 к приказу М-ва здравоохранения Респ. Беларусь 05.07.2012, № 768.

5. A guide to modern statistical analysis of immunological data / B. Genser [et al.] // BMC Immunol. – 2007. – Vol. 8. – P. 27. doi: 10.1186/1471-2172-8-27.

INDICATORS OF CELLULAR IMMUNITY AS A PROGNOSTIC CRITERION IN PATIENTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA HEAVY FLOW

[1]Rusina V.V., [1]Kabanova Yu. A., [2]Zakharova A.G., [2]Dotsenko E.A.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus,

[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Community-acquired pneumonia is a widespread disease in adults that occupies a leading place in the structure of morbidity and mortality from infectious diseases in developed countries. The greatest problem for doctors is patients with severe community-acquired pneumonia, since the mortality rate in this category of patients remains high, and treatment is complex and expensive. One of the leading causes of complicated and prolonged course of pneumonia is currently a change in the immunological reactivity of the body. Previously, all the attention of scientists was focused on the study of excessive activation of the immune system, but now more and more efforts are being directed to the study of bacterial-induced immunosuppression. The search for reliable prognostic markers of immunosuppression in pneumonia in the future will allow the most effective use of drugs aimed at correcting the patient's immune status. Studies have shown that in patients with severe community-acquired pneumonia pneumonia, the number of T-lymphocytes, t-helper cells, natural killer cells (NK cells), NKT cells, regulatory T cells, as well as a subpopulation of B1 cells decreases with a simultaneous increase in depleted T-lymphocytes, which are characterized by reduced cytokine production and proliferative activity.

Keywords: pneumonia, immune system, cellular immunity, immunosuppression, T-lymphocytes, B-lymphocytes, prognostic criterion.

Поступила 04.11.2020

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ К КРАСНУХЕ У НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

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

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

Резюме. Плановая вакцинация против краснухи детей обоего пола проводится в Республике Беларусь с 1996 года, в 2006 году она была дополнена кампанией вакцинации лиц 11-19 лет. С целью изучения популяционного иммунитета было исследовано наличие IgG к вирусу краснухи у 701 жителя Республики Беларусь, проведенное с использованием наборов ИФА «Эколаб», Россия. Специфические антитела в защитной концентрации имели 669 (95,44%) обследованных лиц. Доля иммунных к краснухе лиц во всех регионах страны и в каждой из пяти возрастных групп населения (2-5, 6-15, 16-23, 24-32, 33-45 лет) составила более 90%, что превышало базовый уровень, достаточный для предотвращения передачи вируса (84-88%). Представленные данные подтверждают высокую эффективность применяемой в стране тактики вакцинации.

Ключевые слова: краснуха, популяционный иммунитет, вакцинопрофилактика, Беларусь.

Введение. В Республике Беларусь специфическая профилактика краснухи включает плановую вакцинацию детей в возрасте 12 месяцев с использованием вакцины корь-паротит-краснуха (КПК), проводимую с 1996 г., и ревакцинацию детей в возрасте 6 лет, начатую в 2000 г. В 2006 г. эти мероприятия были дополнены кампанией иммунизации, включавшей лиц 11-19 лет обоего пола и проведенной с использованием моновакцины против краснухи. Начиная с 2007 г. в стране регистрируются единичные завозные, или связанные с завозными, случаи краснухи, и подтверждено отсутствие эндемичной циркуляции вируса краснухи. Вместе с тем, важным инструментом в надзоре за вакциноуправляемыми инфекциями являются сероэпидемиологические исследования, позволяющие отслеживать эффективность принятой тактики вакцинации и проводить, при необходимости, ее корректировку [1].

Материалы и методы исследования. Для оценки популяционного иммунитета к краснухе на наличие IgG антител к вирусу краснухи были исследованы сыворотки крови 701 человека в возрасте 2-45 лет из всех 7 областей Республики Беларусь (Брестской – 97, Витебской – 98, Гомельской – 97, Гродненской – 99, Минской – 103, Могилевской – 99 и г. Минска – 108), отобранных методом случайной выборки в апреле 2019 г. в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25.03.2019 № 360 «Об оценке состояния популяционного иммунитета». От каждого обследуемого было получено информированное согласием на проведение исследования. Возрастную структуру иммунных оценивали в группах населения 2-5, 6-15, 16-23, 24-32 и 33-45 лет из которых лица в возрасте 2-5 лет подлежали однократной плановой вакцинации вакциной КПК, в возрасте 6-15 лет и 16-23 лет – двухкратной вакцинации вакциной КПК, в возрасте 24-32 лет – иммунизации краснушной моновакциной в кампанию вакцинации в 2006 г., лица 33 лет и старше – не подлежали вакцинации.

Антитела класса IgG к вирусу краснухи выявляли с использованием иммуноферментной тест-системы Эколаб, Россия. Концентрацию антител рассчитывали в мМЕ/мл в соответствии с инструкцией производителя. Пороговой концентрацией считали 10 мМЕ/мл. Сыворотки с антителами в концентрации менее 8 мМЕ/мл рассматривались как негативные, от 8 до 10 мМЕ/мл – как сомнительные, 11 мМЕ/мл и более – как позитивные.

Результаты исследования и их обсуждение. Проведенные исследования показали, что IgG антител к вирусу краснухи в защитной концентрации имели 669 (95,44%) из 701 обследованного. Во всех областях страны доля иммунных к краснухе лиц составила более 90%: от 93,88% в Витебской области до 96,91% в Брестской области. Согласно принятой международной практике уровень иммунитета к краснухе 84-88% считается достаточным для предотвращения трансмиссии возбудителя в популяции [2].

Анализ возрастного распределения показал, что уровень серопозитивных во всех возрастных группах превышал 90% и был наиболее высоким у детей 2-5 лет (98,46%), недавно привитых вакциной КПК (таблица). Далее с возрастом доля серопозитивных несколько снижалась и, несмотря на проведенную в 6 лет ревакцинацию, составила 97,12% в возрасте 6-15 лет и 92,39% в возрасте 16-23 года. В возрастной группе 24-32 года, которая представлена лицами, не подлежавшими плановой иммунизации против краснухи, однако попавшими в возрасте 11-19 лет в число вакцинированных в рамках кампании вакцинации в 2006 г., уровень серопозитивных также оказался достаточно высоким (95,21%). В возрастной группе 33-45 лет уровень серопозитивных составил 96,53%.

Таблица. – Популяционный иммунитет к краснухе в возрастных группах населения Республики Беларусь, 2019 г.

Возраст, лет	Число обследованных	Число серопозитивных	Доля серопозитивных, %	Среднегрупповая концентрация антител, мМЕ/мл
2-5	65	64	98,46% ±1,53	215,81±30,37
6-15	104	101	97,12%±1,64	128,08±13,35
16-23	184	170	92,39%±1,95	149,26±17,54
24-32	146	139	95,21%±1,77	245,42±18,91
33-45	202	195	96,53%±1,29	238,82±16,92
2-45	701	669	95,44%±0,79	197,82±8,65

Анализ напряженности популяционного иммунитета (среднегрупповая концентрация антител у серопозитивных) показывает, что во всех возрастных группах он был достаточно высоким и превышал минимальную защитную концентрацию (11 мМЕ/мл) в 10 и более раз. Высокая концентрация поствакцинальных антител (215,81 мМЕ/мл) отмечалась в возрастной группе 2-5 лет, далее в отсутствии естественного бустирования циркулирующим вирусом она постепенно снижалась, составляя 128,08-149,26 мМЕ/мл среди лиц 6-23 лет. У лиц старше 23 лет отмечалось повышение среднегрупповой концентрации антител, косвенно свидетельствующее о том, что антитела имели преимущественно постинфекционный характер.

Выявленные среди 701 обследованного 32 человека, не имеющие антител к вирусу краснухи, относились к различным возрастным группам: 1 – 2-5 лет, 3 – 6-15 лет, 14 – 16-23 года, 4 – 24-32 года, 7 – 33-45 лет. Хотя число серонегативных к краснухе лиц в целом невелико, подавляющее большинство из них относится к репродуктивному возрасту, что свидетельствует о существующем риске инфицирования во время беременности и целесообразности исследования IgG к краснухе при планировании беременности.

Сравнение данных, полученных в 2019 г., с результатами изучения популяционного иммунитета к краснухе в 2011 г., свидетельствует о том, что несмотря на отсутствие бустерного эффекта циркулирующим вирусом краснухи, популяционный иммунитет сохранялся на достаточно высоком уровне (93,8±0,9% – в 2011 г., 95,44%±0,79 – 2019 г.), подтверждая эффективность использованной в стране тактики вакцинации [3]. Высокий

охват плановой вакцинацией против краснухи и проведенная в 2006 г. дополнительная кампании вакцинации лиц 11-19 лет обеспечили создание высокого уровня иммунной прослойки среди детей, подростков и молодых взрослых, среди лиц в возрасте 33 лет и старше она обеспечена за счет перенесенной ранее инфекции.

Литература

1. Dietz, V. Assessing and monitoring vaccination coverage levels: lessons from the Americas / V. Dietz, L. Venczel, H. Izurieta // Rev. Panam. Salud. Publica. 2004. – Vol. 16, No. 6. – P. 432-442.

2. Мэй, Р. Инфекционные болезни человека. Динамика и контроль / Р. Мэй, Р. Андерсон; пер. с англ. – М.: Мир, «Научный мир», 2004. – 784 с.

3. Популяционный иммунитет к краснухе в Республике Беларусь в 2011 г. / Е.О. Самойлович [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. – Электрон. дан. (6,4 Мб). – Минск: РНМБ, 2012. – Вып. 5. – С. 261-264. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

HERD IMMUNITY TO RUBELLA IN THE REPUBLIC OF BELARUS

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

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

Routine vaccination against rubella in children of both sexes has been carried out in the Republic of Belarus since 1996, in 2006 it was supplemented by a vaccination campaign for persons 11-19 years of age. A study of IgG antibodies to rubella virus in 701 residents of the Republic of Belarus, carried out using the ELISA kits Ecolab, Russia, showed that 669 (95.44%) of them had antibodies in a protective concentration. The proportion of immune to rubella in all regions of the country and in each of the five age groups of the population (2-5, 6-15, 16-23, 24-32, 33-45 years of age) was more than 90% and exceeded the baseline level sufficient to prevent transmission of the virus (84-88%). The data presented confirm the high efficiency of the vaccination tactics used in the country.

Keywords: rubella, herd immunity, immune prophylaxis, Belarus.

Поступила 06.11.2020

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ COVID-19

[1]Скребло Е.И., [1]Головко Е.С., [2]Скребло В.Э., [1]Голюченко О.А., [1]Жильцов И.В.

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

[2]Государственное учреждение здравоохранения «Витебская городская центральная клиническая больница», Витебск, Республика Беларусь

Резюме. Лечение пациентов с тяжёлым течением COVID-19 является комплексной проблемой. Изучение патогенетических механизмов этого заболевания позволило бы повысить эффективность лечения таких пациентов. Поскольку фагоцитирующие клетки иммунной системы играют ключевую роль в развитии осложненного течения COVID-19, своевременное выявлений их дисфункции может явиться значимым фактором оценки прогноза развития осложнений, а также гиперпродукции интерлейкина-6. У пациентов с тяжелым течением COVID-19 нами обнаружено повышение базальной кислород-продуцирующей активности нейтрофилов и снижение индекса респираторного резерва и поглотительной способности нейтрофилов, что является подтверждением истощения способности клеток системы иммунитета адекватно реагировать на инфекцию бактериальной природы и может быть одним из патогенетических факторов, определяющих риск присоединения тяжелых бактериальных осложнений.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, пневмония, НСТ-тест, фагоцитоз.

Введение. В настоящее время весьма актуальной является проблема ведения пациентов с новой коронавирусной инфекцией, имеющих тяжелое течение заболевания.

Этиологическим фактором данного заболевания является вирус SARS-CoV-2, относящийся к большому семейству вирусов с РНК-позитивной цепью (+ssRNA), представляющий собой бета-коронавирус диаметром около 60-140 нм округлой или плеоморфной формы, имеющий на поверхности так называемую «корону», образованную спайк-гликопротеинами [1]. Спайк-протеины, связываясь с рецептором к ангиотензину на клетках легочной и других тканей, обеспечивают проникновение вируса в клетку. Обсуждается также роль CD-147 (экспрессированного в том числе на лейкоцитах) в инвазии клеток SARS-CoV-2. Показано, что репликация вирусного генома в клетках организма-хозяина сопряжена с подавлением врожденного иммунитета [2].

В патогенетическом механизме развития вирусной пневмонии особую роль играет способность вируса вызывать избыточный иммунный ответ, в некоторых случаях представляющий собой «цитокиновый шторм», что приводит к повреждению ткани и нарушению коагуляции (формированию микротромбов в сосудах легких) [3]. Описано значительное количество цитокинов, участвующих в воспалительном каскаде (фактор некроза опухолей-альфа; интерлейкины 1-бета, 8, 12; протеин, индуцированный интерфероном-гамма; макрофагальный воспалительный протеин 1А; моноцитарный хемоаттрактантный протеин 1), однако «главным героем», несомненно, является интерлейкин-6 (ИЛ-6). ИЛ-6 продуцируется главным образом активированными лейкоцитами и действует на большое количество клеток и тканей. Он способен стимулировать дифференцировку В-лимфоцитов, продукцию острофазных белков, стимулировать рост одних и подавлять рост других клеток, участвует в терморегуляции, функционировании центральной нервной системы. Также, наряду с провоспалительными, описаны противовоспалительные эффекты ИЛ-6. Кроме ИЛ-6 большое значение в развитии пневмонии и фиброза придается Toll-like-рецепторам, присоединение коронавируса к которым индуцирует высвобождение про-ИЛ-1β [4].

Обсуждается роль таких патофизиологических механизмов, как синдром гиперактивности макрофагов и гемофагоцитраный синдром, нетоз нейтрофильных лейкоцитов (как одной из причин синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС)) в развитии тяжелого течения COVID-19.

Клинические проявления SARS-CoV-2-инфекции различаются по тяжести течения. По литературным данным у 81% пациентов наблюдалось нетяжелое течение (отсутствие пневмонии или легкая пневмония). В 14% случаев наблюдалось тяжелое течение (одышка, частота дыхания 30 и более в минуту, сатурация крови 93% и менее, PaO2/FiO2<300 и нарастание инфильтратов в легких на >50% в пределах 24-48 часов). Критическое течение заболевания (дыхательная недостаточность, септический шок и/или мультиорганная дисфункция) наблюдалось в 5% случаев [5].

Для COVID-19 характерно снижение количества лейкоцитов крови (приблизительно у 30%), преимущественно, за счет лимфоцитов, при этом лимфопения рассматривается как прогностически неблагоприятный фактор. Повышение соотношений нейтрофилы/лимфоциты и тромбоциты/лимфоциты может быть проявлением цитокинового шторма [6].

Тяжесть течения заболевания обусловлена развитием тяжелого острого респираторного дистресс-синдрома и бактериальных осложнений (тяжелой пневмонии, сепсиса, септического шока). Важнейшую роль в формировании противоинфекционного иммунитета играют нейтрофилы, которые за счет фагоцитоза и переваривания, дегрануляции и выработки активных форм кислорода (АФК) обеспечивают разрушение патогена. Доказано наличие на нейтрофилах рецепторов для распознавания микроорганизмов (Toll-like-рецепторов), активация которых запускает каскад провоспалительных реакций, направленных на блокирование жизнедеятельности патогена, а также стимулирует начальные этапы развития реакций приобретенного иммунитета, определяя тип иммунного ответа. Дефект активации нейтрофилов может приводить к выраженной дисрегуляции защитных реакций [7, 8].

С учетом вышесказанного, представляет интерес исследование функциональной активности фагоцитирующих клеток крови у пациентов с тяжелым течением COVID-19. Выявление закономерностей изменения активности фагоцитов можно рассматривать как потенциальный прогнозный фактор риска развития тяжелого течения COVID-19 вследствие развития бактериальных осложнений и гиперпродукции ИЛ-6.

Целью исследования было оценить функциональную активность нейтрофильных фагоцитов периферической крови у пациентов с инфекцией COVID-19, имеющих тяжелое течение заболевания.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на базе государственного учреждения здравоохранения «Витебская городская центральная клиническая больница», клинико-диагностической лаборатории учреждения здравоохранения «Витебский областной диагностический центр», кафедры персонализированной и доказательной медицины ФПК и ПК учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

В исследование включили 38 пациентов, находившихся на лечении в отделении анестезиологии и реанимации возрасте от 47 до 83 лет (средний возраст 66,45±10,97 лет), из них мужчин – 12, женщин – 26. У всех обследованных пациентов диагностировано тяжелое течение внегоспитальной вирусной (COVID-19) двусторонней интерстициальной пневмонии. Диагноз подтверждался рентгенологически (компьютерная томография органов грудной клетки с оценкой степени поражения легких), а также лабораторно (исследование смыва из носо- и ротоглотки методом ПЦР). Все пациенты нуждались в респираторной поддержке кислородом. Контролем служили здоровые добровольцы. Группы были сопоставимы по полу и возрасту.

Иммунологическое обследование проводилось на 1-2 день поступления в отделение реанимации. Функциональную активность нейтрофилов оценивали по способности к поглощению микроорганизмов и продукции АФК.

Поглотительную способность нейтрофилов определяли в реакции фагоцитоза с использованием убитой нагреванием суспензии *Staphylococcus aureus* (штамм АТСС 25923) в концентрации 10^8 клеток/мл. Кровь (0,1 мл) смешивали с *S. aureus* (0,1 мл) в U-образных лунках планшеты, инкубировали 30 мин при 37ºС с последующим приготовлением окрашенных мазков и оценкой фагоцитарного индекса (ФИ). Продукцию нейтрофилами АФК оценивали в реакции спонтанного ($НСТ_б$) и стимулированного суспензией *S. aureus* восстановления нитросинего тетразолия ($НСТ_с$) с микроскопической оценкой в окрашенных мазках процентного содержания диформазан-положительных гранулоцитов. Для характеристики функционального резерва нейтрофилов рассчитывали индекс респираторного резерва (ИРР) – по формуле: $ИРР = (НСТ_с – НСТ_б) / НСТ_с$.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием ППП Statistica 10. При анализе нормальности распределения с использованием критерия Колмогорова-Смирнова все исследуемые показатели имели нормальное распределение, что обусловило применение методов параметрической статистики.

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ показателей функциональной активности фагоцитирующих клеток выявил значимое повышение базальной активности нейтрофилов и, как следствие, снижение ИРР по сравнению со значениями у здоровых лиц (таблица).

Таблица. – Показатели функциональной активности фагоцитирующих клеток у пациентов с тяжелым течением COVID-19

Показатель, ед. изм.	*Пациенты, n = 38*	*Контроль, n = 26*	*p<0,05*
$НСТ_б$, %	32,2±2,3	12,2±1,2	*
$НСТ_с$, %	60,3±2,2	54,9±2,0	
ИРР	0,49±0,03	0,78±0,02	*
ФИ, %	53,4±1,9	71,9±1,5	*

Как известно, фагоцитирующие клетки, реализуя кислород-зависимую цитотоксичность, вырабатывают кислородные радикалы (O_2^-, H_2O_2, $OH^·$ и др.), которые являются важными факторами для внутриклеточного киллинга. Следовательно, базальная и стимулированная метаболическая активность нейтрофилов в НСТ-тесте является отражением их способности к завершенному фагоцитозу [7, 8].

Нами выявлено статистически значимое повышение показателя базального НСТ-теста у обследованных пациентов по сравнению со здоровыми лицами, при этом показатель стимулированного НСТ-теста статистически значимо не отличался. Индекс респираторного резерва был статистически значимо ниже у пациентов с COVID-19.

Исследование поглотительной активности нейтрофилов у пациентов с тяжелым течением COVID-19 показало статистически значимое снижение активности фагоцитоза.

Эти изменения указывают на присутствие бактериальной инфекции на фоне выраженного снижения функционального резерва фагоцитирующих клеток (истощения), что может указывать на риск утяжеления инфекции и ухудшения прогноза.

Заключение. У пациентов с тяжелым течением COVID-19 обнаружено повышение базальной кислород-продуцирующей активности нейтрофилов и снижение индекса респираторного резерва и поглотительной способности нейтрофилов, что является под-

тверждением истощения способности клеток системы иммунитета адекватно реагировать на инфекцию бактериальной природы и может быть одним из патогенетических факторов, определяющих риск присоединения тяжелых бактериальных осложнений. На наш взгляд, необходимо дальнейшее исследование сдвигов функциональных показателей клеточного иммунитета с целью использования их в комплексной оценке прогноза у пациентов с тяжелым течением COVID-19.

Литература

1. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan / J.F. Chan [et al.] // Emerg. Microbes Infect. – 2020. – Vol. 9, No. 1. – P. 221-236.
2. MED-ACE2-COVID19 study group. Use of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors and risk of COVID-19 requiring admission to hospital: a case-population study / F.J. de Abajo [et al.] // Lancet. – 2020. – Vol. 395. – P. 1705-1714.
3. Microvascular COVID-19 lung vessels obstructive thromboinflammatory syndrome (Micro-CLOTS): an atypical acute respiratory distress syndrome working hypothesis / F. Ciceri [et al.] // Crit. Care Resusc. – 2020. – Vol. 22, No. 2. – P. 95-97.
4. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies / P. Conti [et al.] // J. Biol. Regul. Homeost. Agents. – 2020. – Vol. 34, No. 2. – P. 327-331.
5. Wu, Z. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in china: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention / Z. Wu, J.M. McGoogan // JAMA. – 2020. – Vol. 323, No. 13. – P. 1239-1242.
6. The diagnostic and predictive role of NLR, d-NLR and PLR in COVID-19 patients / A.P. Yang [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2020. – Vol. 84. – P. 106504.
7. Нейтрофильные гранулоциты – ключевые клетки иммунной системы / И.В. Нестерова [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9, № 4. – С. 432-435.
8. Molne,L. Role of neutrophil leukocytes in cutaneous infection caused by *Staphylococcus aureus* / L. Molne, M. Verdrengh, A. Tarkowski // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68, No. 11. – P. 6162-6167.

FUNCTIONAL NEUTROPHILS ACTIVITY IN PATIENTS WITH SEVERE COVID-19

[1]Skreblo E.I., [1]Golovko E.S., [2]Skreblo V.E., [1]Golyuchenko O.A., [1]Zhyltsou I.V.

[1]Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus
[2]Vitebsk City Central Clinical Hospital, Vitebsk, Republic of Belarus

Treatment of patients with severe COVID-19 infection is a complex problem. Studying of the pathogenetic mechanisms of this disease would increase the effectiveness of the treatment of such patients. Phagocytic cells of immune systems play a key role in the development of the complicated course of COVID-19 infection. The timely detection of their dysfunctions can be a significant factor in assessing the prognosis of complications, as well as the overproduction of interleukin-6. In patients with severe COVID-19 infection, we found an increase in the basal oxygen-producing activity of neutrophils and a decrease in the respiratory reserve index and ingestive ability of neutrophils. These foundings confirm the depletion of the ability of immune cells to respond adequately to bacterial infection. Such changes may be pathogenetic factors determining the risk of severe bacterial complications development.

Keywords: coronavirus infection, pneumonia, nitroblue tetrazolium test, phagocytosis.

Поступила 15.10.2020

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Тезисы республиканской научно-практической конференции с международным участием «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии», 10 ноября 2020 г. (в режиме онлайн)

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ШТАММОВ *SALMONELLA ENTERICA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С САЛЬМОНЕЛЛЕЗОМ

[1]Бакаева Т.Н., [2]Клюйко Н.Л., [1]Титов Л.П.

[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь
[2]Учреждение здравоохранения «Городская детская инфекционная клиническая больница», Минск, Республика Беларусь

Введение. Сальмонеллезы занимают ведущее место в структуре острых кишечных инфекций бактериальной этиологии во всем мире. Для лечения сальмонеллеза, протекающего в тяжелой форме, широко назначают антимикробные препараты. Кроме того, в ветеринарии в лечебных и профилактических целях также применяются антибиотики, что способствует формированию резистентных форм бактерий и их распространению. ВОЗ включила *Salmonella enterica* в список «приоритетных патогенов», нарастание устойчивости, которых к антибиотикам приобрела наибольшую угрозу для человечества [1]. Мониторинг резистентности популяции сальмонелл к антибиотикам является актуальным, имеет важное клиническое и эпидемическое значение, как в глобальном, так и региональном аспекте, включая Беларусь.

Цель исследования – изучить фенотипическую антибиотикорезистентность и определить детерминанты резистентности изолятов *Salmonella enterica*, выделенных у пациентов городской инфекционной больницы г. Минска в период апрель-июль 2020 г.

Материалы и методы исследования. В работе были исследованы 58 клинических изолятов сальмонелл. Определялась чувствительность к 16 АМП различных групп: бета-лактамам (включая карбапенемы), фторхинолонам, аминогликозидам, нитрофуранам, триметоприм/сульфаметоксазолу. Использовали диско-диффузионный метод в агаре Мюллера-Хинтон, а также определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) с помощью анализатора VITEK-2. Интерпретацию результатов проводили согласно Клиническим рекомендациям EUCAST [2].

Гены, кодирующие продукцию бета-лактамаз групп TEM-1, SHV-1, CMY-2 определяли методом ПЦР со специфическими праймерами с электрофоретической детекцией. Для выявления генов класса CTX – M использовали ПЦР в режиме «реального времени» с набором АмплиСенс ESBL CTX-M-FL. Детекцию генетических детерминант резистентности к фторхинолонам (генов parC, gyrA, gyrB) проводили методом мультиплексной ПЦР.

Результаты исследования и ихобсуждение. В возрастной структуре заболевших сальмонеллезом доминировали дети до 12 лет (74,1%), пациенты старше 18 лет составили 17,2% от общего числа пациентов. Подавляющее большинство изолятов принадлежали серотипу *Salmonella enteritidis* 94,8%, лишь 5,2 % относились к *Salmonella*

typhimurium. Все исследованные штаммы сальмонелл были чувствительны к карбапенемам и аминогликозидам. Умеренную устойчивость к пенициллинам (ампициллину, пиперациллину, тикарциллину) проявляли 8,6% штаммов. К ингибиторзащищенным пенициллинам штаммы сальмонелл были в 98% чувствительны. 8(13,7%) штаммов сальмонелл демонстрировали резистентность к цефалоспоринам III поколения (цефтазидиму, цефтриаксону), к препаратам IV поколения (цефепиму) были устойчивы 2 штамма (3,4%). Наибольшая резистентность сальмонелл в проанализируемой выборке отмечалась к фторхинолонам – 20%. Штаммы *S. typhimurium* имели несколько фенотипов резистентности: пенициллины + фторхинолоны + триметоприм/сульфаметаксозол; пенициллины+ фторхинолоны + триметоприм/сульфаметаксозол; пенициллины. Выраженная полирезистентность отмечена у 2 штаммов *Salmonella enteritidis* (бета-лактамы, фторхинолоны, азтреонам, нитрофураны). Доля устойчивых к 1-2 классам антибиотиков штаммов сальмонелл составила 27%.

Молекулярно-генетическое исследование показало, что резистентность к аминопенициллинам была обусловлена продукцией бета-лактамаз генетического семейства TEM-1. Генов бета-лактамаз SHV-1 типа, OXA-1, CMY-2 не было выявлено. В процессе анализа данных по выявлению генетических детерминант резистентности к фторхинолонам установлены наличие гена parC, кодирующего субъединицу фермента топоизомеразы IV и gyrA, приводящего к изменению структуры фермента ДНК-гиразы (топоизомеразы II). Наличие детерминант резистентности гена gyrA и ген parC одновременно приводит к более высокому уровню резистентности к фторхинолонам (МПК – 2 мг/л).

Кроме того, при определении МПК 4 штамма сальмонелл, которые при тестировании диско-диффузионным методом по критериям оценки рассматривались как чувствительные к фторированным хинолонам, с концентрацией МПК 0,25-0,5 мг/л показали пониженную чувствительность к ципрофлоксацину.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о развитии процесса формирования устойчивости в популяции бактерий Salmonella enterica к фторхинолонам. Сопоставлением данных бактериологического и генетического тестирования обнаружены изоляты сальмонелл, несущие гены резистентности к ципрофлоксацину, но не сформировавших выраженную клиническую устойчивость к нему. Идентификация генетических детерминант резистентности среди изолятов сальмонелл с подтвержденной фенотипической бета-лактамазной активностью, выявила присутствие лишь генов класса TEM-1.

Ключевые слова: сальмонеллы, антибиотикорезистентность, гены резистентности, бета-лактамы, фторхинолоны.

Литература

1. Akinyemi, K.O. Factors contributing to the emergence and spread of antibiotics resistance in Salmonella species / K.O. Akinyemi, S.O. Ajoseh // In: Current Topics in Salmonella and Salmonellosis / ed.: M. Mares. – IntechOpen, 2017. doi: 10.5772/67701.

2. Expert rules and intrinsic resistance / The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [Electronic resource]. – Mode of access: https://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/. – Date of access: 05.10.2020.

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *SALMONELLA ENTERICA* STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS WITH SALMONELLOSIS

[1]Bakaeva T.N., [2]Kluiko N.L., [1]Titov L.P.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus
[2]Children's infectious diseases clinical hospital Minsk, Republic of Belarus

Resistance to fluoroquinolones was found most often among the studied *Salmonella* strains. In the process of analyzing the data to identify the genetic determinants of resistance to fluoroquinolones, the presence of the parC and gyrA gene was established. The presence of resistance determinants of the gyrA gene and the parC gene simultaneously leads to a higher level of resistance to fluoroquinolones (MIC-2 mg/l). 13.7% of *Salmonella* were beta-lactam resistant, excluding carbapenems. Molecular genetic research showed that resistance to aminopenicillins was due to the production of beta-lactamases of the TEM-1 genetic family.

Keywords: salmonella, antibiotic resistance, resistance genes, beta-lactams, fluoroquinolones.

Поступили 07.10.2020

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ К ПАРВОВИРУСУ В19 У МУЖЧИН И ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Ермолович М.А., Самойлович Е.О.

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

Парвовирус В19 (В19Parvovirus – В19Р) является возбудителем разнообразных клинических синдромов, основным из которых является инфекционная эритема («пятая болезнь»). Распространение В19Р происходит преимущественно воздушно-капельным путем, также возможна парентеральная и вертикальная передача возбудителя [1]. Ранее проведенные исследования показали, что 51,8% населения Республики Беларусь в возрасте от 0 до 68 лет имеют IgG антитела к В19Р, свидетельствующие о ранее перенесённой инфекции, что подтверждает широкое распространение возбудителя на территории страны. Наиболее высокая доля иммунных лиц была выявлена в возрастной группе 40-44 года и составила 85,1%. Динамика изменения доли иммунных лиц в возрасте от 0 до 44 лет характеризовалась выраженной линейной тенденцией к росту, свидетельствующей о наличие первичного инфицирования В19Р как детей, так и взрослых репродуктивного возраста [2]. Однако эпидемиологические данные пациентов, участвовавших в этом исследовании, не включали информацию о гендерной принадлежности. Вместе с тем проведенные нами исследования и данные литературы свидетельствуют о том, что среди взрослых пациентов с парвовирусной инфекцией преобладают женщины [3, 4]. В связи с этим представляло интерес проанализировать динамику нарастания доли иммунных отдельно среди взрослых женщин и мужчин.

Для анализа популяционного иммунитета среди женщин и мужчин репродуктивного возраста в Республике Беларусь было проведено изучение концентрации IgG антител к В19Р у 420 человек (по 210 женщин и мужчин) в возрасте 18-39 лет. Сыворотки

крови были собраны в 2019 г. методом случайной выборки для изучения популяционного иммунитета к вакциноуправляемым инфекциям. При проведении анализа обследованные были разбиты на возрастные группы 18-24 года, 25-29 лет, 30-34 года, 35-39 лет.

Наличие IgG антител к B19P определяли методом ИФА с использованием коммерческого набора «Serion ELISE classic Parvovirus B19 IgG», Virion/Serion, Германия, для количественного анализа. Концентрацию антител, соответствующую оптической плотности образца с учетом корректирующего коэффициента, определяли по стандартной кривой, прилагаемой к каждой серии набора (рассчитана на основе стандарта ВОЗ «Международный стандарт для IgG антител к парвовирусу B19 в плазме человека код 01/6012»), и выражали в МЕ/мл. В соответствии с рекомендациями производителя, результат расценивали как положительный при содержании антител 5 МЕ/мл и выше, как отрицательный – при содержании антител менее 3 МЕ/мл, и как пограничный при содержании антител от 3 до 5 МЕ/мл.

В возрастной группе 18-39 лет доля лиц, имевших IgG антитела к B19P, среди мужчин составила 67,1%, среди женщин доля таких лиц была несколько меньше, составив 62,4%, хотя достоверно не отличалась. Дальнейший анализ, проведенный с разбивкой по возрастным группам с интервалом в 5 лет (за исключением группы 18-24 года, включающей интервал 7 лет), свидетельствовал, что такое соотношение доли иммунных наблюдается не во всех возрастах.

Таблица. – Доля серопозитивных к парвовирусу B19 среди женщин и мужчин в возрасте 18-39 лет, Республика Беларусь

Возраст	Женщины			Мужчины		
	Обследовано	Число серопозитивных	% серопозитивных (95% ДИ)	Обследовано	Число серопозитивных	% серопозитивных (95% ДИ)
18-24	36	17	47,2 (30,9-63,5)	28	19	67,9 (50,6-85,2)
25-29	59	29	49,2 (36,4-61,9)	70	46	65,7 (54,6-76,8)
30-34	67	47	70,2 (59,2-81,1)	62	43	69,4 (57,9-80,8)
35-39	48	38	79,2 (66,7-90,7)	50	33	66,0 (52,9-79,1)
Всего (18-39)	210	131	62,4 (55,8-68,9)	210	141	67,1 (60,8-73,5)

У мужчин доля иммунных достигла 67,9% (95% ДИ 50,6-85,2) уже в возрастной группе 18-24 года и сохранялась на этом уровне во всех исследованных возрастах вплоть до 39 лет. Доля иммунных среди женщин в возрасте 18-24 года была меньше (47,2% 95% ДИ 30,9-63,5), чем среди мужчин, однако вследствие небольшого числа обследованных различия не являлись достоверными. В отличие от ситуации среди лиц мужского пола, доля иммунных среди женщин быстро нарастала с возрастом, достигнув в группе лиц 35-39 лет 79,2% (95% ДИ 66,7-90,7) и достоверно превысив долю иммунных в возрасте 18-24 года ($P<0,05$).

Представленные сероэпидемиологические данные согласуются с имеющимися наблюдениям о существенном преобладании женщин среди пациентов репродуктивного возраста с парвовирусной инфекцией.

Ключевые слова: популяционный иммунитет, женщины, мужчины, IgG антитела, иммуноферментный анализ, Беларусь.

Литература

1. Heegaard, E.D. Human parvovirus B19 / E.D. Heegaard, K.E. Brown // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15, No. 3. – P. 485-505.
2. Ермолович, М.А. Распространенность IgG-антител к парвовирусу B19 среди жителей Республики Беларусь / М.А. Ермолович, А.М. Дронина, Е.О. Самойлович // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 2. – С. 27-32.
3. Nicolay, N. Clinical and epidemiological aspects of parvovirus B19 infections in Ireland, January 1996-June 2008 / N. Nicolay, S. Cotter // Euro Surveillance. – 2009. – Vol. 14. – P. 1-5
4. Клиническая характеристика суставного синдрома у пациентов с парвовирусной B19 инфекцией / Н.В. Климович, В.А. Матвеев, М.А. Ермолович, Е.О. Самойлович // ARS medica. – 2013. – № 1. – С. 41-48.

HERD IMMUNITY TO PARVOVIRUS B19 IN MEN AND WOMEN OF REPRODUCTIVE AGE

Yermalovich M.A., Samoilovich E.O.

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

To analyze herd immunity to parvovirus B19 among women and men of reproductive age in the Republic of Belarus, specific IgG antibodies was studied in 420 people (210 women and men each) aged 18-39 years. Blood sera were collected in 2019 by random sampling to study herd immunity to vaccine-preventable infections. The presence of IgG antibodies to B19P was determined by ELISA using a commercial kit "Serion ELISE classic Parvovirus B19 IgG", Virion / Serion, Germany. In men and women 18-39 years old, the proportion of immune individuals did not differ significantly and amounted to 67.1% and 62.4% respectively. Analysis by smaller age groups showed that in men the proportion of immune persons reached 67.9% (95% CI 50.6-85.2) already in 18-24 years old group and remained at this level up to 39 year olds. The proportion of the immune among women aged 18-24 years was 47.2% (95% CI 30.9-63.5) and rapidly increased with age, reaching 79.2% in 35-39 year olds (95% CI 66.7-90.7) that significantly exceeding the proportion of immune in 18-24 year olds group ($P < 0.05$). The seroepidemiological data presented are consistent with the observations of a significant predominance of women among patients with parvovirus infection of reproductive age.

Keywords: herd immunity, parvovirus B19, IgG antibodies, ELISA, women, men, Belarus.

Поступили 30.10.2020

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА «САНИТ Д» В ОТНОШЕНИИ ЯИЦ АСКАРИД

[1]Карамышева Ю.С., [1]Гудков В.Г., [2]Ладутько В.А., [2]Науменко А.И., [2]Рогова К.К.

[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр, эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь
[2]ЗАО «Санитарная оборона», Минск, Республика Беларусь

Введение. Борьба с геогельминтозами является актуальной социально-экономической задачей для многих стран, поскольку геогельминтами на нашей планете заражено около 1,5 миллиарда человек [1]. В Республике Беларусь в 2019 г. заболеваемость аскаридозом составляла 17,4 случаев на сто тысяч жителей.

Дезинвазионные мероприятия, являющиеся необходимой частью комплекса мер борьбы с гельминтозами, осложняются тем, что яйца гельминтов, в том числе аскарид (*Ascaris lumbricoides*), обладают высокой устойчивостью к воздействию факторов внешней среды различной природы, а в благоприятных условиях способны сохранять свою биологическую активность на протяжении нескольких лет. Это предполагает необходимость создания высокоэффективных в отношении яиц гельминтов дезинфицирующих средств.

Цель исследования – изучение овоцидной активности в отношении яиц аскарид нового дезинфицирующего средства «Санит Д».

Материалы и методы. Испытуемое дезинфицирующее средство «Санит Д», ТУ 692127919.017-2020. Концентрат, прозрачная жидкость без посторонних включений. Действующее вещество: перекись водорода (24,0%±6,0%), надуксусная кислота (4,25%±1,25%). Кроме того, в состав средства входят ингибитор коррозии, стабилизатор, питьевая вода.

Испытывалась серия А9-047010620, дата изготовления 06.2020, срок годности – 2 года от даты изготовления, производства ЗАО «Санитарная оборона», Республика Беларусь.

Овоцидное действие дезинфектанта изучалось с использованием патогенного биологического агента (ПБА) – яиц *A. lumbricoides* в формате суспензионного теста (смешивание в соотношении 1:1 суспензии тест-объекта ПБА и рабочего раствора дезинфектанта, экспозиция в определенных программой испытаний режимах: концентрация 0,25% – экспозиция 20 мин и 0,5% – 10 мин соответственно.

Учитывали количественное соотношение и морфологию яиц аскарид в параллельных пробах с использованием дезинфицирующего средства (опытные образцы) и без него (контрольные образцы). Методом световой микроскопии изучались нативные и окрашенные раствором метиленового синего микропрепараты при малом увеличении (объектив х10, окуляр х10), затем при большом увеличении (объектив х40, окуляр х10).

Определение жизнеспособности яиц гельминтов проводилось по следующим основным морфологическим признакам. Критерии жизнеспособности: яйца гельминтов не деформированы, оболочка яиц двойная, контуры чёткие, без видимых повреждений. Критерии нежизнеспособности: деформация яиц гельминтов (оболочка разорвана или прогнута внутрь, плазма мутная, разрыхлена).

Определение жизнеспособности яиц гельминтов на окрашенных микропрепаратах. Микроскопия препарата с окрашенным раствором метиленового синего (разведение 1:3) при малом увеличении (объектив х10, окуляр х10), затем при большом увеличении (объектив х40, окуляр х10). Критерии жизнеспособности: личинки мертвых яиц и внутреннее содержимое не окрашиваются в синий цвет. Критерии нежизнеспособности: личинки мертвых яиц и внутреннее содержимое окрашены в синий цвет [2].

Режимы испытания определялись согласно заявлению изготовителя.

Результаты исследования и обсуждение. Проведенные испытания показали, что применение дезинфицирующего средства «Санит Д» в рабочей концентрации 0,25% и экспозиции 20 мин приводило к утрате жизнеспособности 72,2±1,7% яиц аскарид, а в концентрации 0,5% при экспозиции 10 мин вызывало гибель 84,3%±4,9% яиц аскарид.

Оценивая результаты испытаний можно предположить, что изменение режима воздействия дезинфицирующего средства «Санит Д» в сторону увеличения концентрации рабочего раствора и времени экспозиции позволит повысить эффективность его овоцидного действия.

Заключение. Проведены испытания овоцидной активности в суспензионном тесте дезинфицирующего средства «Санит Д» производства ЗАО «Санитарная оборона» (Республика Беларусь).

Установлено, что испытанное средство проявляет овоцидную активность в отношении яиц *Ascaris lumbricoides.*

Результаты проведенных испытаний указывают на возможность повышения эффективности овоцидной активности испытанного средства путем увеличения его концентрации и времени экспозиции.

Ключевые слова: дезинфицирующее средство, овоцидная активность, аскариды.

Литература

1. Гельминтные инфекции, передающиеся через почву: информ. бюллетень ВОЗ, 2 марта 2020 г. [Электронный ресурс]. – 2020. – Режим доступа: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections. – Дата доступа: 01.12.2020.

2. Методы санитарно-паразитологических исследований: методические указания: утв. Гл. гос. санитар. врачом Рос. Федерации 23.07.2010, МУК 4.2.2661-10. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 63 с.

STUDY OF EFFECTIVENESS OF NEW DISINFECTANT "SANIT D" IN RELATION TO ASCARID EGGS

[1]Karamyshava Y.S., [1]Gudkov V.G., [2]Ladutska V.A., [2]Naumenko A.I., [2]Rogova K.K.

[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

[2]Company "Sanitarnaya Oborona", Minsk, Republic of Belarus

The ovocidal activity of the disinfectant «Sanit D» produced by Closed joint stock company "Sanitarnaya Oborona" ("Sanitary Defense"), Republic of Belarus, has been studied. The tested agent, in the regimes used, exhibits ovocidal activity against *Ascaris lumbricoides* eggs. The maximum effect was observed when using this agent at a concentration of 0.5% and exposure for 10 minutes, while viability was lost in 84.3±4.9% of Ascaris eggs.

Keywords: disinfectant, ovocidal activity, ascaris.

Поступили 08.12.2020

ВЫЯВЛЕНИЕ *BORDETELLA HOLMESII* КАК ВОЗБУДИТЕЛЯ КОКЛЮШЕПОДОБНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Колодкина В.Л., Мартынов В.С.

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

Введение. Коклюшная инфекция – контагиозное респираторное заболевание, в первую очередь вызываемое *Bordetella pertussis* [1]. Другие виды, такие как *B. parapertussis* и *B. holmesii*, признаны причинами синдрома со схожими клиническими проявлениями [1, 2]. При этом термин «коклюш» используется для заболевания, вызываемого непосредственно *B. pertussis*, тогда как коклюшеподобное заболевание более уместно использовать в отношении других этиологических агентов таких как *B. holmesii* – малоизученного патогена, который первоначально был идентифицирован в 1995 г. как редкая причина бактериемии [3].

Микробиологическая диагностика коклюша с помощью молекулярных тестов обеспечивает более высокую чувствительность и оперативность, чем бактериологический метод посева на питательные среды [4]. Большинство молекулярных диагностических наборов, используемых для обнаружения *B. pertussis,* используют мишень IS*481* – инсерционную последовательность, присутствующую в большом количестве копий в геноме *B. pertussis* [5]. Однако IS*481* не является специфической мишенью для *B. pertussis*, поскольку она также обнаружена у других видов *Bordetella*, включая *B. holmesii*, что приводит к недооценке этого патогена в данном клиническом исследовании [6].

На сегодняшний день зарегистрировано несколько случаев *B. holmesii*, связанных с коклюшноподобным заболеванием, в Северной и Южной Америке, Азии, Африке и Европе [4]. Кроме того, две важные вспышки инфекции, связанные с *B. holmesii*, были зарегистрированы во Франции и Огайо [6, 7].

Исследование носоглоточных мазков на наличие *B. holmesii* у пациентов с коклюшеподобными симптомами не проводились в Республике Беларусь, поскольку точное подтверждение наличия ДНК этого возбудителя требует использования ПЦР с праймерами к видоспецифическим генам-мишеням.

Цель исследования – провести видовую дифференциацию возбудителей рода *Bordetella* в клиническом материале пациентов с подозрением на коклюш/паракоклюш с использованием разработанных нами дуплексной TaqMan ПЦР, направленной на выявление *B. pertussis* и *B. parapertussis*, и моноплексной TaqMan ПЦР, направленной на выявление *B. holmesii.*

Материалы и методы. Материалом для исследования явились 3130 носоглоточных мазков пациентов с подозрением на коклюш/паракоклюш, поступивших с мая 2017 г. по сентябрь 2020 г. Носоглоточные мазки исследовались с использованием разработанного нами метода ПЦР в режиме реального времени, основанном на обнаружении ДНК *B. pertussis* по мишеням IS*481* и *BP0026*, ДНК *B. parapertussis* по мишени IS*1001* [8] и моноплексной ПЦР, основанной на обнаружении ДНК *B. holmesii* по мишени hIS*1001.*

Фрагмент гена hIS*1001* длиной 92 н.п. амплифицировали с использованием разработанного нами набора праймеров и зонда: 5´TTGAGCTCATCGCGCATCAGATA3´, 5´AACCTCGATCCGTGCCAATCGGA3´, FAM-TTGGCCTGGAGCAACTCGTCCAA-BHQ1. Амплификация проводилась в объеме 25 мкл реакционной смеси, содержащей праймеры и зонд в концентрации 200 нмоль, 65 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 2,5 мМ $MgCl_2$,

16,6 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0,02% Твин, 1% ДМСО, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотид трифосфата, 2,5 единиц Taq полимеразы (ПраймТех), и 5 мкл экстракта ДНК из клинических мазков с использованием амплификатора CFX96 (BioRad) в 96 луночной плашке либо отдельных пробирках объемом 0,2 мл. Режим амплификации включал преденатурацию при 95ºС в течение 5 мин, с последующими 50 циклами, состоящими из стадии денатурации при 95ºС в течение 10 с и стадии элонгации при 60ºС в течение 1 мин. Образцы со значениями Ct равными 50,0 и более учитывались как негативные.

Секвенирование нуклеиновых кислот проводили на обеих цепях ДНК с использованием праймеров, предложенных L.E. Pittet с соавт., 2014 [9] для выявления фрагмента гена hIS*1001*. Количество ДНК в пробе определяли, сопоставляя интенсивность флюоресценции с ДНК-маркером, содержащим известное количество ДНК. Реакцию секвенирования выполняли с BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции производителя. Электрофорез и анализ продуктов сиквенс-реакции проводили на автоматическом генетическом анализаторе Applied Biosystems® 3500 (Thermo Fisher Scientific).

Результаты и их обсуждение. Анализ клинического материала пациентов с подозрением на коклюш/паракоклюш с целью выявления *B. holmesii* проводился по двум алгоритмам. Согласно первому алгоритму только пробы позитивные на мишень IS*481* (*Bordetella* spp.) исследовались в разработанной моноплексной TaqMan ПЦР для индикации *B. holmesii.* Ретроспективное исследование 2530 носоглоточных мазков пациентов с подозрением на коклюш/паракоклюш, поступивших в лабораторию в 2017-2019 гг. показало, что из всех 2530 мазков 1721 (68,0%) были негативными на мишень IS*481* или IS*1001*. Восемьсот девять мазков (32,0%) были *Bordetella* положительными, в том числе на мишень IS*481* (n=788, 97,4%), на мишень IS*1001* (n=21, 2,6%). ПЦР с использованием мишени *BP0026* подтвердила инфекцию, вызванную *B. pertussis* в 562 образцах (69,5% среди позитивных) и с использованием мишени hIS*1001* идентифицировала *B. holmesii* в 8 образцах (0,99% среди позитивных). Оставшиеся 218 позитивных образцов (26,9%) не были идентифицированы на уровне вида и были интерпретированы как инфекция, вызванная *Bordetella* spp., в результате низкого содержания ДНК (значение Ct = от 38,5 до 42,0). В четырех случаях, идентифицированных как *Bordetella* spp., диагноз коклюша был подтвержден методом ИФА при определении в сыворотке крови антител класса G к коклюшному токсину.

Алгоритм исследования клинического материала, проведённый в 2020 г., предусматривал исследование всех поступивших мазков параллельно в дуплексной ПЦР, направленной на выявление *B. pertussis* и *B. parapertussis*, и в моноплексной ПЦР на выявление *B. holmesii.* Среди 600 анализируемых мазков 393 (65,5%) были негативными на все мишени. Чаще, как и при ретроспективном анализе подтверждалась *B. pertussis* доля которых составила 22,5%, а с учетом результатов исследования доступных сывороток – 28,3%. С одинаковой частотой (1%) были идентифицированы *B. parapertussis* и *B. holmesii,* Среди 6 выявленных *B. holmesii* только 2 были выявлены среди мазков позитивных только на мишень IS*481*, что составило 0,97% из всех мазков позитивных на *Bordetella* (207), что соответствует результатам при алгоритме исследования на *B. holmesii* мазков за 2017-2019 гг. Но новый алгоритм анализа клинического материала позволил выявить две коинфекции *B. holmesii* и *B. pertussis* и две *B. holmesii* среди отрицательных проб на мишень IS*481.*

Секвенирование продукта амплификации и проверка программой BLAST всех 14 положительных проб, выявленных в моноплексной ПЦР, направленной на выявление фрагмента гена *hIS1001*, подтвердила принадлежность фрагмента ДНК геному *B. holmesii*.

Заключение. Проведенные исследования свидетельствует о циркуляции *B. holmesii* на территории Республики Беларусь и необходимости совершенствования генодиагностики коклюшной инфекции.

Ключевые слова: *Bordetella holmesii*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*, ПЦР реального времени, коклюш, Беларусь.

Литература

1. Pittet, L.F. *Bordetella holmesii*: still emerging and elusive 20 years on / L.F. Pittet, K.M. Posfay-Barbe // Microbiol. Spectr. – 2016. – Vol. 4, No. 2. doi: 10.1128/microbiolspec.EI10-0003-2015

2. Microorganisms isolated in cases of pertussis-like syndrome / A. Ferrer [et al.] // Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. – 2000. – Vol. 18. – P. 433-438.

3.*Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia / R.S. Weyant [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1995. – Vol. 33. – P. 1-7.

4. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis* / M.J. Loeffelholz [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – P. 2872-2876.

5. Harmonization of *Bordetella pertussis* real-time PCR diagnostics in the United States in 2012 / M.M. Williams [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2015. – Vol. 53. – P. 118-123.

6. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis / E. Njamkepo [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49. – P. 4347-4348.

7. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* — Ohio, 2010-2011 / L. Rodgers [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2013. – Vol. 56. – P. 322-331.

8. Kolodkina, V.L. Multiplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* / V.L. Kolodkina, V.S. Martynov, A. Babenko // Iran. J. Microbiol. – 2014. – Vol. 6. – P. 346-354.

9. *Bordetella holmesii*: an under-recognised Bordetella species / L.F. Pittet [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2014. – Vol. 14, No. 6. – P. 510-519.

DETECTION OF *BORDETELLA HOLMESII* AS A CAUSATIVE AGENT OF PERTUSSIS-LIKE DISEASE IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Kolodkina V.L., Martynov V.S.

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

Forteen *B. holmesii*, 697 *B. pertussis*, and 27 *B. parapertussis* were identified in the study of 3130 nasopharyngeal swabs of patients with suspected pertussis admitted from May 2017 to September 2020. The analysis of swabs was carried out in the developed by us duplex TaqMan PCR, for the detection of *B. pertussis* DNA for targets IS*481* and BP0026, *B. parapertussis* DNA for the IS*1001* target, and singleplex TaqMan PCR for the detection of *B. holmesii* DNA for the hIS*1001* target using two algorithms. According to the first, *B. holmesii* was detected by examining only swabs positive for IS*481* (*Bordetella* spp.). Eight *B. holmesii* out of 809 positive swabs (0.99%) were identified. According to the second algorithm, all swabs were examined. Six *B. holmesii* were identified, including 2 among *Bordetella* spp swabs (0.97%, 2 out of 207), 2 co-infections with *B. holmesii* and *B. pertussis*, and 2 *B. holmesii* among the negative swabs for the IS*481* target. The new differential diagnostic algorithm proved to be a useful molecular diagnosic tool for whooping cough, revealed cocirculation of *B. holmesii*, *B. pertussis* and *B. parapertussis*, and demonstrated low levels of other non-pertussis *Bordetella* species in Belarus.

Keywords: *Bordetella holmesii*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*, real-time PCR, pertussis, Belarus.

Поступили 29.10.2020

ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ НАБОРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ COVID-19

Мостович Л.А., Кувшинова И.Н., Некрасов Б.Г., Ливицкая Н.И., Молодых С.В., Рукавишников М.Ю.

Акционерное общество «Вектор-Бест», Новосибирск, Российская Федерация

Лабораторная диагностика COVID-19 основана на обнаружении вирусной РНК с использованием молекулярных методов. Серологическое исследование имеет вспомогательное значение для диагностики текущей инфекции и основное для оценки иммунного ответа на текущую или перенесенную инфекцию. Выявление специфических антител к SARS-CoV-2 позволяет также оценить уровень коллективного иммунитета после заражения и вакцинации и косвенно определить степень распространения вируса среди различных групп населения. Таким образом, в настоящее время весьма востребованы качественные серологические тесты для выявления антител к SARS-CoV-2.

В АО «Вектор-Бест» разработан комплекс иммуноферментных наборов для выявления иммуноглобулинов разных классов к SARS-CoV-2: IgG, IgM, IgA, суммарных антител. В работе обсуждается эффективность тест-систем, основанная на параметрах диагностической чувствительности и специфичности, влияние на эти параметры различных типов рекомбинантных вирусных антигенов, используемых при создании наборов. Обсуждается роль определения различных классов антител к SARS-CoV-2 в разные сроки заболевания, интерпретация результатов и возможные алгоритмы диагностики инфекции.

Ключевые слова: COVID-19, диагностика, иммуноферментный анализ, антитела, IgG, IgM, IgA.

BASIC APPROACHES TO THE DEVELOPMENT ASSAYS FOR COVID-19 SEROLOGY MARKERS DETECTION

Mostovich L.A., Kuvshinova I.N., Nekrasov B.G., Lyvitskaya N.I., Molodyh S.V., Rukavishnikov M.Y.

Joint Stock Company "Vector-Best", Novosibirsk, Russian Federation

Laboratory diagnosis of COVID-19 is based on the viral RNA detection with RT-PCR. Serology methods are of secondary importance for the diagnosis of the current infection and are main for assessing the immune response to the current or previous infection. Detection of specific antibodies to SARS-CoV-2 is also allows to assess the level of herd immunity after infection and vaccination and indirectly determine the extent of the spread of the virus among different population groups. Thus, high-quality serological tests for the detection of antibodies to SARS-CoV-2 are currently in high demand.

Joint Stock Company "Vector-Best" has developed immunoassays for the detection of immunoglobulins of different classes to SARS-CoV-2: IgG, IgM, IgA, total antibodies. Test effectiveness based on the diagnostic sensitivity and specificity, as well as the effect on these parameters of various types of recombinant viral antigens used for the kits are discussed. The role of determining different classes of antibodies to SARS-CoV-2 at different periods of the disease, results interpretation and algorithms of infection diagnosis are considered.

Keywords: COVID-19, diagnostics, enzyme immunoassay, antibodies, IgG, IgM, IgA.

Поступили: 22.10.2020

ОСОБЕННОСТИ МИКОЗОВ КОЖИ У РЕЦИПИЕНТОВ ПЕЧЕНОЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА

[1]Музыченко А.П., [2]Руммо О.О.

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

[2]Государственное учреждение «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Республика Беларусь

Введение. Несмотря на обилие информации о злокачественных новообразованиях кожи у реципиентов трансплантатов солидных органов, сведений об инфекциях кожи у данной категории пациентов в дерматологической литературе недостаточно. Грибковые инфекции у реципиентов трансплантатов продолжают оставаться значительной причиной заболеваемости. Риск развития бактериальных, вирусных и грибковых инфекций обусловлен иммунологическим статусом пациентов.

С каждым годом аллотрансплантация печени приобретает все большее значение в качестве метода радикальной терапии пациентов с терминальной стадией острых и хронических заболеваний печени. Долгосрочная иммуносупрессивная терапия способствует увеличению риска инфекционных осложнений, в том числе кожи, у реципиентов печеночного трансплантата. Микозы у иммунокомпрометированных пациентов возникают значительно чаще, чем в общей популяции, на их долю по данным разных авторов приходится от 23 до 70% [1-3].

Цель исследования: изучить распространенность микозов кожи и ее придатков у реципиентов печеночного трансплантата, находящихся на системной иммуносупрессивной терапии.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 190 пациентов (104 женщины, 86 мужчин) в возрасте 18-60 лет, перенесших трансплантацию печени, наблюдающиеся в ГУ «МНПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии». Все реципиенты получали 2-3-компонентную иммуносупрессивную терапию (ингибиторы кальциневрина (циклоспорин, такролимус), мофетил микофенат, глюкокортикостероиды (метилпреднизолон)). Средняя продолжительность иммуносупрессии составила 5,4±2,3 года. Методы клинико-лабораторной диагностики включали: клиническое обследование пациентов и микологическое исследование, включающее микроскопию и культуральную диагностику. Статистическая обработка результатов осуществлялась с применением пакета статистических программ Statistica 10.0.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенного исследования у 24,2% (n=46) реципиентов печеночного трансплантата выявлены микозы кожи и ее придатков. В структуре заболеваемости преобладали микоз стоп (43,5%), онихомикоз стоп (34,8%), отрубевидный лишай (30,4%); реже регистрировались микоз кистей (23,9%), онихомикоз кистей (15,2%), микоз гладкой кожи (26,1%), кандидоз кожи (17,4%), орофарингеальный кандидоз (15,2%), малассезия-фоликулит (8,7%). При этом у 22 (47,8%) пациентов с микозами наблюдалось сочетанное грибковое поражение двух и более топографических областей. У обследованных пациентов преимущественно выделялись дерматофиты (*Trichophyton rubrum, Epidermophyton floccosum, Trichophyton mentagrophytes*) и дрожжеподобные грибы (*Candida* spp., *Malassezia* spp.). У 30,4% наблюдались грибковые ассоциации. Согласно полученным результатам основным возбудителем кандидоза кожи и слизистых оболочек являлась *Candida albicans*, при этом у 21,4% пациентов высевались Non-albicans Candida виды.

Выводы. Установлена высокая частота (24,2%) развития микозов кожи и ее придатков среди реципиентов печеночного трансплантата, находящихся на системной иммуносупрессивной терапии. В структуре заболеваемости преобладают дерматофитии, малассезиозы. У 47,8% пациентов наблюдается грибковое поражение двух и более топографических областей; а у 30,4% – грибковые ассоциации. Полученные данные необходимо учитывать при обследовании и лечении данной категории пациентов.

Ключевые слова: микозы, иммуносупрессия, трансплантация печени.

Литература

1. Singh, N. Fungal infections in the recipients of solid organ transplantation / N. Singh // Infect. Dis. Clin. North. Am. – 2003. – Vol. 17, No. 1. – P. 113-134.
2. Fungal infections // Am. J. Transplant. – 2004. – Vol. 4, suppl. 10. – P. 110-134.
3. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients / D. Neofytos [et al.] // Transplant. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 12. – P. 220-229.

FEATURES OF FUNGAL INFECTIONS IN LIVER TRANSPLANT RECIPIENTS

[1]Muzychenko H.P., [2]Rummo O.O.

[1]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[2]Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus

A high frequency (24.2%) of skin and its appendages mycoses development was established among recipients of a hepatic transplant undergoing systemic immunosuppressive therapy. Dermatophytosis and malassezioses prevail in the morbidity structure. In 47.8% of patients, a fungal infection of two or more topographic areas is observed; and 30.4% have fungal associations. The data obtained must be taken into account when examining and treating this category of patients. The immunological status of patients receiving such transplants exposes them to the risk of developing bacterial, viral and fungal infections.

Keywords: fungal infections, immunosuppression, liver transplantation.

Поступили 15.10.2020

ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА, ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ КОКЛЮША В УСЛОВИЯХ ПЛАНОВОЙ ИММУНИЗАЦИИ НАСЕЛЕНИЯ

[1]Раевская И.А., [2]Шилова М.А.

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

[2]Государственное учреждение «Республиканский центр организации медицинского реагирования» Минск, Республика Беларусь

Введение. Актуальность коклюша с годами не утрачивает своего значения. Коклюш относится к вакциноуправляемым инфекциям, однако наблюдается снижение эффективности иммунопрофилактики в связи с быстрой утратой иммунитета после проведенной иммунопрофилактики и адаптацией возбудителя в условиях вакцинации.

Цель: выявить и проанализировать особенности проявлений эпидемического процесса, диагностики и профилактики коклюша в г. Минске в условиях плановой иммунизации населения.

Материалы и методы. Проведено анонимное анкетирование, в котором приняли участие 150 беременных женщин, 50 врачей акушеров-гинекологов и 88 родителей и опекунов пациентов детских организаций здравоохранения г. Минска. Обработка результатов проводилась с помощью пакета Microsoft Excel 10.

Результаты и их обсуждение. Иммунопрофилактика коклюша в Республике Беларусь начата в 1958 г. С этого времени наблюдается снижение уровня заболеваемости, однако с 2008 года отмечается рост заболеваемости этой инфекцией как в нашей стране, так и в других странах. До этого периода для подтверждения диагноза коклюша использовался бактериологический метод, который считался «золотым стандартом» лабораторной диагностики, давал подтверждение диагноза не более, чем в 60% случаев, а в последние годы его эффективность снизилась до 6-12% [1]. В последнее десятилетие в лабораторную диагностику внедрены ПЦР и ИФА. При выявлении Bordetella spp. ПЦР эффективнее бактериологического исследования более чем в 20 раз. С помощью этого метода B. pertussis возможно выявлять в течение 31 дня от начала заболевания. [2]. При этом существенно сокращаются сроки получения результата исследования, что сказывается на своевременности проведения противоэпидемических мероприятий и отразилось на уровне регистрируемых заболеваний.

Коклюш как бывшая «детская инфекция» «принял в свои ряды» пациентов из более старших возрастных групп, группой риска становятся дети не привитые, в том числе не доросшие до возраста прививки или не получившие прививку из-за медицинских противопоказаний и отказов родителей от защиты детей от заболевания. Согласно нашим исследованиям в структуре болеющих дети в возрасте до 1 года составили 27,82%, а группой риска явились школьники 7-17 лет (39,85%). Об угасании иммунитета в этой возрастной группе свидетельствуют данные и других авторов [3]. В данным наших исследований, в ряде семейных очагов источниками инфекции являлись родители таких пациентов, болевшие до заболевания своего ребенка инфекцией дыхательных путей и при обследовании по контакту давшие положительный результат в ИФА.

Сложность профилактики заболеваний коклюшем детей младшего возраста заключается в том, что они не имеют врожденного иммунитета к данной инфекции (защита ребенка возможна при прививке женщины во время беременности и отсутствии восприимчивых в окружении новорожденного). Прививки подростков и взрослых в нашей

стране не проводились в широком масштабе. Проведенное нами анкетирование среди беременных выявило, что 36% опрошенных привились бы от этой инфекции в период беременности, но при этом доверились бы компетентности врача в данном вопросе. Однако только 16% опрошенных врачей акушер-гинекологов могли бы рекомендовать эту прививку, а среди возможных для этой цели препаратов 38% специалистов назвали АКДС. Приверженность прививкам среди родителей пациентов детских поликлиник выглядела следующим образом: опасным для своего ребенка считают это заболевание 93,2% родителей, но делать прививку при возникновении опасности заболевания готовы только 72,2% опрошенных. В ряде стран рекомендованы прививки от коклюша контингентам риска инфицирования (медицинские работники, работники детских дошкольных организаций, учителя и др.) [4].

Заключение. Таким образом, наши исследования предполагают необходимость более пристального внимания к вопросам профилактики коклюша в процессе подготовки врачей акушеров-гинекологов, информирования родителей о важности иммунизации детей против коклюша, освещение важности иммунопрофилактики данного заболевания среди беременных женщин в «Школе молодой мамы». Также полагаем, что ввиду выявленных особенностей эпидемического процесса коклюша, необходимо рассмотреть вопрос о расширении плановой иммунизации против коклюша (введение второй ревакцинации, стратегии иммунизации взрослого населения).

Ключевые слова: коклюш, эпидемический процесс, анкетирование, иммунопрофилактика коклюша.

Литература

1. Клинико-эпидемиологическая характеристика коклюша у детей первых месяцев жизни / Ю.В. Лобзин [и др.] // Детские инфекции. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 5-9.

2. Елькина, М.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в диагностике и эпидемиологическом надзоре за коклюшем и дифтерией / М.А. Елькина, С.Б. Яцышина // Молекулярная диагностика 2018: сб. тр. междунар. науч.-практ. конф. – Минск, 2018. – С. 134-136.

3. Колодкина, В.Л. Коклюш у детей, привитых вакцинами с цельноклеточным и бесклеточным коклюшным компонентом / В.Л. Колодкина, В.С. Мартынов, Е.О. Самойлович // Мед. журн. – 2020. – № 2. – С. 67-72.

4. Михеева, И.В. Целесообразность и перспективы вакцинопрофилактики коклюша без возрастных ограничений / И.В. Михеева, Т.С. Салтыкова, М.А. Михеева // Журн. инфектол. Юбил. вып. – 2018. – Т. 10, № 4. – С. 14-23.

FEATURES OF THE EPIDEMIC PROCESS, DIAGNOSIS AND PREVENTION OF PERTUSSIS IN THE PLANNED IMMUNIZATION

[1]Rayeuskaya I.A., [2]Shylava M.A.

[1]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[2]Republican Center for Organizing Medical Response, Minsk, Republic of Belarus

This study was carried out with the aim of identifying and analyzing the features of the epidemic process manifestations, diagnosis and prevention of pertussis in Minsk in the context of routine immunization of the disease in accordance with the National Calendar of Preventive Vaccinations. An insufficient level of knowledge of obstetricians-gynecologists, pregnant women and parents about the prevention of pertussis was revealed. The risk group were children 7-17 years old, sources of infection for young children were often adults from the immediate environment (parents).

Keywords: pertussis, epidemic process, questionnaire survey, immunoprophylaxis.

Поступили 16.10.2020

Сборник научных трудов
«СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»

Правила для авторов

1. Статьи должны быть написаны на высоком научном и методическом уровне с учетом требований международных номенклатур, отражать актуальные проблемы инфекционной патологии человека, содержать новую научную информацию, рекомендации практического характера.

2. Статья должна быть напечатана на одной стороне листа с одинарным межстрочным интервалом в 1-м экземпляре. Для всего текста публикации использовать шрифт Times New Roman размером 12 пунктов, абзацный отступ (красная строка) 1 см, с выравниванием по ширине, межстрочный интервал одинарный, без установки автоматического переноса, все поля по 25 мм.

3. Объем статьи, включая рисунки, таблицы, библиографический список литературы 5-7 страниц формата А4, научных обзоров – до 12 страниц.

4. Статья должна быть изложена на русском или английском языке для иностранных авторов.

5. Заглавие статьи печатается с выравнивание по центру без точек в конце и включает:

1) **НАЗВАНИЕ СТАТЬИ – ПЕЧАТАЕТСЯ ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ БЕЗ СОКРАЩЕНИЙ ЖИРНЫМ ШРИФТОМ;**

2) **фамилии и инициалы авторов – указываются ниже строчными буквами жирным шрифтом;**

3) *название учреждения, город, страна – указываются на следующей строке курсивом нежирным шрифтом*.

6. После заглавия (на языке текста публикуемого материала) приводится резюме. Текст резюме должен содержать краткую информацию (до 10 строк) о результатах публикуемой работы, отражать, что нового несет в себе работа в сравнении с другими известными по тематике публикациями. После резюме печатаются ключевые слова (не более 5).

7. Текст статьи печатается с обязательным выделением следующих разделов: введение, содержащее краткий обзор литературы по данной проблеме, с указанием нерешенных ранее вопросов, сформулированную и обоснованную цель работы; основная часть: материалы и методы исследования, результаты исследования и обсуждение, заключение или выводы; библиографический список (литература). В разделе «материалы и методы исследований» обязательно сообщать о соблюдении правил работ с использованием экспериментальных животных (для экспериментальных исследований), а также указать использованные методы статистической обработки данных.

8. Сокращение слов не допускается, кроме общепринятых сокращений химических и математических величин, мер, терминов. В статьях должна быть использована система единиц СИ.

9. Таблицы, графики и диаграммы должны быть тщательно выверены автором и соответствовать цифрам в тексте и располагаться после их первого упоминания. Все таблицы, графики и диаграммы должны иметь названия. Оформление таблиц, графиков и диаграмм должно соответствовать требованиям ВАК Республики Беларусь. Каждая таблица должна иметь краткий заголовок, который состоит из слова "Таблица", ее порядкового номера и 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. Пояснительные данные помещают под фотографией, графиком, рисунком, схемой, а со следующей строки – слово "Рисунок", номер и наименование иллюстрации, отделенного от номера точкой и знаком тире. Точку в конце нумерации и наименований иллюстраций не ставят. Слово «Рисунок», его номер и наименование иллюстрации, печатаются полужирным шрифтом. Не допускается перенос слов в наименовании рисунка. Использование страниц альбомного формата не допускается.

11. В конце каждой оригинальной статьи должен быть приложен библиографический список литературы (не более 10), 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, 2]).

12. После «библиографического списка» печатается название статьи, фамилии авторов, название учреждения с указанием города и страны, резюме (100-150 слов) и ключевые слова на английском языке (если статья англоязычная, резюме приводиться на русском языке). Буквального соответствия русского и английского рефератов не требуется.

13. В конце статьи должны быть подписи всех авторов.

14. К статье прилагаются сведения об авторах (Ф.И.О., звание, ученая степень, должность, учреждение, город, адрес электронной почты и контактный телефон).

15. Обязательно предоставление материалов в электронном виде с соблюдением вышеуказанных правил. Файл должен иметь формат MS Word (*.DOC, *.RTF). Название файла должно содержать фамилию и инициалы первого автора и первые два слова названия статьи на русском языке (например, Сидров ИИ_Способ получения.doc).

16. Статья должна быть тщательно отредактирована и выверена автором. Обязательна виза руководителя подразделения. К статье прилагается экспертное заключение о возможности опубликования в открытой печати, и письмо-ходатайство организации, в которой выполнялась работа с обязательным указанием, что направляемые материалы ранее не были опубликованы или не приняты к печати другими изданиями (авторы несут за это полную ответственность).

17. Один автор имеет право на публикацию не более трех научных статей с учетом соавторства.

18. Лицам, осуществляющим послевузовское обучение (аспирантура, докторантура, соискательство) в год завершения обучения предоставляется первоочередная возможность опубликования представленных статей.

19. Поступившие в редакцию статьи направляются на рецензирование профильным специалистам. Основным критерием целесообразности публикации является новизна и информативность статьи. Если по рекомендации рецензента статья возвращается на доработку, то переработанная рукопись вновь рассматривается редакционной коллегией, при этом датой поступления считается день получения редакцией ее окончательного варианта.

20. Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать статьи без искажения основного содержания статьи.

21. При нарушении указанных правил статьи не рассматриваются. Рукописи не возвращаются.

Плата за опубликование научных статей не взимается со всех авторов.

Адрес и контактная информация редакции:

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, ул. Филимонова, 23, г. Минск, 220114,
Республика Беларусь, тел.: (+375-17)3770439/3746979, факс: (+375-17)3773093,
E-mail: rrpcem@belriem.by или belriem@gmail.com http://www.belriem.by/

СОДЕРЖАНИЕ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ В ОБЛАСТИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ
Горбунов В.А., Дронина А.М., Носова Е.С., Петкевич А.С., Карабан И.А., Филонюк В.А., Жукова Н.П., Тарасенко А.А. 3

ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ ПО ДИАГНОСТИКЕ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (COVID-19) В РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ МИКРОБИОЛОГИИ
Горбунов В.А., Дронина А.М., Носова Е.С., Петкевич А.С., Шмелева Н.П., Амвросьева Т.В., Красько А.Г. 12

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ..... 23

***Оригинальные исследования*..... 23**

ОСОБЕННОСТИ ГОДОВОЙ ДИНАМИКИ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ВЕТРЯНОЙ ОСПОЙ НАСЕЛЕНИЯ БЕЛАРУСИ
Дронина А.М., Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Ермолович М.А., Гузовская Т.С. 23

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СКАРЛАТИНЫ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ
Ракова К.С., Сакович М.Н. 29

ПОДДЕРЖАНИЕ ЭЛИМИНАЦИИ КОРИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ, 2019-2020 гг.
Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Высоцкая В.С., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю., Глинская И.Н. 35

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКИМ ПАРОТИТОМ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ, 2013-2020 гг.
Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю. 41

ОЦЕНКА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ НЕИНВАЗИВНЫМИ ФОРМАМИ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ДЕТЕЙ ТРЕХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП
Соколова М.В., Романова О.Н., Ханенко О.Н., Босяков С.М. 45

ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ МОНИТОРИНГА ЧИСТОТЫ И САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ НА ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВАХ
Тонко О.В., Коломиец Н.Д., Ханенко О.Н. 50

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ СЛЕЖЕНИЕ ЗА БЕШЕНСТВОМ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
Ханенко О.Н., Коломиец Н.Д., Тонко О.В. 57

ДИНАМИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ЛЯМБЛИОЗА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
Шуманская С.Ю., Дронина А.М., Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е., Пархомчук О.Ю., Семижон О.А. 62

МИКРОБИОЛОГИЯ **67**

Обзорные сообщения **67**

ПРИНЦИПЫ И СТРУКТУРА ОРГАНИЗАЦИИ КОЛЛЕКЦИИ
И КРИОБАНКА КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ
Корень С.В., Фомина Е.Г. 67

Оригинальные исследования **74**

РАЗРАБОТКА ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО
ВРЕМЕНИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *LISTERIA MONOCYTOGENES*
Бакаева Т.Н., Янович О.О., Титов Л.П. 74

ОВОЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ
«КЛИНСТАР ХЛОР» И «КЛИНСТАР ХЛОР АКТИВ»
Карамышева Ю.С., Гудков В.Г., Ладутько В.А., Науменко А.И.,
Рогова К.К., Горбунов В.А. 81

БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ
ОТ ПАЦИЕНТОВ С ОТИТАМИ И СИНУСИТАМИ
Таланкина А.С., Еременко Ю.Е., Титов Л.П. 86

ДОМИНИРУЮЩАЯ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНАЯ РАНЕВАЯ МИКРОФЛОРА
И ЕЕ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К КАРБАПЕНЕМАМ И ФТОРХИНОЛОНАМ:
РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА 2012–2019 гг.
Титов Л.П., Хархаль А.Н., Горбунов В.А., Левшина Н.Н., Блыга Е.Г., Рябова Г.И.,
Бонда Н.В., Удовиченко Н.В., Судак С.Ю., Михалюк А.И., Ершова М.В.,
Буханцова А.Н., Войтик С.Б., Ткач Л.М. 92

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРА ВОСПАЛЕНИЯ TREM-1 МОНОЦИТАМИ
ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ И СЕПТИЧЕСКИМ ШОКОМ
Трусевич М.О., Титов Л.П., Горбич Ю.Л., Сирош Ю.А. 98

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ,
СОДЕРЖАЩИХ ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ФРАГМЕНТЫ
ГЕНОМА *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*
Фомина Е.Г., Рубаник Л.В., Капустина Ю.М., Григорьева Е.Е., Зверко В.В. 104

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА У
ПАЦИЕНТОВ С ПАТОЛОГИЕЙ ВЕРХНИХ ОТДЕЛОВ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО
ТРАКТА И ИХ СВЯЗЬ С ИНФИЦИРОВАННОСТЬЮ *HELICOBACTER PYLORI*
Янович О.О., Титов Л.П., Дорошко М.В., Сергеева И.Г., Гузов С.А. 110

ВИДОВОЙ СОСТАВ И АССОЦИАТИВНОСТЬ МИКРОФЛОРЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ
БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ РАНАМИ
Ярец Ю.И., Шевченко Н.И., Еремин В.Ф. 116

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ПАЦИЕНТОВ
С ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ В ОТДЕЛЕНИИ РЕАНИМАЦИИ
Ярец Ю.И., Шевченко Н.И., Ковалев В.О. 124

ВИРУСОЛОГИЯ **132**

Оригинальные исследования **132**

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ФОРМЫ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
У ДЕТЕЙ И МОЛОДЫХ ВЗРОСЛЫХ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
Амвросьева Т.В., Богуш З.Ф., Аринович А.С., Кишкурно Е.П.,
Марейко Ю. Е., Минаковская Н.В. 132

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ КОМПЛЕКТОВ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ
ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК BKV, JCV, АдВ
Аринович А.С., Бельская И.В., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В. 138

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК
И СОЗДАНИЕ НА ИХ ОСНОВЕ КАЛИБРАТОРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ
ДНК АДЕНОВИРУСОВ В ВОДНЫХ ОБЪЕКТАХ
Бельская И.В., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В. 143

ВОЗМОЖНОСТИ АДАПТАЦИИ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АЛЛЕЛИ HLA-B*57:01, АССОЦИИРОВАННОГО С РАЗВИТИЕМ
ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЛЕКАРСТВЕННОМУ СРЕДСТВУ АБАКАВИР,
ВХОДЯЩЕМУ В СОСТАВ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ
Булда К.Ю., Гасич Е.Л., Бунас А.С. 149

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ ЭКЗАНТЕМНЫХ
ИНФЕКЦИЙ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН
Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю., Самойлович Е.О. 154

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНОГО
ГЕПАТИТА Е, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
Колтунова Ю.Б., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В. 158

ДЕТЕКЦИЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОГО РНК-ВИРУСА СЕМЕЙСТВА
TOTIVIRIDAE В ИЗОЛЯТАХ ТРИХОМОНАД, ВЫДЕЛЕННЫХ
НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
Мельник П.С., Рубаник Л.В., Полещук Н.Н. 162

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ
VARICELLA-ZOSTER, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В г. МИНСКЕ В 2015-2020 гг.
Семейко Г.В., Гузовская Т.С., Дронина А.М., Самойлович Е.О. 167

ЕДИНИЧНЫЙ СЛУЧАЙ КРАСНУХИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2020 г.:
КЛИНИЧЕСКАЯ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
Семейко Г.В., Самойлович Е.О., Матиевская Н.В., Кузнецова Е.В.,
Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю. 172

ВЫЯВЛЕНИЕ ХРОМОСОМНО-ИНТЕГРИРОВАННОЙ ФОРМЫ ВГЧ-6А/В
У ДЕТЕЙ НА ФОНЕ КЛИНИЧЕСКИ ПОДОЗРЕВАЕМОЙ
РОЗЕОЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
Шилова Ю.А., Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Аринович А.С.,
Дивакова Е.В., Кишкурно Е.П. 177

ИММУНОЛОГИЯ **181**

Оригинальные исследования **181**

COVID-19 И ПОСТИНФЕКЦИОННЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ
АмвросьеваТ.В., Поклонская Н.В., Богуш З.Ф., Казинец О.Н., Бельская И.В., Колтунова Ю.Б., Шилова Ю.А., Анисько Л.А., Рогачева Т.А. 181

ПАТОГНОМОНИЧНЫЕ МАРКЕРЫ РЕНАЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ НЕФРОПАТИЯХ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА
Асташонок А.Н., Полещук Н.Н. 187

БИОМАРКЕРЫ НЕИМУННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ТКАНИ ПОЧКИ ПРИ ГЛОМЕРУЛОПАТИЯХ У ДЕТЕЙ
Асташонок А.Н., Полещук Н.Н., Сукало А.В., Козыро И.А. 191

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ОСТРОЙ ЦМВ ИНФЕКЦИИ
Зверко В.В., Григорьева Е.Е., Фомина Е.Г., Гуцалюк И.Я., Доценко М.Л., Пехтерева Л.А., Доценко Э.А., Шапетько М.М. 195

ОБЩИЙ И АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ Е И ИНТЕРЛЕЙКИН-13 У ПАЦИЕНТОВ С РЕСПИРАТОРНОЙ АЛЛЕРГИЕЙ
Новикова Т.П. 202

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОМАРКЕРОВ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ В МОЧЕ У ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ
Пархомчук О.Ю., Романова И.В., Григорьева Е.Е., Фомина Е.Г., Рябцева Т.В., Сорока Н.Ф., Буторина И.И., Чиж К.А. 207

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ВНЕГОСПИТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ
Русина В.В., Кабанова Ю.А., Захарова А.Г., Доценко Э.А. 212

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ К КРАСНУХЕ У НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю. 218

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ COVID-19
Скребло Е.И., Головко Е.С., Скребло В.Э., Голюченко О.А., Жильцов И.В. 221

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ
Тезисы республиканской научно-практической конференции с международным участием «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии», 10 ноября 2020 г. (в режиме онлайн) **225**

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ШТАММОВ *SALMONELLA ENTERICA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С САЛЬМОНЕЛЛЕЗОМ
Бакаева Т.Н., Клюйко Н.Л., Титов Л.П. 225

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ К ПАРВОВИРУСУ В19 У МУЖЧИН И ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА
Ермолович М.А., Самойлович Е.О. 227

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА «САНИТ Д» В ОТНОШЕНИИ ЯИЦ АСКАРИД
Карамышева Ю.С., Гудков В.Г., Ладутько В.А., Науменко А.И., Рогова К.К. 230

ВЫЯВЛЕНИЕ *BORDETELLA HOLMESII* КАК ВОЗБУДИТЕЛЯ КОКЛЮШЕПОДОБНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
Колодкина В.Л., Мартынов В.С. 232

ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ НАБОРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ COVID-19
Мостович Л.А., Кувшинова И.Н., Некрасов Б.Г., Ливицкая Н.И., Молодых С.В., Рукавишников М.Ю. 235

ОСОБЕННОСТИ МИКОЗОВ КОЖИ У РЕЦИПИЕНТОВ ПЕЧЕНОЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА
Музыченко А.П., Руммо О.О. 236

ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА, ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ КОКЛЮША В УСЛОВИЯХ ПЛАНОВОЙ ИММУНИЗАЦИИ НАСЕЛЕНИЯ
Раевская И.А., Шилова М.А. 238

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ 240

СОДЕРЖАНИЕ 242

Научное издание

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Сборник научных трудов

Основан в 2008 году

Выпуск 13

Главный редактор:
канд. мед. наук, доц. *В.А. Горбунов*

Ответственный редактор:
д-р мед. наук, проф. *А.С. Владыко*

Редакторы:
Е.С. Носова, Т.А. Аблова

Компьютерная верстка:
Т.А. Аблова, А.А. Ничипорук

Подписано в печать 23.10.2020.
Формат 60x84/8. Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 30,22. Тираж 60. Заказ 1128.

Отпечатано в Государственном предприятии
«СтройМедиаПроект», Зак. 1330. Тираж 60 экз.
ЛП № 02330/71 от 23.01.2014 г.
Ул. В. Хоружей, 13/61, 220123, г. Минск.