

**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 14

Минск
Издательский центр БГУ
2022

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

Сборник предназначен для научных сотрудников и работников 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.

Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / С 56 М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии ; под ред. В.А. Горбунова. — Минск : Изд. центр БГУ, 2022. — Вып. 14. — 251 с., 69 ил., 40 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, акад. 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:

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:

академик НАН Беларуси, д-р биол. наук, профессор *Э.И. Коломиец*
д-р мед. наук, профессор *Н.Д. Коломиец*

**«Ценность каждого человека определяется
ценностью предметов его стремлений»**

Марк Аврелий

ПАМЯТИ АКАДЕМИКА ВЕНИАМИНА ИОСИФОВИЧА ВОТЯКОВА

(к 100-летию со дня рождения)



Выдающемуся отечественному ученому-вирусологу, широко известному далеко за пределами нашей страны, создателю научно-практической школы белорусских вирусологов академику Вотякову Вениамину Иосифовичу в 2021 г. исполнилось 100 лет.

Вениамин Иосифович — ученый-вирусолог, академик Академии медицинских наук СССР (1978), Российской академии медицинских наук (1991), Российской академии естественных наук (1990), Национальной академии наук Беларуси (1995), доктор медицинских наук, профессор, лауреат Государственной премии Республики Беларусь (2003).

В. И. Вотяков родился 1 августа 1921 г. в г. Бугуруслане Оренбургской области Российской Федерации. Высшее образование — военно-медицинское: Куйбышевская военно-медицинская академия (Самара, 1939–1942); Военный факультет 2 Московского государственного медицинского института (Омск, Москва, 1942–1943). Участие в Великой Отечественной войне в должностях врача-ординатора хирургического блока, врача-эвакуатора сортировочного блока медико-санитарного батальона, старшего врача Воздушно-десантной бригады, старшего врача полка (1943–1945: Западный, Белорусский, Украинский фронты; Россия, Белоруссия, Венгрия, Австрия, Чехословакия).

Трудовую деятельность в послевоенные годы начинал в Институте микробиологии им. И.И. Мечникова (Уфа) в должности младшего научного сотрудника (1946). Далее — обучение в аспирантуре Центрального Института Государственного контроля бакпрепаратов им. Л. А. Тарасевича (1947–1950) по специальности микробиология. В период 1950–1986 гг. — директор Белорусского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии (ныне РНПЦ эпидемиологии и микробиологии), заведующий отделом ингибиторов вирусной активности (1986–1996) и впоследствии главный научный сотрудник отдела экологии и эпидемиологии природно-очаговых и неуправляемых антропонозных вирусных инфекций названного института.

Кандидат медицинских наук (1951), доктор медицинских наук (1965), профессор (1966), член-корр. АМН СССР (1971), академик АМН СССР (1978), академик РАМН (1991), академик Национальной академии наук Беларуси (1995).

Работая в течение 50 лет в области вирусологии, эпидемиологии и химиотерапии вирусных инфекций и более 35 лет возглавляя Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии, В. И. Вотяков внес значительный вклад в познание ряда инфекционных заболеваний.

В послевоенные годы в Белоруссии полыхали эпидемии многих инфекций. В.И. Вотяков принимал активное участие в изучении инфекционной патологии с целью выработки научно-обоснованных подходов к снижению заболеваемости дифтерией, сыпным тифом и болезнью Брилля, малярией, дизентерией, брюшным тифом и парати-

фами, коклюшем, бешенством, полиомиелитом. Именно под его руководством и личной ответственностью были разработаны стратегия и тактика, а также реализованы программы ликвидации эпидемической заболеваемости на территории Республики Беларусь. Он всесторонне изучил клещевой энцефалит в Беларуси. Сравнительные исследования этой болезни на территории Беларуси и Дальнего Востока легли в основу гипотезы об эволюции вирусов клещевого энцефалита, в результате которой в различных экосистемах на территории Евразии, сформировались генетические вирусные популяции, объединяющиеся в два вида — вирус Западного и вирус Восточного клещевого энцефалита. Решение указанных теоретических проблем имеет большое значение для медицинской практики и, прежде всего, в области разработок вакцинно-сывороточных и диагностических препаратов для восточных и западных регионов СНГ.

В. И. Вотяковым впервые в СССР описана в Республике Беларусь болезнь Крейтцфельдт-Якоба и выделены прионы. Из группы спонгиозных энцефалопатий впервые в мире описана новая болезнь — амиотрофический лейкоспонгиоз. Впервые опубликованы данные о связи прионовых инфекций с крупным рогатым скотом, задолго до развития крупной эпизоотии так называемого «бешенства» коров в Великобритании. Описана новая для Республики Беларусь геморрагическая лихорадка с вегетовазоренальным синдромом.

На территории Беларуси В. И. Вотяковым был выделен ряд новых для республики вирусов: Укуниема, Олтуш, Западного Нила, Трибеч, вирус гриппа с новой антигенной формулой и др. Им разработаны и внедрены в практику здравоохранения защитно-технологические линии в виде закрытых искусственных экосистем. На указанных принципах были построены лаборатории в Минске и Тбилиси. В связи с этими работами стало возможным выполнение программы Минздрава СССР по изучению аренавирусов, которую В.И. Вотяков возглавлял до 1987 г. В частности, были проведены исследования по изучению патогенеза геморрагических лихорадок Ласса и Мачупо, а также созданию в отношении их диагностических и химиотерапевтических препаратов. Под руководством и непосредственном участии В. И. Вотякова изучались природные очаги геморрагических лихорадок в Южной Америке и Африке.

В борьбе с инфекциями Вениамин Иосифович сформировал высококвалифицированный коллектив ученых эпидемиологов, микробиологов и вирусологов, способных решать крупные научно-практические проблемы.

В. И. Вотяков в большом цикле работ, посвященных изучению взаимодействия далеких в эволюционном отношении видов (вирусы, членистоногие, млекопитающие), открыл явление регуляции гиперпаразитизма иммунитетом позвоночных (открытие № 322, гос. реестр СССР). Эти работы радикально меняют подходы к борьбе с природно-очаговыми заболеваниями.

Значителен вклад В. И. Вотякова в становление в СССР, России и Беларуси нового направления научных исследований — химиотерапии и химиопрофилактики вирусных инфекций, развитие которого сопровождалось сильным противодействием оппонентов, не видевших перспектив развития данной области знаний. Несмотря на это, при поддержке АМН СССР и Министерства здравоохранения Республики Беларусь под руководством В.И. Вотякова была создана Союзная проблемная комиссия в рамках которой решались крупные фундаментальные и прикладные проблемы. Было обосновано понятие антивирусного вещества (АВ), разработана классификация по механизму действия, источникам выделения, химической, биологической и биофизической структуре, мишеням действия в клетке и в организме. Обоснованы понятия химиотерапевтического индекса в различных биологических системах, разработаны проблемы сочетанного действия различных АВ. Разработаны методы скрининга в культуре клеток и на животных. Интенсивно разрабатывались проблемы, имеющие практическое значение, осу-

ществлен скрининг более 10 000 соединений, создан банк из 3 000 противовирусных веществ с направленностью в отношении различных вирусов (до ~20 вирусов).

Не менее важны заслуги ученого в разработке нового и нетрадиционного для вирусологии направления исследований, связанного с изучением вклада вирусных агентов в развитие соматической патологии. В частности, установлено, что ряд вирус-возбудителей известных и распространенных инфекционных заболеваний человека могут играть роль факторов риска в атерогенезе.

В своих исследованиях В. И. Вотяков большое внимание уделял решению задач практического здравоохранения. Под его руководством в БелНИИ эпидемиологии и микробиологии освоен выпуск целого ряда диагностических и медикаментозных средств: сухой бычий альбумин, противокоревой, противостафилококковый, антилимфоцитарный, противогерпетический иммуноглобулины, гемогидролизат — ростовая и поддерживающая среда, сыворотка крови крупного рогатого скота и его плодов, фибринолитический препарат целиаза и другие. Создан новый противогриппозный химиопрепарат дейтифорин, внесен существенный вклад в разработку отечественного противогерпетического средства ациклогуанозина и ряда других противовирусных препаратов, предложены способы профилактики и лечения вирусных энцефалитов линкомицином и рифампицином.

В. И. Вотяков принимал участие во многих экспедициях (и некоторые из них возглавлял) по изучению природно-очаговых инфекций — клещевого энцефалита, геморрагических лихорадок (Боливия, бассейн Амазонки; уссурийская тайга, Арктика, Африка, Беларусь).

Вениамин Иосифович создал школу вирусологов Беларуси, исследовательская деятельность сотрудников которой получила признание далеко за пределами СНГ.

Как ученый В. И. Вотяков обладал высоким творческим потенциалом и необычной работоспособностью, широким диапазоном знаний. В свои юбилейные годы за 5 лет накануне 80-летия им опубликовано свыше 60 работ по актуальным проблемам, в том числе по вирусным гепатитам, ВИЧ-инфекции (патогенез, гипотеза о глобальном природном очаге ВИЧ-инфекции в мире), энтеровирусным инфекциям, медленным прионовым заболеваниям, а также по проблемам санитарной вирусологии, химиотерапии вирусных инфекций, создания живых вакцин против особо опасных инфекций, изучения влияния радиации на биологические процессы. Он является автором более 700 научных работ, 7 монографий, более 100 авторских свидетельств, 1 открытия. Им подготовлено большое количество высококвалифицированных специалистов: 16 докторов и 39 кандидатов наук, в том числе возглавивших основные направления научно-исследовательской и производственной деятельности и продолживших работу в БелНИИ эпидемиологии и микробиологии (ныне РНПЦ эпидемиологии и микробиологии).

В. И. Вотякову была свойственна высокая общественная активность. Он избирался членом Президиума Академии медицинских наук СССР и Российской Федерации в течение более 20 лет (1972-1995 гг.). Длительное время был председателем общества эпидемиологов и микробиологов Республики Беларусь и заместителем председателя Союзного общества. Неоднократно избирался депутатом городского и районного советов г. Минска. В последнее время являлся членом бюро медико-биологического отделения Национальной академии наук Беларуси, членом Ученого совета Министерства здравоохранения Республики Беларусь, членом Комиссии по медицинским иммунобиологическим препаратам Министерства здравоохранения Республики Беларусь, членом специального совета по защите диссертаций и т.д. В.И. Вотяков был членом Советского Комитета «Врачи против ядерной войны» первого состава, куда входили такие известные врачи как Чазов Е.И., Блохин М.Н., Ильин Л.А., Бочков Н.П. Активно вы-

ступал против угрозы ядерной войны на международных форумах (Москва, США, Минск), а также в печати (Вестник АМН СССР, Здравоохранение Беларуси).

Вениамин Иосифович активно работал по развитию фундаментальных исследований для медицины. Принимал активное участие в проведении совместного заседания Президиума АМН СССР, Коллегии Министерства здравоохранения Республики Беларусь и Президиума НАН Беларуси в г. Минске и был в дальнейшем заместителем председателя рабочего Комитета по планированию и исполнению такого рода совместных исследований, активно выступал в печати совместно с Министром здравоохранения БССР Н.Е. Савченко и вице-президентом НАН Беларуси А.С. Дмитриевым.

Под его руководством в 1995 г. созданы Международная гуманитарная ассоциация им. Ф. Нансена и Антивирусная ассоциация, деятельность которых направлена на развитие научных исследований в области медицины, а также реализацию идей милосердия и гуманизма в обществе. Для него лично были характерны черты милосердия и гуманизма. Во время войны, когда везде витала смерть, он спас жизнь ребенка и роженицы с помощью оперативного вмешательства в условиях деревенского дома в Венгрии. Мальчика назвали его именем (см. Беларусьфильм «Грозовые дали»).

В. И. Вотяков являлся прекрасным собеседником по вопросам исторического наследия, философии и искусства. Его характеризовали высокое чувство ответственности за судьбу своего коллектива, стремление направить все усилия на обеспечение стабильной работы института в чрезвычайно сложной экономической ситуации.

Научная и общественная деятельность В. И. Вотякова высоко оценена, он награжден орденами Красной Звезды, Отечественной войны II степени, двумя орденами «Почета», орденом Октябрьской революции, медалью Ф. Скорины, боевыми и юбилейными медалями, серебряной медалью ВДНХ, значком «Отличнику здравоохранения» и другими ведомственными и общественными наградами — серебряными медалями П.Л. Капицы, И.П. Павлова, И.И. Мечникова; медалью Н.И. Пирогова за гуманитарную деятельность; именной серебряной медалью английского биографического центра (Кембридж). В.И. Вотяков избран почетным членом научных обществ эпидемиологов и микробиологов России, Беларуси, Узбекистана.

Имя выдающегося ученого Вениамина Иосифовича Вотякова, посвятившего свою жизнь развитию вирусологии, микробиологии и эпидемиологии, по праву занимает почетное место в ряду крупных ученых-вирусологов.

*Ученики и сотрудники
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии*

ИНФЕКЦИЯ COVID-19 В СТРУКТУРЕ ОРВИ У ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2020-2021 гг.

Аношко О.Н., Лапо Т.П., Кищенко Е.Н., Сивец Н.В., Шмелёва Н.П.

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

Резюме. В ходе проведенных нами молекулярно-генетических исследований 1355 клинических образцов, взятых у детей в возрасте 0-17 лет, установлена этиологическая структура ОРВИ в период 2020-2021 гг. в условиях распространения инфекции COVID-19. Генетический материал возбудителей ОРВИ был выявлен в 16% случаев (n=217). Подавляющее большинство расшифрованных случаев инфицирования представляло собой моноинфекцию (99%, n=215) с обнаружением таких патогенов, как риновирус, аденовирус, бокавирус, коронавирусы SARS-CoV-2, NL63 и OC43, парагрипп, а также метапневмовирус (МПВ) и респираторно-синцитиальный вирус. Доля совместного инфицирования двумя респираторными возбудителями (SARS-CoV-2+МПВ и рино+МПВ) составила 1% (n=2). Почти половина случаев ОРВИ с установленной этиологией была вызвана коронавирусом SARS-CoV-2 (47,9%, n=104), что свидетельствует о доминировании нового возбудителя в сезонной и межсезонной циркуляции. Среди пациентов с подтвержденной инфекцией COVID-19 коинфицирование вирусом SARS-CoV-2 и сезонным респираторным вирусом негриппозной этиологии (МПВ) наблюдалось в 1% (n=1). Ведущее место в возрастной структуре заболевания инфекцией COVID-19 занимали дети в возрасте 5-14 лет (48%, n=50). У детей среди всех возрастных групп новый возбудитель чаще поражал верхние отделы дыхательных путей, что свидетельствует о легком течении инфекции, вызывая ОРВИ в 75% (n=78) случаев.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, ОРВИ, коинфекция, дети, эпидемиологическая ситуация, Республика Беларусь.

Введение. Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) – самая распространенная группа заболеваний, объединяющая разные по этиологии инфекции дыхательных путей. Актуальность данной проблемы обусловлена широтой распространения болезни, а также ее возможным тяжелого течения, требующего госпитализации. Респираторные заболевания причиняют значительный экономический ущерб, затрагивая все социальные и возрастные группы населения. Однако заболеваемость ОРВИ среди детей выше, чем среди взрослых. Это объясняется возрастной незрелостью иммунных и анатомо-физиологических механизмов защиты детского организма.

Наиболее встречающимися возбудителями ОРВИ являются вирусы семейств парамиксовирусов, ортомиксовирусов, аденовирусов, пикорнавирусов и коронавирусов.

Особую угрозу представляют патогены, имеющие пандемическое значение, такие как вирусы гриппа и с недавнего времени новый коронавирус SARS-CoV-2 (англ. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), возникший в конце 2019 г. в китайской провинции Хубэй, г. Ухань. В связи с этим в современном мире в глобальном масштабе наблюдаются серьезные изменения в эпидемическом процессе распространения ОРВИ.

11 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) охарактеризовала распространение инфекции COVID-19 (англ. COronaVirus Disease 2019) как пандемию [1].

Последняя пандемия, охватившая все континенты, была вызвана вирусом гриппа свиного происхождения A(H1N1)pdm09 в 2009 г. В течение многих лет именно вирусы гриппа типа А привлекали особое внимание исследователей из-за высокой способности этих патогенов вызывать глобальные эпидемии, которые обычно появляются в результате возникновения штаммов вируса нового подтипа. Это происходит благодаря антигенному сдвигу – механизму, при котором возникает реассортация между вирусами гриппа животных и человека или непосредственное преодоление вирусом межвидового барьера. При этом возбудитель передается от животного к человеку и в дальнейшем приобретает возможность легко передаваться от человека человеку [2].

Большинство коронавирусов, циркулирующих в популяции человека, имеет зоонозное происхождение. Предположительно природным резервуаром SARS-CoV-2 являются летучие мыши, а процесс передачи вируса человеку произошел путем прямого или косвенного контакта с инфицированными промежуточными хозяевами (возможно, панголинами) [3, 4]. Из-за высокой вирулентности малоизвестного патогена и отсутствия коллективного иммунитета к нему, заболеванию подвержены все возрастные и социально-экономические группы населения.

Однако грипп и другие респираторные вирусы традиционно вносят существенный вклад в структуру общей инфекционной заболеваемости как детского, так и взрослого населения. А коинфекции могут играть потенциальную роль в повышении заболеваемости и смертности во время пандемий.

Система дозорного эпидемиологического надзора подразумевает эффективные молекулярно-генетические методы исследования возбудителей ОРВИ и гриппа. Надзор за гриппом на глобальном уровне осуществляется под эгидой ВОЗ. В нашей стране действует национальная система надзора за гриппом и ОРВИ.

Цель данного исследования – расшифровка этиологии ОРВИ у детей в Республике Беларусь (РБ) в 2020-2021 гг.

Материалы и методы исследования. Материал для исследования (назальные мазки и мазки из зева) получен в рамках дозорного эпидемиологического слежения за острыми респираторными инфекциями (ОРИ), гриппоподобными заболеваниями (ГПЗ) и тяжелыми острыми респираторными инфекциями (ТОРИ) от пациентов с клиническими проявлениями ОРВИ и гриппа.

Для выявления генетического материала респираторных вирусов, вирусов гриппа А/В и SARS-CoV-2 доставленные образцы исследованы методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием наборов реагентов «ОРВИ-ген», «КОРОНА-ген», «COVID-19-скрин», «ФЛУ-ген» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, РБ).

Результаты исследования и обсуждение. За анализируемый период времени было исследовано 1355 клинических образцов, взятых у детей в возрасте от 0 до 17 лет. Генетический материал возбудителей ОРВИ был выявлен в 16% случаев (n=217). Подавляющее большинство расшифрованных случаев инфицирования представляло собой моноинфекцию (99%, n=215) с обнаружением таких патогенов, как риновирус (рино), аденовирус (АД), бокавирус (БВ), коронавирусы SARS-CoV-2, NL63 и OC43, парагрипп (ПГ 1-3 типа), а также метапневмовирус (МПВ) и респираторно-синцитиальный вирус (РС). Доля совместного инфицирования двумя респираторными возбудителями (SARS-CoV-2+МПВ и рино+МПВ) составила 1% (n=2).

Этиологическая расшифровка спектра возбудителей ОРВИ у детей в РБ в 2020-2021 гг. отображена на рисунке 1.

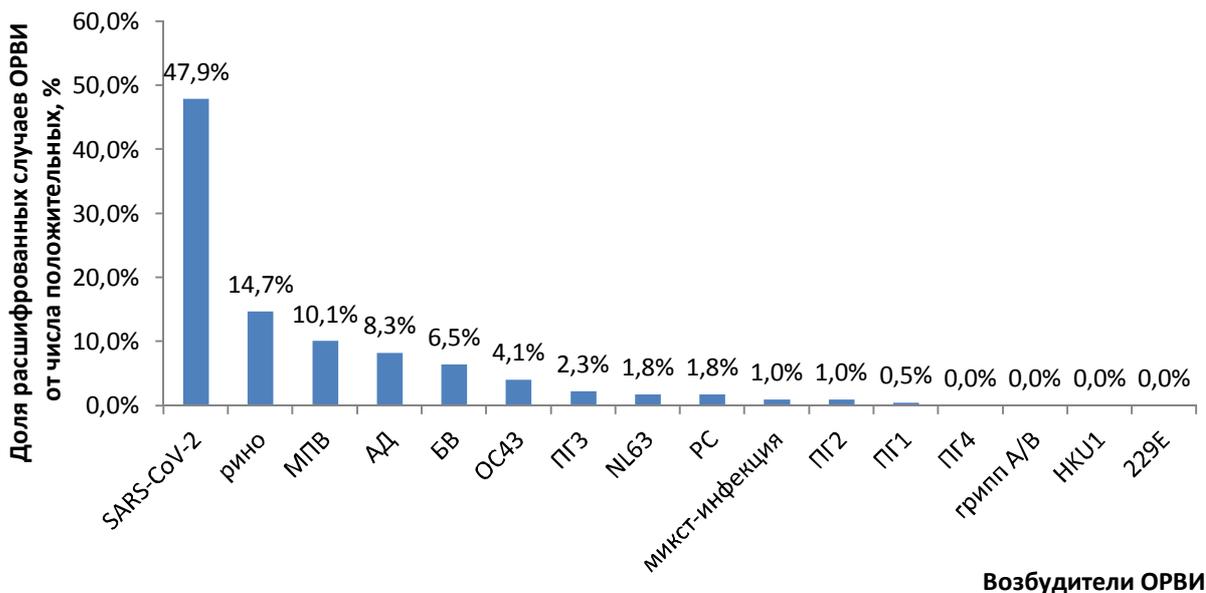


Рисунок 1. – Этиологическая структура возбудителей ОРВИ у детей в РБ в 2020-2021 гг.

Как видно из графика, наиболее частым возбудителем ОРВИ с установленной этиологией был коронавирус SARS-CoV-2 – 47,9% (n=104) случаев. Эти данные указывают на преобладающую роль возбудителя в формировании заболеваемости ОРВИ у детей.

В дозорных образцах, отобранных за весь период наблюдения, РНК вирусов гриппа А и В не выявлена. Т.к. ни один случай заболевания гриппом в РБ не обнаружен, то вероятнее всего SARS-CoV-2 конкурентно исключил вирус гриппа из его привычной сезонной циркуляции. Отсутствие лабораторно подтвержденных случаев гриппа за анализируемый период не означает, что патоген не встречается в популяции человека. Лабораторную диагностику желательно проводить для всех клинических случаев из категории ТОРИ, что не всегда возможно из-за ограниченных ресурсов.

В мировом масштабе, согласно данным Flu News Europe, абсолютного вытеснения гриппа не произошло. В умеренной зоне северного полушария зарегистрированная активность вирусов гриппа оставалась на очень низком уровне в течение всего сезона. В ряде стран сообщалось о единичных случаях обнаружения вирусов гриппа А и В. Также отмечалось спорадическое выявление вирусов гриппа в образцах из недозорных точек (больницы, школы, учреждения первичной помощи), не участвующие в дозорном слежении. При этом обнаруживались вирусы гриппа обоих типов – А и В. Общая доля положительных результатов из числа исследованных образцов составила 0,1% [5].

Также не встречались в циркуляции ПГ 4 типа и сезонные коронавирусы 229Е и НКУ1. Среди причинных факторов, которые сыграли немаловажную роль в предупреждении заболеваемости гриппом и ОРВИ в целом, следует отметить воздействие различных мер общественного здравоохранения и социальных мер, принимаемых для сокращения передачи инфекции COVID-19.

В межэпидемический и эпидемический период 2020-2021 гг. ожидалась не только одновременная циркуляция нескольких респираторных патогенов, но и смешанная инфекция, совместно с COVID-19. Это представляло бы высокую опасность для лиц, находящихся в группах риска в целом (дети от 6 месяцев до 5 лет, пожилые люди старше 65 лет), беременные женщины, лица с хроническими заболеваниями и работники здравоохранения). Как правило, коинфекции характеризуются более тяжелым течением болезни, чем моноинфекции.

Однако, среди пациентов с подтвержденной инфекцией COVID-19 коинфицирование вирусом SARS-CoV-2 и сезонным респираторным вирусом негриппозной этиологии (МПВ) наблюдалось в 1% (n=1), случай наблюдался у ребенка 6 лет. Заболевание протекало в легкой форме (ОРИ), госпитализация не требовалась.

Согласно публикациям, описывающим коинфекции SARS-CoV-2 с другими возбудителями ОРВИ, частота встречаемости данных случаев оценивается в 0-3%. Пациенты с подтвержденной инфекцией COVID-19, были положительными на один или несколько других возбудителей. Среди вирусных патогенов выявлялись риновирусы, РС, МПВ, ПГ, сезонный коронавирус [6-8].

Анализ сопроводительной документации показал, что инфекция COVID-19, протекала преимущественно в легкой форме, вызывая ОРИ, и составила 75% (n=78). Реже всего заболевание протекало в форме ТОРИ, составив 11,5% (n=12). Структура случаев инфицирования SARS-CoV-2 детей по отношению к категориям ОРВИ визуальна отобрана на рисунке 2.

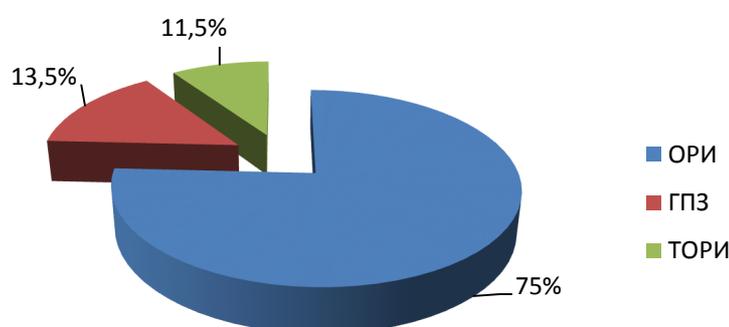


Рисунок 2. – Структура случаев заболевания инфекцией COVID-19 в зависимости от категории ОРВИ у детей в РБ в 2020-2021 гг.

Среди клинических проявлений инфекции COVID-19 были отмечены один или сочетание нескольких респираторных симптомов: заложенность носа, кашель, повышенная температура тела, одышка. Также наблюдались проявления со стороны желудочно-кишечного тракта (тошнота, рвота, диарея).

На долю случаев среди детей с лабораторно подтвержденным результатом SARS-CoV-2, обратившихся в стационар, приходилось 33,7% (n=35). Среднее время от начала болезни до госпитализации составляло 4 дня. Наиболее часто за стационарной помощью обращались пациенты из категории ОРИ (60%, n=21). Удельный вес ТОРИ от общего числа госпитализированных составил 31,4% (n=11).

Для анализа возрастного распределения инфекции COVID-19 пациенты были разделены на три группы: 0-4 года, 5-14 лет, 15-17 лет.

Чаще SARS-CoV-2 выявляли у детей в возрастной группе от 5 до 14 лет – 48% (n=50). У детей 0-4 и 15-17 лет примерно в одинаковом количестве случаев – 30% (n=31) и 22% (n=23) соответственно (рисунок 3).

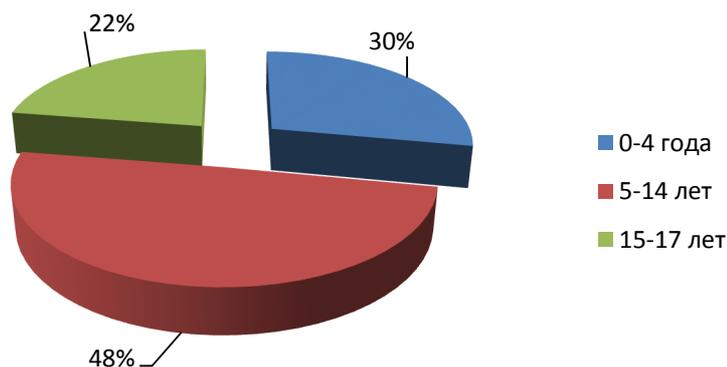


Рисунок 3. – Возрастная структура заболевания инфекцией COVID-19 у детей в РБ в 2020-2021 гг.

Выводы. Особенностью анализируемого периода 2020-2021 гг. являлось наблюдение за возбудителями ОРВИ и гриппа в условиях распространения инфекции COVID-19.

Почти половина случаев ОРВИ с установленной этиологией была вызвана коронавирусом SARS-CoV-2 (47,9%, n=104). Это говорит о доминировании нового возбудителя в сезонной и межсезонной циркуляции. Среди пациентов с подтвержденной инфекцией COVID-19 коинфицирование вирусом SARS-CoV-2 и сезонным респираторным вирусом негриппозной этиологии (МРВ) наблюдалось в 1% (n=1) случаев. Ведущее место в возрастной структуре заболевания инфекцией COVID-19 занимала группа детей от 5 до 14 лет (48%, n=50). У детей среди всех возрастных групп новый возбудитель чаще поражал верхние отделы дыхательных путей, что говорит о легком течении инфекции, вызывая ОРИ в 75% (n=78) случаев.

Накопленные данные соответствуют информации, предоставляемой ВОЗ, и большинству публикаций, в которых описываются респираторные инфекции [6-8].

Для оценки распространенности коинфекции SARS-CoV-2 с другими возбудителями ОРВИ, необходим более длительный период наблюдения, что даст информацию о динамике и тенденциях распространения респираторных инфекций, улучшит диагностику и внесет существенный вклад в прогнозирование заболеваемости в будущем.

Литература

1. Пандемия коронавирусного заболевания (COVID-19) [Электронный ресурс] / Европейское региональное бюро Всемирной организации здравоохранения. – Режим доступа: <https://www.euro.who.int/ru/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/novel-coronavirus-2019-ncov>. – Дата доступа: 01.10.2021.
2. Справочное пособие для оценки бремени болезни, связанного с сезонным гриппом, на уровне населения [Электронный ресурс] / ВОЗ. – Женева, 2015. – 99 с. – Режим доступа: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/178801/9789241549301_eng.pdf. – Дата доступа: 01.10.2021.
3. Abdelrahman, Z. Comparative review of SARS-COV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and influenza A respiratory viruses / Z. Abdelrahman, M. Li, X. Wang // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – 552909. doi:10.3389/fimmu.2020.552909
4. Особенности циркуляции респираторных вирусов в пред- и пандемические по гриппу и COVID-19 периоды [Электронный ресурс] / И.В. Киселева [и др.] // *Инфекция и иммунитет.* – 2021. – Режим доступа: <https://www.iimmun.ru/iimm/article/view/1662/1278>. – Дата доступа: 01.11.2021.
5. Bulletin Archives. Weekly influenza surveillance [Electronic resource] / *Flu News Europe* – Mode of access: <https://www.flunewseurope.org/Archives>. – Date of access: 01.10.2021.
6. Human respiratory viruses, including SARS-COV-2, circulating in the winter season 2019-2020 in Parma, Northern Italy / A. Calderaro [et al.] // *Int. J. Infect. Dis.* – 2020. – Vol. 102. – P. 79-84.

7. Coinfection with SARS-COV-2 and other respiratory pathogens in COVID-19 patients in Guangzhou, China / Z.T. Li [et al.] // J. Med. Virol. – 2020. – Vol. 92, No. 11. – P. 2381-2383.

8. Viral coinfection among COVID-19 patient groups: an update systematic review and meta-analysis / P. Malekifar [et al.] // BioMed Res. Int. – 2021. – Vol. 2021. – Article ID 5313832. doi: 10.1155/2021/53138322021

COVID-19 INFECTION IN ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS STRUCTURE IN CHILDREN IN BELARUS, 2020-2021

Anoshko O.N., Lapo T.P., Kishenko E.N., Sivets N.V., Shmeleva N.P.

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

The structure of acute respiratory viral infections (ARVI) in children aged 0-17 years (1355 clinical samples) was established by molecular genetic studies in the period 2020-2021 in the context of COVID-19. The ARVI pathogens genetic material of was detected in 16% of cases (n=217). The overwhelming majority of the decoded infection cases were monoinfection (99%, n=215) with the detection of such pathogens as rhino-, adeno-, bocaviruses, SARS-CoV-2, NL63, OC43 coronaviruses, parainfluenza, metapneumovirus (MPV), and respiratory syncytial virus. The share of coinfection with two respiratory pathogens (SARS-CoV-2+MPV and rhino+MPV) was in 1% (n=2) of cases. Almost half of the ARVI cases with an established etiology were caused by SARS-CoV-2 (47.9%, n=104), which indicates the dominance of the new pathogen in seasonal and off-season circulation. Among patients with confirmed COVID-19 infection coinfection with SARS-CoV-2 and seasonal respiratory non-influenza virus (MPV) was observed in 1% (n=1) of cases. The children group of 5-14 years old (48%, n=50) had the leading place in the age structure of the COVID-19 infection. In children, among all age groups, the new pathogen more often affected the upper respiratory tract, which indicates a mild course of infection, causing ARI in 75% (n=78) of cases.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, ARVI, co-infection, children, epidemiological situation, Republic of Belarus.

Поступила 04.11.2021

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПЕРВИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1 СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ БЕЗ ОПЫТА ЛЕЧЕНИЯ И ПАЦИЕНТОВ С НЕУДАЧЕЙ ЛЕЧЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Гасич Е.Л., Бунас А.С.

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

Резюме. Проблема элиминации ВИЧ-1 в Республике Беларусь по-прежнему остается актуальной. За последнее десятилетие значительно вырос охват антиретровирусной терапии, что ведет к риску возникновения, передачи и распространения лекарственно устойчивых вариантов ВИЧ-1. В данном исследовании оценена распространенность лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к лекарственным средствам групп нуклеозидных и ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы, протеазы и интегразы в образцах пациентов, начинающих первую линию терапии, собранных на территории Республики Беларусь в период 2018-2020 гг.

Ключевые слова: ВИЧ-1, первичная лекарственная устойчивость, Беларусь.

Введение. Эпидемиологическая ситуация в Республике Беларусь характеризуется устойчивым уровнем заболеваемости ВИЧ-инфекцией, что указывает на стабилизацию эпидемии. Так, в стране по состоянию на 1 августа 2021 г. зарегистрировано 31 424 случая ВИЧ-инфекции. В 2021 г. вновь выявлено 890 ВИЧ-инфицированных человек. По кумулятивным данным (1987–01.08.2021) 31,5% (9 886 человек), инфицированных вирусом иммунодефицита человека, заразились парентеральным путем (при внутривенном введении наркотических веществ), удельный вес лиц, инфицирование которых произошло половым путем, составляет 66,5% (20 894 человека) [1].

Результатом внедрения программы UNAIDS 90-90-90 в нашей стране является политика «лечить всех» независимо от числа лимфоцитов CD4+ и стадии инфекции. Соответственно, охват антиретровирусной терапии (АРТ) постоянно увеличивается, что способствует снижению распространения ВИЧ-инфекции и улучшению качества жизни пациентов.

В то же время, по данным ряда исследований, с увеличением количества пациентов, получающих АРТ, отмечается тенденция роста лекарственной устойчивости. Наиболее высок уровень резистентности к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы – эфавиренцу и невирапину, относящимся к препаратам первой линии терапии. Особенно важно выявление лекарственно значимых мутаций у пациентов, не получавших АРТ или возобновляющих ее после длительного перерыва. Это так называемая первичная или передающаяся лекарственная устойчивость (PDR), которая влияет на эффективность лечения, приводит к более быстрой неудаче лечения и в долгосрочной перспективе может иметь решающее значение для реализации государственной программы по профилактике ВИЧ-инфекции в стране.

В данном исследовании была проведена оценка спектра генетических вариантов и уровня распространенности лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в группе пациентов, начинающих либо возобновляющих первую линию АРТ после перерыва более чем в 3 месяца.

Материалы и методы исследования. Было исследовано 80 образцов РНК ВИЧ-1, выделенной из сыворотки/плазмы крови, собранной в 2018-2021 гг. от ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территории Республики Беларусь.

Для экстракции РНК ВИЧ-1 использовали комплект реагентов «РИБО-преп» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва, Россия).

Генотипирование образцов по участку гена gag-pol выполнено с использованием тест-системы для субтипирования и выявления мутаций резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации «Бел ВИЧ-1-резистентность-субтип», производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Беларусь). Для выявления лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к ингибиторам интегразы использовался in-house метод.

Секвенирование по Сэнгеру полученных ПЦР-продуктов проводили на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Applied Biosystems, США). Биоинформационный анализ выполняли при помощи программного обеспечения SeqA 6 и SeqScape 3. Определение генотипов/подтипов ВИЧ-1 и поиск замен лекарственной устойчивости к ингибиторам обратной транскриптазы, протеазы и интегразы осуществлялось с использованием алгоритма HIVdb Program на сайте базы данных лекарственной устойчивости ВИЧ Стэнфордского университета (<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/>).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения STATISTICA.

Результаты исследования и обсуждение.

Характеристика образцов, включенных в исследование. Образцы были получены из всех регионов Республики Беларусь, наибольшее количество поступило из Минска (n=58). Средний возраст пациентов составил 37,4±8,3 года; преобладающее число пациентов было мужского пола (60%). Распределение по географическим регионам и эпидемиологическая характеристика представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Распределение по географическим регионам и эпидемиологическая характеристика образцов (возраст, пол, регион)

	Всего	Брестская	Витебская	Гомельская	Гродненская	Минск	Минская	Могилевская
менее 18 лет	1	-	-	-	1	-	-	-
женщин	-	-	-	-	-	-	-	-
мужчин	1	-	-	-	1	-	-	-
18 – 25 лет	3	-	-	-	-	3	-	-
женщин	1	-	-	-	-	1	-	-
мужчин	2	-	-	-	-	2	-	-
26 – 35 лет	30	1	-	1	-	24	4	-
женщин	6	1	-	-	-	3	2	-
мужчин	24	-	-	1	-	21	2	-
36 – 45 лет	33	1	1	4	-	22	5	-
женщин	7	1	-	2	-	4	-	-
мужчин	26	-	1	2	-	18	5	-
более 45 лет	14	-	1	2	1	9	-	1
женщин	6	-	-	1	1	3	-	1
мужчин	8	-	1	1	-	6	-	-
	80	2	2	6	2	58	9	1

Генотипический пейзаж ВИЧ-1. В результате анализа генетического разнообразия субтипов ВИЧ-1 было установлено, что преобладающим генетическим вариантом в Республике Беларусь являлся под-подтип А6, к которому относились 76 секвенированных последовательностей ($95,0 \pm 2,4\%$). В единичных случаях выявлены генотип В и циркулирующая рекомбинантная форма CRF_02AG (по $2,5 \pm 1,7\%$ каждая).

Распространенность первичной лекарственной устойчивости (PDR) и основных мутаций PDR. Распространенность первичной лекарственной устойчивости к антиретровирусным лекарственным средствам составила $11,3 \pm 3,5\%$. Интересен факт, что все мутации были связаны с группой ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы вируса.

Не были установлены клинически значимые замены в геноме вируса, связанные с неэффективностью применения нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы вируса. Однако, в $10,0 \pm 3,4\%$ случаев выявлена замена аспарагина на валин в 62 аминокислотной позиции, которая является полиморфизмом для под-подтипа А6 ВИЧ-1, преобладающего в большинстве стран Восточной Европы и Центральной Азии. Замена А62V ($10,0 \pm 3,4\%$) в последовательности обратной транскриптазы ассоциирована с развитием низкого уровня устойчивости к зидовудину, однако для этого в последовательности должна быть основная мутация лекарственной устойчивости Q151M.

Также ни в одной из проанализированных последовательностей не было выявлено мутаций лекарственной устойчивости к ингибиторам протеазы и ингибиторам интегразы вируса. Это можно объяснить как относительно высоким генетическим барьером данной лекарственных средств, так и ограниченным использованием в схемах антиретровирусной терапии. В $97,5 \pm 1,7\%$ исследованных последовательностей была обнаружена компенсаторная замена лейцина на изолейцин в 74 аминокислотной позиции (L74I).

В 9 ($11,3 \pm 3,5\%$) случаях у пациентов группы PDR были установлены мутации резистентности к лекарственным средствам группы ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1. Наиболее часто были обнаружены замены K103N ($7,5 \pm 2,9\%$, $n=6$) и E138A ($6,3 \pm 2,7\%$, $n=5$), приводящие к возникновению лекарственной устойчивости к препаратам первой линии АРТ – невирапину и эфавиренцу, а также рилпивирину.

В настоящее время эксперты в области контроля за возникновением и распространением лекарственной устойчивости ВИЧ в мире рекомендуют в случае превышения 10% уровня резистентности в группе пациентов без опыта лечения отказ от неэффективных препаратов, либо полный охват тестирования образцов крови пациентов для выявления мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 на старте терапии.

Учитывая, что выборка исследования не соответствовала критериям ВОЗ, окончательные выводы об уровне распространенности лекарственной устойчивости в когорте ВИЧ-инфицированных пациентов можно будет сделать после проведения дополнительных исследований.

Заключение. Нами была оценена лекарственная устойчивость у 80 ВИЧ-инфицированных пациентов, начинавших или возобновлявших первую линию АРТ между 2018-2020 гг. Результаты анализа распространённости генетических вариантов ВИЧ-1 показали, что под-подтип А6 остаётся преобладающей генетической формой ВИЧ-1 на территории Республики Беларусь.

Мутации лекарственной устойчивости ВИЧ-1 были выявлены только к группе ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы, уровень которой составил $11,3 \pm 3,5\%$ и превысил рекомендованный ВОЗ 10%-ный порог для принятия мер в области обществен-

ного здравоохранения. Наиболее часто была выявлена лекарственная устойчивость к невирапину и эфавиренцу, а также рилпивирину. Таким образом, распространенность PDR в Республике Беларусь по-прежнему остаётся высокой.

Резистентность ВИЧ-1 к ингибиторам протеазы, интегразы и нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы у пациентов не была выявлена, что указывает на эффективность применения их в стране для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов и возможность их использования в схемах доконтактной профилактики ВИЧ-1.

Несмотря на то, что ни одна из обнаруженных нуклеотидных замен не привела к возникновению лекарственной устойчивости к ингибиторам протеазы, интегразы или нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы, в исследованных последовательностях были выявлены компенсаторные полиморфические замены, характерные для под-подтипа А6. Высокий процент встречаемости замены А62V у пациентов, не получавших АРТ, отличает под-подтип А6 от прочих генетических форм ВИЧ-1 [2].

Замена L74I в последовательности интегразы ВИЧ-1 также является полиморфной. Так, в зависимости от субтипа она возникает в 3-30% случаях у пациентов без опыта АРТ. В последовательностях генотипа А она обнаруживается в 21% случаев, в то время как её встречаемость для под-подтипа А6 достигает 93-100% [3]. Наши исследования показали наличие замены L74I в 78 последовательностях, что составило $97,5 \pm 1,7\%$. В случае появления замен G140A/C/S, Q148 H/K/R и компенсаторных замен V75I, T97A замена L74I может значительно снизить восприимчивость к лекарственным средствам ингибиторов интегразы [4]. Наиболее часто встречающейся основной заменой лекарственной устойчивости к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы являлась мутация E138A, также являющаяся естественным полиморфизмом под-подтипа А6 и приводящая к развитию низкого уровня ЛУ к рилпивирину, и K103N, приводящая к значительному снижению восприимчивости к невирапину и эфавиренцу.

Нами получены предварительные данные, указывающие на высокий уровень распространенности мутаций резистентности к невирапину и эфавиренцу в группе PDR в Республике Беларусь. Учитывая, что выборка исследования не соответствовала критериям ВОЗ, окончательные выводы о необходимости рассмотрения замены схем первой линии на схемы, не содержащие ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, поскольку существует риск их неэффективности, будут сделаны после проведения дополнительных исследований. В настоящее время ВОЗ рекомендует отказаться от использования невирапина и эфавиренца в схемах первого ряда вне зависимости от уровня распространённости PDR [5].

Наблюдение за развитием лекарственной устойчивости среди разных групп пациентов является необходимой мерой на национальном уровне. Полученные знания о распространённости и характере PDR могут быть использованы для оптимизации руководств по лечению ВИЧ-инфекции, что в долгосрочной перспективе может способствовать снижению распространения лекарственной устойчивости ВИЧ-1.

Литература

1. Эпидситуация по ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь. По состоянию на 01.04.2021 [Электронный ресурс] / Центр гигиены и эпидемиологии при Управлении делами Президента Республики Беларусь. – Режим доступа: <http://cgeud.by/2021/04/14/эпидситуация-по-вич-инфекции-в-респуб-5/>. – Дата доступа: 18.10.2021.

2. A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses / A.N. Kolomeets [et al.] // AIDS. – 2014. – Vol. 28, No. 17. – P. F1-F8.

3. Genetic features of HIV-1 integrase sub-subtype A6 predominant in Russia and predicted susceptibility to INSTIs / A. Kirichenko [et al.] // Viruses. – 2020. – Vol. 12, № 8. – P. 838.

4. HIV-1 integrase diversity and resistance-associated mutations and polymorphisms among integrase strand transfer inhibitor-naive HIV-1 patients from Cameroon / S.G. Mikasi [et al.] // AIDS Res. Hum. Retroviruses. – 2020. – Vol. 36, No. 5. – P. 450-455.

5. Updated recommendations on first-line and second-line antiretroviral regimens and post-exposure prophylaxis and recommendations on early infant diagnosis of HIV [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-CDS-HIV-18.51>. – Date of access: 15.10.2021.

PREVALENCE OF HIV-1 PRE-TREATMENT DRUG RESISTANCE IN BELARUS

Gasich E.L., Bunas A.S.

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

The problem of HIV-1 elimination remains urgent in Belarus. The coverage of antiretroviral therapy has significantly grown over the past decade increasing the risk of emergence, transmission and spreading of drug-resistant variants of HIV-1. This study aims to assess the prevalence of HIV-1 drug resistance to NRTIs, NNRTIs, PIs and INSTIs in samples of patients starting the first-line therapy, collected in Belarus in the period 2018-2020.

Keywords: HIV-1, PDR, drug resistance, Belarus.

Поступила 28.10.2021

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА Е НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

¹Давыдов В.В., ¹Жаворонок С.В., ²Красочко П.А., ³Борисовец Д.С.,
¹Анисько Л.А., ⁴Гасич Е.Л., ¹Марчук С.И.

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

²Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», Витебск, Республика Беларусь

³Республиканское научно-исследовательское дочернее унитарное предприятие «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», Минск, Республика Беларусь

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

Резюме. Изучены особенности эпидемического процесса инфекции, вызываемой вирусом гепатита Е (ВГЕ), в неэндемичном районе. Частота встречаемости антител к ВГЕ (анти-ВГЕ IgG) в общей популяции жителей Беларуси составляет 81/1114 – 7,3% (95 ДИ 5,8–9,0). В группе пациентов с поражением печени этот показатель достоверно выше и составляет 187/1669 – 11,2% (95% ДИ 9,6–12,9). При обследовании сывороток 1457 иностранных граждан, временно пребывающих на территории республики, у 76 лиц, что составляет 5,22% (95% ДИ 4,11–6,53) были обнаружены анти-ВГЕ IgG. В 380 (33,7±1,41 на 100 исследований) из 1126 исследованных образцов сывороток крови домашних свиней были обнаружены анти-ВГЕ IgG. Все случаи гепатита Е, выявленные в Беларуси, вызваны 3 генотипом и во многих случаях являются автохтонными.

Ключевые слова: вирус гепатита Е, эпидемический процесс, Беларусь.

Введение. Одним из недостаточно изученных аспектов эпидемиологии инфекции, вызываемой вирусом гепатита Е (ВГЕ), является высокая распространенность антител к ВГЕ (анти-ВГЕ IgG) в развитых странах, где инфекция не является эндемической, несмотря на редко регистрируемые случаи острого клинического гепатита Е. В русскоязычной научной литературе этот факт известен как «парадокс Балаяна» [1]. Причины этого несоответствия не совсем понятны, но существует несколько гипотез, включая низкую специфичность и перекрестную реактивность тестов IgG против ВГЕ, возможное существование авирулентных штаммов ВГЕ и высокую частоту бессимптомной инфекции гепатита Е.

Вирус гепатита Е, РНК-вирус семейства *Hepeviridae*, имеет выраженную генетическую неоднородность. Пять из восьми известных генотипов ВГЕ (ВГЕ-1 – ВГЕ-8) могут вызывать инфекцию у человека. Исследования популяционного иммунитета свидетельствуют о том, что ВГЕ встречается во всем мире с существенными региональными различиями в серологической распространенности [2]. Эпидемиологические исследования показали, что ВГЕ может передаваться людям четырьмя основными путями: 1) через загрязненную воду (фекально-оральный путь) (ВГЕ-1 и ВГЕ-2); 2) при употреблении в пищу продуктов животного происхождения, зараженные ВГЕ (ВГЕ-3 и ВГЕ-4); 3) при переливании крови и пересадке органов от зараженных доноров; и 4) вертикально от матери к ребенку. Остается неясным, в какой степени сексуальные контакты представляют риск заражения. Недавнее исследование, проведенное в Великобритании, показало, что по сравнению с общей популяцией у мужчин, практикующих секс с мужчинами, наблюдается несколько повышенная серологическая распространенность анти-ВГЕ IgG [3].

Фекально-оральный путь играет решающую роль, особенно в передаче ВГЕ-1 и ВГЕ-2 [4]. В то время как ВГЕ-1 неоднократно приводил к крупным вспышкам в различных странах Азии и Африки и спорадическим вспышкам в Латинской Америке (Венесуэла и Куба), ВГЕ-2, по-видимому, менее распространен. ВГЕ-2 был впервые выявлен в

середине 1980-х гг. в двух вспышках в Мексике, а затем и в случаях гепатита в африканских странах, таких как Нигерия, Намибия и Чад. Помимо ВГЕ-2, в этих африканских странах циркулирует ВГЕ-1. ВГЕ-1 и ВГЕ-2 специфичны для человека и могут экспериментально передаваться приматам, таким как шимпанзе и макаки, но не другим видам, таким как свиньи и грызуны [5]. Согласно имеющимся данным, инфекции ВГЕ-1 и ВГЕ-2 в Европе, как правило, были связаны с возвращением из эндемичных районов [6]. В какой степени ВГЕ-1 циркулирует в различных регионах Европы и были ли отдельные случаи гепатита ВГЕ-1, описанные как автохтонные инфекции, вызваны циркулирующей этого генотипа, требует дальнейшего изучения.

Анализ опубликованных данных, впервые в 2005 г. позволил оценить распространенность и заболеваемость инфекциями ВГЕ-1 и ВГЕ-2 в эндемичных регионах Азии и Африки [7]. Во всем мире было зарегистрировано около 20 млн случаев инфицирования, примерно у 3 млн инфицированных развились симптомы гепатита, около 70 000 из этих пациентов умерли и примерно у 3 000 беременных женщин инфекция вызвала мертворождение. Соответствующие оценки для инфекций ВГЕ-3 и ВГЕ-4 не могут быть выполнены из-за отсутствия необходимых данных.

После первого описания ВГЕ у свиней [8] все большее количество сообщений показало, что спорадические случаи гепатита, вызванного ВГЕ, наблюдаются в неэндемичных регионах, то есть в промышленно развитых странах, для которых не было никакой связи с поездками в классические эндемичные регионы. В этих странах люди страдали инфекциями, вызванными генотипами 3 и 4. Циркуляция ВГЕ-3 наблюдается во всем мире, он был обнаружен в Азии, Америке, Африке, Европе и Океании, тогда как инфекции ВГЕ-4 были зарегистрированы до сих пор в основном в Азии (Китай, Япония, Вьетнам, Индонезия и Индия) [9].

Гепатит Е, вызываемый ВГЕ-3 и ВГЕ-4, классифицируется как зооноз [10]. В промышленно развитых странах животные, в частности свиньи, считаются источником инфекции для человека. Сероэпидемиологические исследования демонстрируют высокую распространенность ВГЕ среди популяций свиней практически во всех регионах мира [11]. Филогенетические исследования этих изолятов ВГЕ указывают на высокую гетерогенность их последовательностей. Помимо свиней, ВГЕ был обнаружен у различных других видов животных, таких как крысы, собаки и птицы. Однако до сих пор остается не совсем понятным, играют ли эти виды значимую роль в качестве источника ВГЕ, передаваемого человеку.

Первоначальные доказательства того, что гепатит Е может быть вызван употреблением сырых или недостаточно термически обработанных продуктов из свинины, были получены в результате исследований, проведенных в Японии в начале двухтысячных [12]. В печени свиней, купленной в продуктовых магазинах, последовательности ВГЕ были обнаружены с помощью ПЦР, которые группировались в клады генотипа 3 или 4. Также филогенетический анализ последовательностей показал их тесную связь с последовательностями, выявленными у пациентов с гепатитом Е, проживающих в том же регионе.

В сточных водах РНК ВГЕ была обнаружена в различных промышленно развитых странах, таких как Испания (Барселона), Франция (Нанси) и США (Вашингтон, округ Колумбия). Фекалии людей и животных (свиней) являются вероятным источником загрязнения сточных вод. Неясно, в какой степени ВГЕ может передаваться через недостаточно очищенные сточные воды, которые, например, используются в оросительных системах в промышленно развитых странах. Исследования сточных вод в Швейцарии, Италии и Испании показывают, что помимо ВГЕ-3 можно обнаружить последовательности ВГЕ-1.

В доступной литературе имеются сведения о том, что ВГЕ-инфекция может быть связана с употреблением в пищу мидий и устриц [13]. Кроме того, инфекции ВГЕ наблюдались у людей, которые имеют вегетарианскую диету, что указывает на возможность существования дополнительного пути передачи. ВГЕ был обнаружен на овощах, который, вероятно, был получен из загрязненной ВГЕ воды или свиного навоза [14].

Регистрация числа случаев гепатита Е в развитых странах, таких как Европа, Япония и США, дает лишь ограниченную информацию о распространенности инфекций ВГЕ среди населения. Течение инфекции ВГЕ-3 или ВГЕ-4 преимущественно бессимптомное. Поэтому надежные эпидемиологические данные о распространенности ВГЕ могут быть собраны только путем определения антител, специфичных к ВГЕ.

Немецкое исследование здоровья взрослых, проведенное в 2008-2011 гг. позволило оценить распространенность анти-ВГЕ в Германии [15]. Было исследовано более 4000 сывороток взрослых в возрасте 18-79 лет с использованием тестов на антитела к вирусу гепатита Е. Было показано, что 16,8% образцов были положительными по антителам, с увеличением распространенности антител с возрастом.

Республика Беларусь относится к регионам с низким уровнем распространения вируса гепатита Е [16]. Регистрируемая заболеваемость гепатитом Е в Беларуси находится на уровне 0,02-0,04 на 100 000 населения. Специфическая диагностика гепатита Е в учреждениях здравоохранения до настоящего времени практически не проводится, кроме научных исследований, и судить о распространении гепатита Е в регионе не представляется возможным. Случаи манифестных форм гепатита Е проходят под другими диагнозами и, вероятно, большинство из них регистрируются как гепатиты с неустановленной этиологией. Вследствие того, что эпидемический процесс ВГЕ носит скрытый характер, изучение реальных масштабов циркуляции ВГЕ среди населения республики и разработки соответствующих противоэпидемических мероприятий, с учетом зооантропонозной природы заболевания, является актуальной задачей здравоохранения Республики Беларусь.

Целью настоящего исследования явилось изучение эпидемического процесса ВГЕ в Республике Беларусь.

Материалы и методы исследования. Сбор образцов биологического материала и их исследование осуществляли на протяжении 2016-2020 гг.

В процессе проведения исследований были протестированы 2784 сыворотки крови, полученных от различных групп населения, проживающего в Брестской и Минской областях Республики Беларусь. В исследовании были представлены люди всех возрастов, которые были разделены на 6 возрастных групп: младше 25 лет, 25-34 года, 35-44 года, 45-54 года, 55-64 года и старше 64 лет. В каждой возрастной группе были мужчины и женщины, общее соотношение полов в исследовании составило 1:1,13.

В исследовании участвовало две категории людей. Первая из них включала условно здоровых людей, не имеющих жалоб со стороны органов желудочно-кишечного тракта, и содержащих в крови специфичный для повреждения печени гепатотропный фермент аланинаминотрансферазу (АлАт) в пределах клинической нормы (менее 53 МЕ/л). В другую группу исследования были включены пациенты инфекционных отделений, проходящих лечение в стационаре, имеющих жалобы со стороны печени, и уровень АлАт более двукратного повышения относительно клинической нормы (>106 МЕ/л), что свидетельствует о наличии поражения печени.

Для оценки вероятности завоза ВГЕ из-за пределов республики и его циркуляции на территории республики обследовано 1457 иностранных граждан, временно пребывающих на территории Республики Беларусь, на наличие антител ВГЕ IgG и IgM.

От всех участников исследования было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Для выявления анти-ВГЕ IgG в биологическом материале, полученном от домашних свиней исследовано 1126 образцов сыворотки крови свиней 38 сельхозпредприятий агропромышленного комплекса (АПК) и 52 личных подворных хозяйств (ЛПХ) Минской, Витебской, Могилевской и Гродненской областей.

Исследование активности АлАт в сыворотке крови проводили с использованием набора реагентов для определения активности АлАт кинетическим методом («Анализ-Х», Республика Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя. В образцах сыворотки крови определяли анти-ВГЕ IgG методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов НПО «Диагностические системы» («ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G») согласно инструкции производителя. Для исследования сывороток свиней вместо конъюгатов, имеющихся в наборе, использовали раствор белка А стафилококка, конъюгированного с пероксидазой хрена.

Полученные образцы использовали для обнаружения РНК ВГЕ при помощи ПЦР анализа. Набор для выделения нуклеиновых кислот (Jena Bioscience, Германия) использовали в соответствии с протоколом производителя для выделения тотальной РНК. Для выявления РНК ВГЕ применяли адаптированный нами метод гнездовой ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с вырожденными праймерами, ориентированными на участок ORC2 генома ВГЕ с 5905 нт по 6635 нт). Условия проведения ОТ-ПЦР соответствовали описанным ранее [17]. Подтверждение положительных результатов проводили коммерческим набором HEV RT-PCR Kit 2.0 (RealStar®, Altona, Германия).

Набор QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Германия) использовали для экстрагирования из агарозы продуктов амплификации, содержащихся в геле. Нуклеотидную последовательность фрагмента генома ВГЕ определяли в ходе прямого секвенирования ампликонов на автоматическом секвенаторе 3500 GeneticAnalyzer (ABI, Foster City, США) с использованием набора BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit. Анализ нуклеотидных последовательностей ВГЕ их генотипирование выполняли с помощью программного обеспечения MEGA X [18]. В анализ были включены 37 нуклеотидных последовательностей, являющихся фрагментами ORC2 ВГЕ величиной 273 нуклеотида (нуклеотидные позиции 6193-6466 относительно штамма Вигма, номер в GenBank M73218). 9 последовательностей были выделены из биологического материала человека и животных в Республике Беларусь, 23 референсные последовательности для 1–7 генотипов ВГЕ и субгенотипов ВГЕ3, предложенных Smith D.V. и соавторами, по 3 наиболее близкие последовательности к выделенным в Беларуси, установленные в результате BLAST-анализа. Последовательность птичьего ВГЕ была включена в филогенетический анализ как внешняя группа. Филогенетический анализ был проведен методом максимального правдоподобия и модели Хасегава-Кишино-Яно. Построено филогенетическое дерево с наибольшим логарифмическим правдоподобием (-94549,25). Процент деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе, показан рядом с ветвями. Дерево построено в масштабе, длина ветвей измеряется количеством замен на сайт. Этот анализ включал 36 нуклеотидных последовательностей. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета статистического анализа данных «Statistica for Windows 12.0» («StatSoft Inc.», Талса, США). Количественные переменные представляли в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (p25%–p75%). Для изучения взаимосвязи изучаемых показателей рассчитывали коэффициент корреляции непараметрическим методом Спирмена. Для качественных переменных определяли абсолютную частоту (n), относительную частоту – долю (%) от общего числа случаев в исследуемой группе и доверительный интервал. Значимость различий долей устанавливали по критерию χ^2 . Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что из 2784 сывороток крови, полученных от людей двух изучаемых групп, в 268 обнаружены анти-ВГЕ IgG, что составляет 9,6% (95% ДИ 8,5–10,8). В группе

пациентов с поражением печени анти-ВГЕ IgG был обнаружен в 187 сыворотках из 1669 исследованных, что составляет 11,2% (95% ДИ 9,6–12,9). В группе условно здоровых граждан анти-ВГЕ IgG был выявлен у 81 человека из 1114 изученных, что составляет 7,3% (95 ДИ 5,8–9,0). Таким образом, поражение печени, сопровождающееся повышением уровня специфических трансаминаз, достоверно увеличивает показатель встречаемости анamnестических анти-ВГЕ IgG в этой группе по сравнению с группой условно здорового населения ($\chi^2=11,842$ $p=0,00058$) (рисунок 1). Использование непараметрического метода корреляционного анализа Спирмена позволило установить статистически достоверную слабую положительную связь между частотой анти-ВГЕ IgG и возрастом людей. Значения коэффициента корреляции в изучаемых группах представлены в таблице 1.

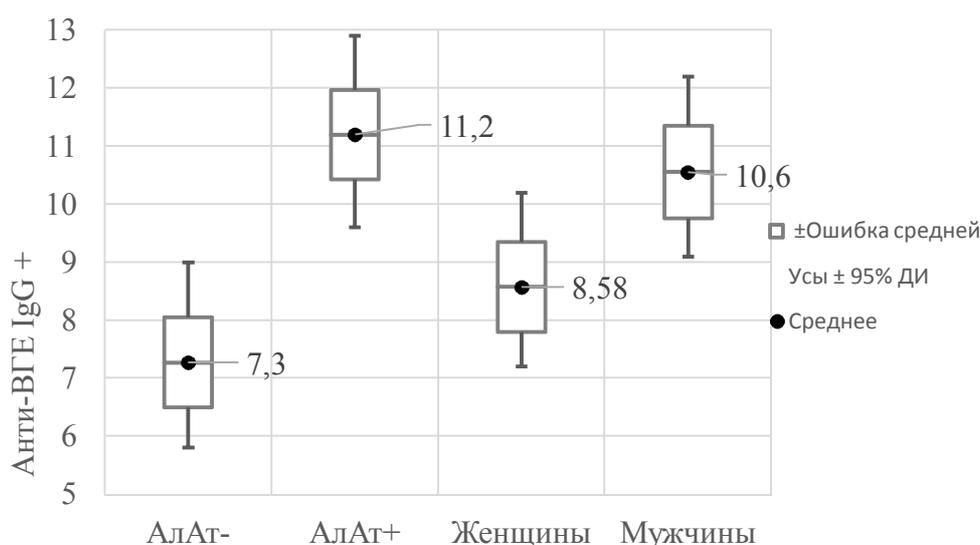


Рисунок 1. – Частота встречаемости анти-ВГЕ IgG в исследуемых группах

Таблица 1. – Значение коэффициента корреляции Спирмена (ρ) и его достоверность

Группа	Коэффициент
Ати-ВГЕ IgG+	$n=2784$ $\rho=0,099$ $p<0,001$
Ати-ВГЕ IgG+ АлАт+	$n=1670$ $\rho=0,099$ $p<0,001$
Ати-ВГЕ IgG+ Мужчины	$n=1478$ $\rho=0,113$ $p<0,001$
Ати-ВГЕ IgG+ Мужчины АлАт+	$n=977$ $\rho=0,124$ $p<0,001$
Ати-ВГЕ IgG+ Мужчины АлАт-	$n=501$ $\rho=0,107$ $p<0,05$
Ати-ВГЕ IgG+ Женщины	$n=1306$ $\rho=0,091$ $p<0,01$
Ати-ВГЕ IgG+ Женщины АлАт+	$n=693$ $\rho=0,080$ $p<0,05$
Ати-ВГЕ IgG+ Женщины АлАт-	$n=613$ $\rho=0,109$ $p<0,01$

При обследовании сывороток 1457 иностранных граждан в возрасте $23,3\pm 3,9$ лет, временно пребывающих на территории Республики Беларусь, у 76 лиц, что составляет 5,22% (95% ДИ 4,11-6,53) были обнаружены анти-ВГЕ IgG. У 15 из них, что составляет 1,03% (95% ДИ 0,58-1,7) были выявлены также анти-ВГЕ IgM и симптомы острого вирусного гепатита, протекающего в стертой безжелтушной форме (гепатомегалия, повышение уровня АлАТ в сыворотке крови). Серопозитивность когорты иностранных граждан, не имеет достоверных отличий от данных, полученных при обследовании здоровых граждан Республики Беларусь (рисунок 2). В результате анализа контингента серопози-

тивных лиц из числа иностранных граждан установлено, что наибольшая частота выявления анти-ВГЕ IgG была отмечена у жителей Индии и Туркменистана (рисунок 3). Иностранные граждане из этих стран, наиболее вероятно представляют группу риска, обуславливающую завоз ВГЕ из эндемичных по гепатиту E территорий.

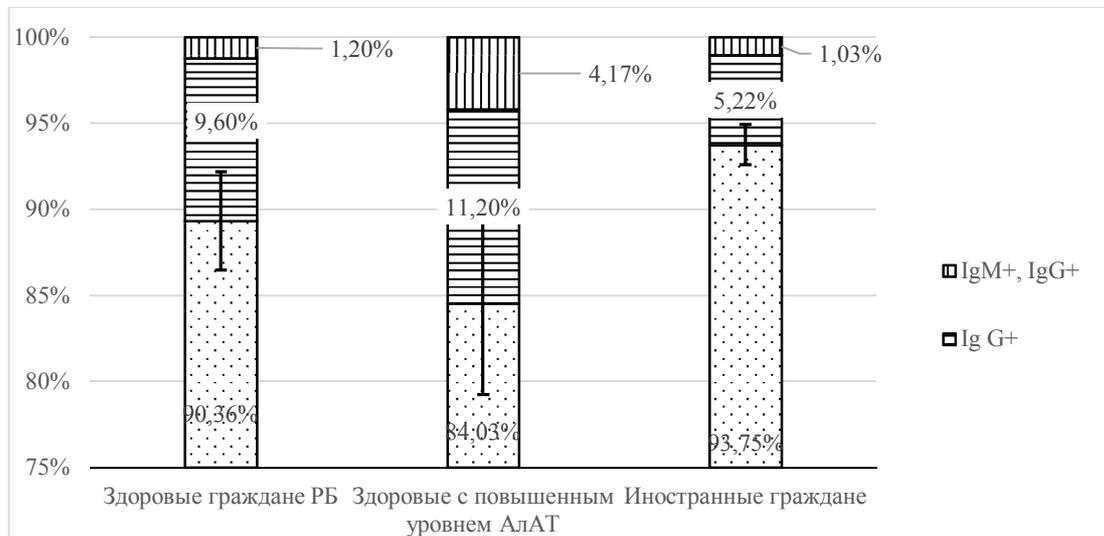


Рисунок 2. – Частота выявления анти-ВГЕ среди практически здоровых граждан Республики Беларусь и иностранных граждан, временно проживающих в республике

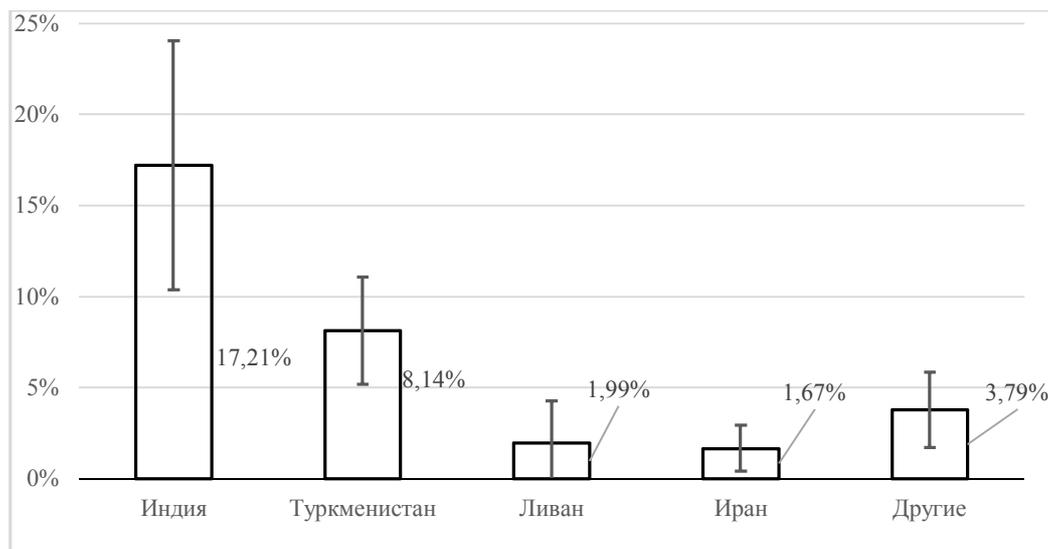
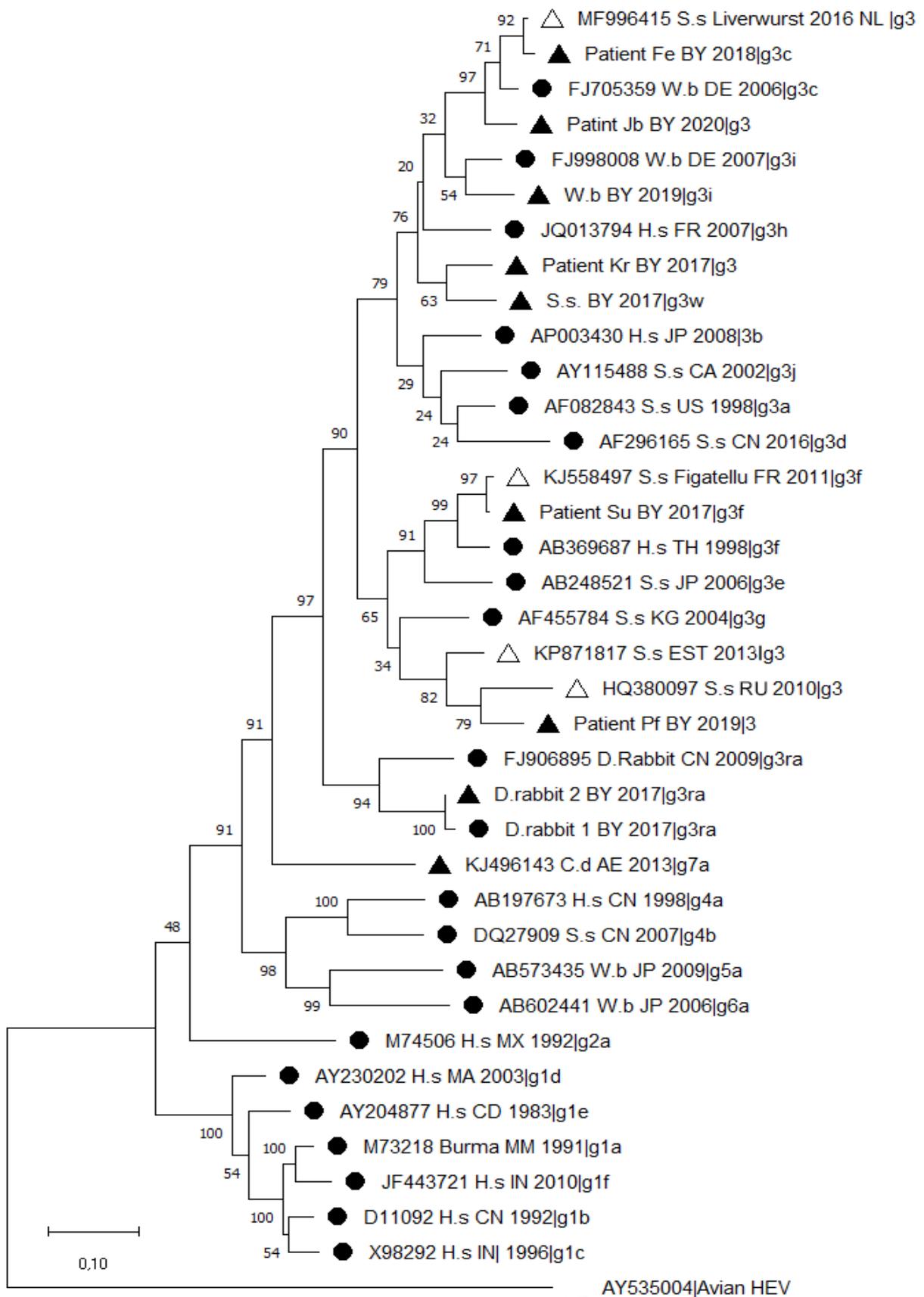


Рисунок 3. – Характеристика контингента сероположительных анти-ВГЕ IgG иностранных граждан, временно проживающих в Республике Беларусь

На основе филогенетического анализа последовательностей, кодирующих фрагмент белка капсида вируса, построено филогенетическое дерево, которое позволило оценить степень генетического родства последовательностей ВГЕ, выделенных от человека и животных в Беларуси, с референсными последовательностями ВГЕ, установленными для генотипов и субгенотипов, и гомологичными последовательностями из базы данных GenBank (рисунок 4).



Условные обозначения: ▲ – последовательности, выделенные в Беларуси,
 ● – референсные последовательности, △ – близкие к последовательностям из Беларуси

Рисунок 4. – Филогенетическое дерево для частичной последовательности ORC2

Последовательность генома вируса, имеющая на дендродрамме код «Patient_Su_BY_2017|g3f», выделенная из организма пациента в 2017 г., который за 1 месяц до начала заболевания выезжал во Францию, а также постоянно употребляет в пищу сырокопченую колбасу домашнего производства, с вероятностью 97% образует единую филогенетическую ветвь с последовательностью, выделенную из традиционной корсиканской сыровяленой свиной колбасы «Фигателли» («KJ558497_S.s_Figatellu_FR_2011|g3f»). Изолят «Patient_Fe_BY_2018|g3c», выделенный из его организма, относится к 3с субгенотипу ВГЕ, поскольку его разделяет незначительное эволюционное расстояние ($0,05 \pm 0,015$) с референсным штаммом «FJ705359_W.b_DE_2006|g3c», выделенным из организма дикого кабана в Германии. Эта последовательность имеет минимальное эволюционное расстояние, составляющее $0,01 \pm 0,007$, с последовательностью, выделенную из ливерной колбасы в Нидерландах в 2016 г., и с вероятностью 92% кластеризуется с ней в одну филогенетическую ветвь. В эту же группу последовательностей с вероятностью 97% также отнесен изолят «Patient_Jb_BY_2020|g3», выделенный из организма пациента, прибывшего из стран западной Европы, что вероятно также свидетельствует о случае завоза патогена из-за пределов Беларуси и в данном случае. В результате проведенных исследований удалось выявить аутохтонные случаи заболевания гепатитом Е в Беларуси. Исследование нуклеотидной последовательности изолята «Patient_Kr_BY_2017|g3», выделенной из организма пациента в 2017 г., употреблявшей свиную печень, не прошедшую термической обработки, позволило установить высокую степень гомологии с последовательностью, выделенной из фекалий домашней свиньи из Минской области, а также последовательностью, выделенной из организма дикого кабана из Смолевичского района Минской области. Все три последовательности кластеризуются в одной филогенетической ветви дендродраммы в 76% репликаций. Величина эволюционных дистанций между этими последовательностями составляет $0,13 \pm 0,025$ и $0,14 \pm 0,025$ соответственно. Изоляту «W.b_BY_2019|g3i» назначен 3i субгенотип ввиду высокой степени идентичности этой последовательности с референсным штаммом «FJ998008_W.b_DE_2007|g3i» этого субгенотипа ($pd=0,1 \pm 0,021$). Изолят «Patient_Kr_BY_2017|g3» имеет статистически недостоверные различия эволюционных дистанций с референсными последовательностями 3h, 3i, 3j субгенотипов, поэтому отнести ее к какому-либо из них не представляется возможным.

В 380 ($33,7 \pm 1,41$ на 100 исследований) из 1126 исследованных образцов сывороток крови домашних свиней из 90 хозяйств различных регионов Беларуси были обнаружены анти-ВГЕ IgG, что свидетельствует о значительной роли домашних свиней как резервуара ВГЕ на территории Республики Беларусь и в полной мере соответствует результатам европейских исследований. Результаты изучения серопревалентности домашних свиней в различных регионах Беларуси представлены в таблице 2.

Частота встречаемости анти-ВГЕ IgG в сыворотке крови, полученной у свиней в Могилевской и Витебской областях, составила соответственно $26,1 \pm 2,70$ и $28,3 \pm 2,06$, что достоверно ниже ($p < 0,05$), чем аналогичные показатели в Минской и Гродненской областях, в которых серопревалентность анти-ВГЕ домашних свиней составила $41,2 \pm 2,76$ и $67,2 \pm 5,74$ соответственно. Возможно, достоверно более низкая зараженность домашних свиней ВГЕ в северо-восточных регионах страны является результатом более жесткого климата этих мест и может быть обусловлена вовлечением в процесс циркуляции возбудителя этапа, на котором вирус находится во внешней среде.

Заключение. На территории Республики Беларусь происходит интенсивная циркуляция ВГЕ. Частота встречаемости анamnестических антител к ВГЕ в общей популяции составляет 7,3%. Эпидемический процесс ВГЕ в Беларуси носит скрытый характер. Реальное распространение ВГЕ среди населения республики существенно превосходит

частоту диагностированных случаев, что указывает на низкую настороженность медицинского персонала на гепатит E и субклиническое течение заболевания у большинства пациентов.

Таблица 2. – Серопревалентность анти-ВГЕ IgG в сыворотке крови свиней в различных регионах Беларуси

Регион и тип хозяйства	Число исследований	Анти-ВГЕ IgG+	Частота (на 100 исследований)	Ошибка
Минская область:	318	131	41,2	±2,76
предприятия АПК	191	55	28,8	±3,28
ЛПХ	127	76	59,8	±4,35
Витебская область:	477	135	28,3	±2,06
предприятия АПК	201	38	18,9	±2,76
ЛПХ	276	97	35,1	±2,87
Могилевская область:	264	69	26,1	±2,70
предприятия АПК	80	10	12,5	±3,70
ЛПХ	184	59	32,1	±3,44
Гродненская область	67	45	67,2	±5,74
Всего по Беларуси:	1126	380	33,7	±1,41
предприятия АПК	472	103	21,8	±1,90
ЛПХ	587	232	39,5	±2,02

Распространенность анти-ВГЕ IgG в группе пациентов, имеющих повышенный уровень трансаминаз, достоверно выше, чем в общей популяции и составляет 11,2%, что, вероятно, свидетельствует о значительной роли гепатита E, как фактора развития вирусных гепатитов у человека.

Установлена статистически достоверная корреляционная положительная связь увеличения частоты встречаемости анти-ВГЕ IgG и возраста людей, что вероятно обусловлено длительным сохранением антител в организме человека и наличием эпидемических особенностей распространения ВГЕ у людей старшего возраста. Закономерности процесса элиминации анти-ВГЕ с увеличением возраста человека нуждаются в дальнейшем изучении.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о существовании значительных рисков завоза ВГЕ на территорию Республики Беларусь. Установлена возможность завоза ВГЕ 1 и 2 генотипов в республику из гиперэндемичных по гепатиту E территорий Средней Азии и Индии. Достоверно доказаны случаи завоза ВГЕ 3 генотипа из стран Западной Европы.

В целях разработки системы эпидемического надзора и контроля за гепатитом E целесообразно внедрение тестов на маркеры ВГЕ при проведении медицинских осмотров, обследовании иностранных граждан, прибывших в Республику Беларусь из государств, являющихся гиперэндемичными по гепатиту E, а также широкое внедрение в клиническую практику диагностических систем на основе ИФА и ПЦР для диагностики гепатита E у пациентов с подозрением на вирусный гепатит. Необходимо дальнейшее изучение эпидемического процесса в республике, с целью выявления РНК ВГЕ и его генотипирования.

Высокие уровни серопревалентности анти-ВГЕ IgG в стадах свиней агропромышленного комплекса и на личных подворьях Беларуси свидетельствуют о широком распространении ВГЕ на территории республики и обуславливают значительную роль домашних свиней в распространении ВГЕ.

Наличие мощного резервуара ВГЕ-инфекции в виде поголовья домашних свиней, способствующего широкому распространению заболевания в популяции человека, диктует необходимость разработки дополнений к санитарным нормам и правилам «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов», утвержденных постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 февраля 2013 г. № 11, которые должны учитывать зооантропонозный характер гепатита Е.

Нормативные правовые акты, регламентирующие вопросы профилактики вирусных гепатитов, в части гепатита Е необходимо дополнить мероприятиями, направленными на информирование лиц, занятых в сельскохозяйственном производстве, о возможности заражения гепатитом Е и мерах по его профилактике, полном исключении ВГЕ из производства свинины, путем отбора и разведения ВГЕ-негативных животных и их вакцинации, о зоогигиеническом содержании свиней на свиноводческих предприятиях и частных подворьях.

Литература

1. Парадокс Балаяна / М.И. Михайлов [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – Т. 1, № 1. – С. 80-85.
2. Echevarría, J.-M. Light and darkness: prevalence of hepatitis E virus infection among the general population / J.-M. Echevarría // *Scientifica*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 481016.
3. Hepatitis E virus seroprevalence among men who have sex with men, United Kingdom / B.A. Payne [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 19, No. 2. – P. 333-335.
4. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route / M.S. Balayan [et al.] // *Intervirology*. – 1983. – Vol. 20, No. 1. – P. 23-31.
5. Krawczynski, K. Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection / K. Krawczynski, X.J. Meng, J. Rybczynska // *Virus Res.* – 2011. – Vol. 161, No. 1. – P. 78-83.
6. Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain / M. Fogeda [et al.] // *J. Med. Virol.* – 2009. – Vol. 81, No. 10. – P. 1743-1749.
7. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005 / D.B. Rein [et al.] // *Hepatology*. – 2012. – Vol. 55, No. 4. – P. 988-997.
8. Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA / A.R. Feagins [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2007. – Vol. 88, Pt. 3. – P. 912-917.
9. Pelosi, E. Hepatitis E: a complex and global disease / E. Pelosi, I. Clarke // *Emerg. Health Threats J.* – 2008. – Vol. 1. – e8.
10. Meng, X.J. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk / X.J. Meng // *Vet. Microbiol.* – 2010. – Vol. 140, No. 3. – P. 256-265.
11. Pavio, N. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks / N. Pavio, X.J. Meng, C. Renou // *Vet. Res.* – 2010. – Vol. 41, No. 6. – P. 46.
12. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food / Y. Yazaki [et al.] // *J. Gen. Virol.* – Vol. 84, No. 9. – P. 2351-2357.
13. Yugo, D.M. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission / D.M. Yugo, X.J. Meng // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2013. – Vol. 10, No. 10. – P. 4507-4533.
14. Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European Countries / P. Kokkinos [et al.] // *Food Environ. Virol.* – 2012. – Vol. 4, No. 4. – P. 179-191.

15. Hepatitis E virus seroprevalence among adults, Germany / M.S. Faber [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 18, No. 10. – P. 1654-1657.
16. Интенсивность эпидемического и эпизоотического процессов инфекции, вызванной вирусом гепатита E, на территории Республики Беларусь / С.В. Жаворонок [и др.] // *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 11-22.
17. Адаптированный метод полимеразной цепной реакции для выявления вируса гепатита E у человека и животных / А.А. Арабей [и др.] // *Военная медицина.* – 2018. – № 3. – С. 86-92.
18. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2018. – Vol. 35. – P. 1547-1549.

CHARACTERISTICS OF EPIDEMIC PROCESS OF HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BELARUS

¹Davydov V.V., ¹Zhavoronok S.V., ²Krasochko P. A., ³Borisovets D.S.,
¹Anis'ko L.A., ⁴Gasich E.L., ¹Marchuk S.I.

¹*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

²*Vitebsk Order "Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus*

³*S.N. Vyshel'skiy Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk, Republic of Belarus*

⁴*Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus*

The features of the hepatitis E virus (HEV) epidemic process in a non-endemic area have been studied. The frequency of anti-HEV IgG occurrence in the general population of Belarusians was 81/1114 – 7.3% (95 CI 5.8–9.0). In the group of patients with liver damage, this indicator was significantly higher and amounts to 187/1669 – 11.2% (95% CI 9.6–12.9). When examining the sera of 1457 foreign citizens temporarily residing in the Republic of Belarus, in 76 persons, which was 5.22% (95% CI 4.11–6.53), anti-HEV IgG was found. Anti-HEV IgG was detected in 380 (33.7±1.41 per 100 studies) out of 1126 studied blood serum samples from domestic pigs. All cases of hepatitis E detected in Belarus were caused by autochthonous genotype 3.

Keywords: hepatitis E virus, epidemic process, Belarus.

Поступила 29.10.2021

РЕЗУЛЬТАТЫ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА РАКА ШЕЙКИ МАТКИ В ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ

Логинова О.П., Шевченко Н.И., Веялкин И.В.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь

Резюме. В статье представлены результаты цитологического скрининга рака шейки матки и результаты молекулярно-генетического тестирования на вирусы папилломы человека высокого онкогенного риска в четырех районах Гомельской области, выполненного в рамках научного проекта. Отмечен рост в 2,2 раза заболеваемости раком шейки матки среди сельского населения за период 2001-2019 гг. у женщин репродуктивного возраста 25-39 лет. Выявлена высокая частота встречаемости предопухолевых заболеваний шейки матки у женщин молодого возраста.

Ключевые слова: рак шейки матки, заболеваемость, вирус папилломы человека, цервикальные интраэпителиальные неоплазии, Гомельская область, Беларусь.

Введение. Проблема рака шейки матки (РШМ) в течение многих десятилетий продолжает оставаться в центре внимания ведущих зарубежных и отечественных онкологов. Злокачественные опухоли шейки матки занимают лидирующую позицию среди злокачественных новообразований органов репродуктивной системы у женщин, уступая лишь раку молочной железы, несмотря на наличие гораздо более эффективного скрининга [1].

Значительные колебания уровней заболеваемости и смертности от рака шейки матки не только в разных странах, но и в разных регионах одной и той же страны и даже в различных районах края или области объясняются влиянием таких факторов, как социально-экономические условия жизни, уровень оказания акушерско-гинекологической помощи, онкологическая настороженность врачей общей лечебной сети, проведение скрининговых программ по РШМ, образовательным уровнем населения, национальными традициями, неодинаковой возрастной структурой населения, различиями учета больных [2].

Одним из этиологических факторов возникновения РШМ является вирус папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска. По мировой статистике 9-12% новых случаев рака у женщин связано с ВПЧ-инфекцией. Особую тревогу вызывают возрастающая частота запущенных стадий РШМ в возрасте моложе 29 лет и рост смертности среди 35-40-летних женщин [3].

Международная организация по исследованиям в области рака (англ. International Agency for Research on Cancer, IARC) декларировала, что предотвращение заражения и персистенции вируса папилломы человека однозначно можно считать профилактикой РШМ. Учитывая значительную связь между наличием ВПЧ и высоким риском развития цервикальных неоплазий, изучение этиопатогенетических аспектов, исследование эпидемиологии, профилактики, диагностики и лечения папилломавирусной инфекции является одним из приоритетных направлений современной медицинской науки [3].

На сегодняшний день и Республике Беларусь рак шейки матки занимает одну из лидирующих позиций в структуре женской онкологической заболеваемости и смертности, а также является важной социальной и медицинской проблемой, в связи с чем представляется актуальным проводить эпидемиологические и скрининговые исследования по данному вопросу.

Цель исследования: изучить эпидемиологию и оценить результаты скрининга рака шейки матки в Гомельской области по результатам совместного белорусско-итальянского проекта.

Материал и методы. Для получения эпидемиологических данных по заболеваемости раком шейки матки в Гомельской области использовалась информация Белорусского канцер-регистра за 2001-2019 гг. Были рассчитаны и проанализированы показатели заболеваемости (грубые интенсивные (CR) и по возрастные (AsR)) РШМ на 100 000 населения. Данные представлены в виде показателей и 95% доверительного интервала (95% ДИ). Для оценки динамики показателей использовался среднегодовой темп прироста (АРС), рассчитанный на основе экспоненциальной модели регрессии. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Объектом исследования явились 11 262 женщины 4 районов Гомельской области, пострадавших от аварии на Чернобыльской АЭС: Чечерского, Добрушского, Хойникского и Ветковского, которые были включены в программу скрининга рака шейки матки. Возраст женщин от 18 до 55 лет. У всех обследуемых женщин получено письменное информированное согласие на участие в исследовании. Материалом для исследования послужили соскобы из цервикального канала шейки матки. Перед получением материала слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки удаляли стерильным хлопковым тампоном. Взятие материала проводилось с помощью цервикальной цитощетки в виалу с транспортной средой для жидкостной цитологии. Цитологическое исследование проводилось с окраской по Папаниколау с использованием автоматического стейнера. Для приготовления тонкослойных препаратов использовали технологию BD SurePath и BD PrepStain, которая позволяет автоматизировать процесс пробоподготовки и стандартизировать окраску цитологического препарата по Папаниколау, получить препарат высокого качества. Результаты цитологического исследования трактовались согласно классификации Бетесда (атипичные клетки плоского эпителия неясного значения – ASC-US, интраэпителиальные изменения низкой степени – LSIL, интраэпителиальные изменения высокой степени – HSIL).

Детекция и генотипирование вируса папилломы человека выполняли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием наборов реагентов Abbott Real Time HPV(США) с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Эти наборы рекомендованы ВОЗ для проведения скрининговых исследований по выявлению вируса папилломы человека высокого онкогенного риска. Выделение ДНК осуществлялось в автоматическом режиме с использованием роботизированной системы пробоподготовки ms2000sp, амплификация и детекция проводилась в режиме реального времени с использованием амплификатора ms2000rt. В результате исследования определялись ВПЧ 16, 18 и других генотипов высокого онкогенного риска. Дальнейшее определение других генотипов ВПЧ проводилось с использованием набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL» (РФ).

Все исследования осуществлялись в рамках совместного белорусско-итальянского проекта «Разработать и внедрить алгоритм скрининговых мероприятий по раннему выявлению рака шейки матки» (Ротари клуб «Адда Лодиджано-Италия»). По инициативе итальянской стороны была изучена заболеваемость РШМ в Гомельской области с целью обоснования выбора четырех районов для проведения скрининга рака шейки матки и определения возраста для его начала.

Результаты и обсуждение. В структуре заболеваемости женщин Гомельской области злокачественные опухоли шейки матки в 2019 г. занимали 10 ранговое место и составляли 2,65%. В течение всего периода наблюдения 2001-2019 гг. было выявлено увеличение числа ежегодно заболевших РШМ на территории Гомельской области и лишь в 2018-19 гг. отмечено незначительное снижение заболеваемости РШМ. Так, число

ежегодно регистрируемых новых случаев заболевания в 2001 г. составило 131 случай, а в 2019 г. – 116 случаев. За период 2001-2019 гг. в Гомельской области зарегистрировано 2776 случаев РШМ.

Существенных изменений в темпах прироста (АРС) заболеваемости на территории Гомельской области не отмечалось, АРС=-0,9 (-1,88-0,06)%. При детальном рассмотрении темпов прироста за исследуемый период наблюдалось снижение АРС=-2,2 (-3,39-1,04)% за счет городских жителей и увеличение АРС=-2,3(0,53-4,03)% у сельских жителей Гомельской области.

На рисунке 1 приведена динамика грубых интенсивных показателей заболеваемости РШМ у жителей города и села Гомельской области. Так, показатель заболеваемости у жителей села вырос с $15,1 \pm 4,8\text{‰}$ в 2001 г. до $33,53 \pm 8,94\text{‰}$ в 2019 г. ($p < 0,05$). Вероятно, это связано с невысокой информированностью женщин и недостаточной доступностью медицинской помощи на селе. При этом у городских жителей наблюдалось снижение показателя заболеваемости с $16,46 \pm 3,34\text{‰}$ в 2001 г. до $10,51 \pm 2,62\text{‰}$ в 2019 г. ($p < 0,05$).

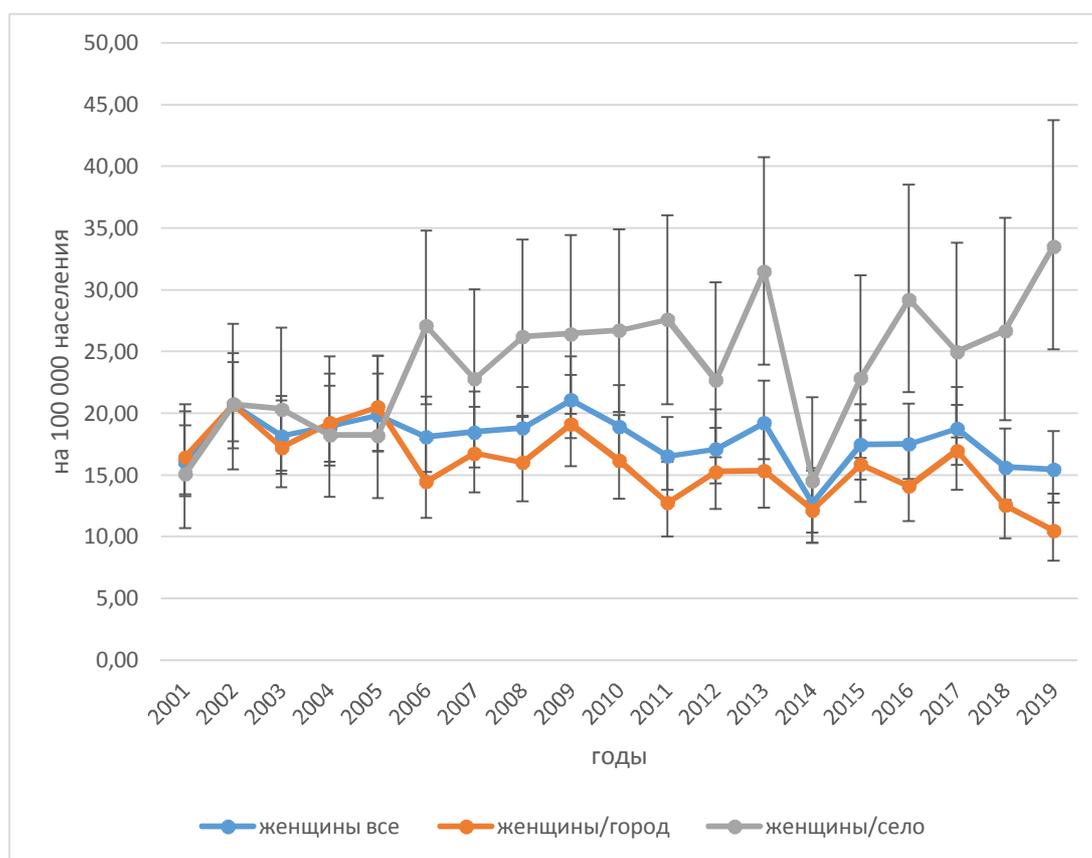


Рисунок 1. – Динамика грубого интенсивного показателя заболеваемости РШМ в Гомельской области за период 2001-2019 гг.

В Гомельской области в период 2010-2019 гг. заболеваемость злокачественными опухолями шейки матки не имеет тенденции к снижению, а, напротив, находится на стабильно высоком уровне, особенно в районах, пострадавших от аварии на ЧАЭС. Грубый интенсивный показатель заболеваемости РШМ по районам области находился в пределах от 10,1‰ в Светлогорском районе до 30,3‰ в Брагинском районе.

На рисунке 2 приведены результаты анализа заболеваемости в разрезе районов Гомельской области. Установлено, что наибольший показатель заболеваемости РШМ отмечен в Брагинском, Лоевском, Кормянском, Хойникском, Буда-Кошелевском и Лельчицком районах.

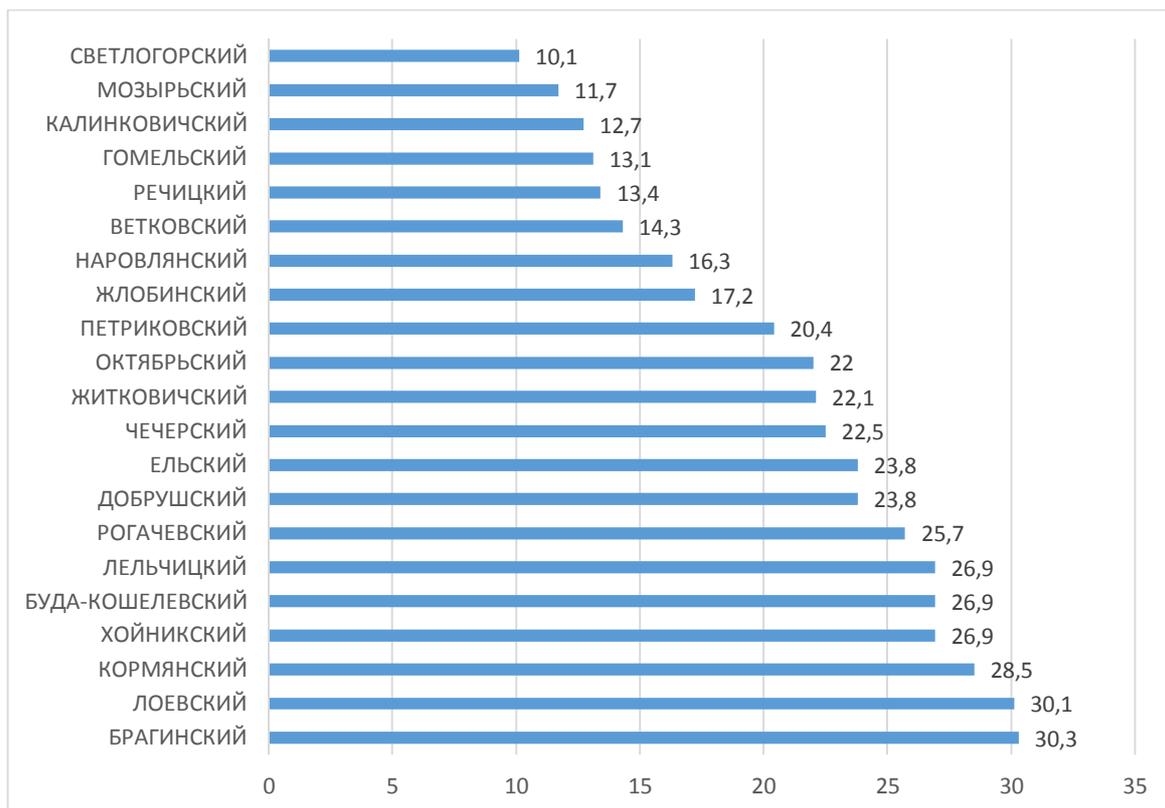


Рисунок 2. – Грубый интенсивный показатель заболеваемости РШМ по районам Гомельской области за 2010-2019 гг.

На рисунке 3 приведены повозрастные показатели заболеваемости РШМ в Гомельской области за период 2000-2019 гг. Рост заболеваемости отмечен в основном у молодых женщин детородного возраста, в том числе в возрастной группе моложе 30 лет. Как видно из рисунка, с 25-летнего возраста заболеваемость РШМ резко увеличивается, достигая максимума в возрастной группе 35-39 лет (30,4‰), т.е. повышается в группе женщин репродуктивного возраста. Учитывая, что одной из причин развития РШМ является вирус папилломы человека высокого онкогенного риска 16,18 типа и для развития рака шейки матки от момента инфицирования, по данным литературы, требуется 5-10 лет. Увеличение заболеваемости в данной возрастной группе свидетельствует о возможном инфицировании ВПЧ в 20-25 лет. Полученные данные позволяют установить возраст для начала скрининга РШМ, а также обуславливают более активное внедрение программ первичной профилактики.

По результатам изучения эпидемиологической ситуации цитологический скрининг выполнен в четырех районах Гомельской области. В результате проведения цитологических исследований методом жидкостной цитологии установлено, что в 95,9% случаев получены отрицательные результаты, т.е. патологических изменений в шейке матки не выявлено. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии различной степени (ASC-US, LSIL, HSIL) установлены у 459 женщин, что составило 4,1% (таблица). Частота выявленных патологических результатов цитологии в четырех исследуемых районах распределилась следующим образом: 4,46% в Хойникском районе, 4,24% в Ветковском, 3,53% в Добрушском, 4,82% в Чечерском районах.

Дисплазия высокой степени относится к предраковым состояниям и представляет наибольшую значимость. Такая патология детектирована в 94 образцах, что составило 20,5% от выявленной патологии. Из них наибольший удельный вес HSIL (44,5%) выявлен в возрастной группе 25-39 лет, что указывает на высокую частоту встречаемости

предопухолевых заболеваний шейки матки у женщин молодого возраста. Особое значение приобретает обнаружение HSIL в возрасте 18-24 года – 14,6% от всей выявленной патологии в этом возрасте. HSIL относится к облигатному предраку шейки матки, что требует проведения лечения и динамического наблюдения для этой категории пациентов.

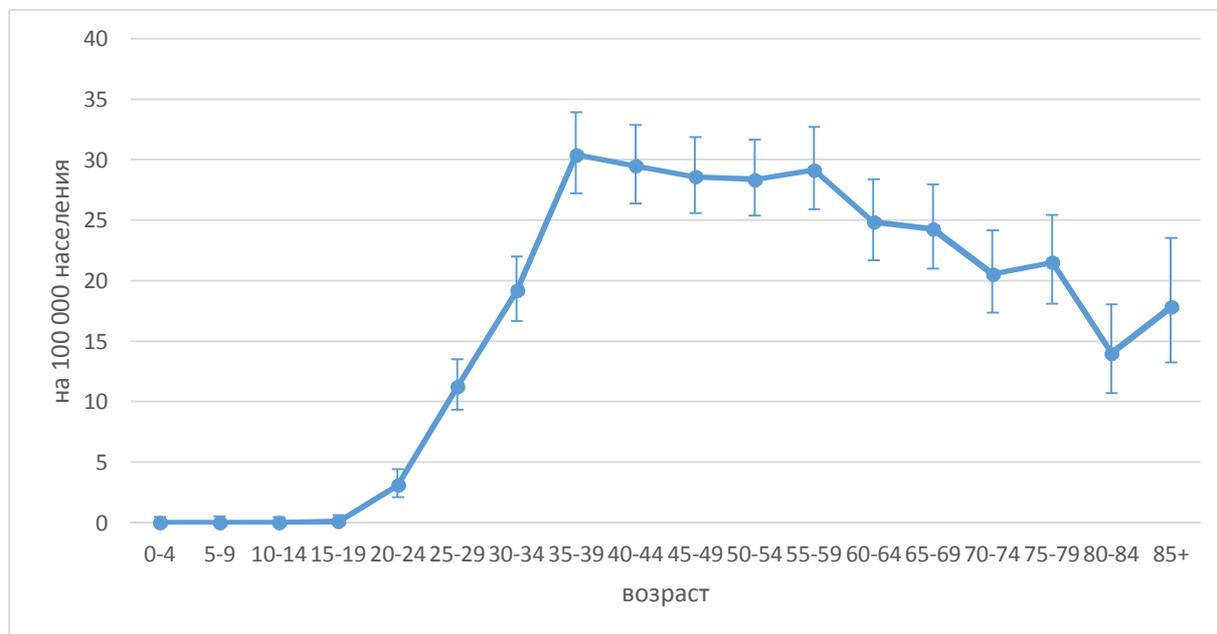


Рисунок 3. – Повозрастные показатели заболеваемости (AsR 95% ДИ) РШМ в Гомельской области за период 2000-2019 гг.

Таблица. – Распределение патологических результатов цитологического исследования в зависимости от возраста (n=459)

Степень поражения шейки матки (по Бетесда)	Возрастные группы				
	18-24	25-39	40-49	50-55	Всего
ASC-US	53	88	54	19	214
LSIL	35	75	30	11	151
HSIL	15	45	28	6	94
Всего	103	208	112	36	459

Проведено молекулярно-генетическое исследование 3749 образцов для изучения распространенности ВПЧ высокого онкогенного риска. В результате генотипирования получено 418 положительных образцов, что составило 11,1% от общего количества обследованных женщин. Эти результаты сопоставимы с общемировыми данными. По данным авторов в различных странах частота инфицированности ВПЧ находится в пределах 5-26% [3].

При изучении распространенности отдельных типов ВПЧ в изучаемой когорте женщин выявлено преобладание 16 типа. Так 16 тип обнаружен в 81 (19,3%) образце, 18 тип – в 17 (4,1%). Сочетание нескольких типов ВПЧ определено в 38 случаях, что составило 9,1%. Другие генотипы ВПЧ высокого онкогенного риска отмечено в 281 (67,1%) случаях. После дальнейшего генотипирования образцов с другими генотипами ВПЧ выявлены 52, 58, 31, 33, 59, 45, 56, 51 типы ВПЧ. Отмечено преобладание ВПЧ, относящихся к филогенетической группе А9 (52, 58, 31, 33 типы), выявленной в 43,6%. Удельный вес ВПЧ группы А7 (59, 45 типы) составил 23,1%, А6 (56 тип) – 17,9%, А5 (51 тип)

– 15,4%. По данным литературы, при персистенции ВПЧ 16-го типа риск развития цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки составляет 40-50%, при ВПЧ 26-го типа – 30-40%, ВПЧ 31-го, 58-го, 82-го типов по 20-30%, ВПЧ 18-го, 33-го, 35-го, 51-го, 52-го типов по 10-20%. Детальное генотипирование ВПЧ высокого онкогенного риска позволяет прогнозировать риск развития РШМ для каждой женщины индивидуально.

Заключение. Таким образом, анализ эпидемиологических данных в Гомельской области в период 2001-2019 гг. показал рост заболеваемости РШМ у женщин, проживающих в сельской местности. Пик заболеваемости РШМ приходится на женщин репродуктивного возраста (25-39 лет) и отмечается увеличение числа заболевших среди более молодых женщин в возрастной группе 18-24 года.

В результате скрининга выявлена высокая частота встречаемости предопухолевых заболеваний шейки матки у женщин молодого возраста. Инфицированность ВПЧ женщин в четырех районах составила 11,1% с преобладанием 16 типа (19,3%).

Своевременное выявление предопухолевых изменений шейки матки является важной задачей современного здравоохранения. Проведение цитологического скрининга и ВПЧ-тестирования позволяет формировать группы риска развития РШМ. Снижение показателей заболеваемости РШМ зависит от широкого внедрения методов цитологического и молекулярно-генетического тестирования, что приведет к своевременному выявлению ранних форм злокачественных цервикальных новообразований.

Литература

1. Скрининг рака шейки матки — нерешенные проблемы / А.Д. Каприн [и др.] // Исследования и практика в медицине. – 2015. – Т. 2, № 1. – С. 36-41.
2. Аксель, Е.М. Статистика злокачественных новообразований женских половых органов / Е.М. Аксель // Онкогинекология. – 2009. – № 1-2. – С. 76-80.
3. Папилломавирусная инфекция уrogenитального тракта: эпидемиологические аспекты (обзор) / О.С. Абрамовских [и др.] // Гинекология. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 34-39.

RESULTS OF CYTOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC SCREENING OF CERVICAL CANCER IN GOMEL REGION

Lohinava O.P., Shevchenko N.I., Veyalkin I.V.

Republican Scientific and Practical Center of Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Republic of Belarus

The article presents the results of cytological screening cervical cancer and molecular genetic testing for human papillomaviruses of high oncogenic risk in four districts in the Gomel region, carried out within the framework of a scientific project. There was an increase in the incidence of cervical cancer among the rural population (by 2.2 times) for the period from 2001 to 2019 in women of reproductive age from 25 to 39 years. A high incidence of precancerous diseases of the cervix uteri in young women was revealed.

Keywords: cervical cancer, morbidity, human papillomavirus, cervical intraepithelial neoplasia, Gomel district, Belarus.

Поступила 04.11.2021

ОПИСТОРХОЗ: АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ, ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ

¹Мамчиц Л.П., ²Кривостаненко Т.Д., ¹Гандыш Е.В., ¹Чайковская М.А.

¹Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь

²Государственное учреждение «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Гомель, Республика Беларусь

Резюме. Работа посвящена изучению заболеваемости описторхозом в Республике Беларусь. Тема исследования актуальна, в настоящее время экспертами Всемирной организации здравоохранения описторхисы отнесены к канцерогенам биологического происхождения. Детальная эпидемиологическая характеристика описторхоза дана на примере Гомельской области. Целью исследования является изучение вопросов своевременного выявления, диагностики описторхоза и обоснование адекватных эпидемиологической ситуации профилактических мероприятий. Среднемноголетний показатель заболеваемости описторхозом в Республике Беларусь составляет 2,8 на 100 тыс. населения. В структуре заболевших преобладают лица трудоспособного возраста от 18 до 63 лет, городские жители, чаще заболевание выявляется у женщин.

Ключевые слова: заболеваемость, описторхоз, эпидемиологическая характеристика, профилактика, Беларусь.

Введение. Описторхоз – биогельминтоз, в Европейском регионе возбудителем описторхоза является *Opisthorchis felinus* (двуустка кошачья). Это природно-очаговый зооантропоноз, преимущественно поражающий печень, желчевыводящую систему и поджелудочную железу, протекает с частыми обострениями, отличается длительным течением, способствует возникновению первичного рака печени и поджелудочной железы. При этом заболевании поражаются практически все другие органы и системы, что позволяет рассматривать описторхоз как общее заболевание организма [1].

Источником инфекции являются инвазированные описторхисами люди, а также домашние животные (кошки, свиньи) и дикие рыбаобразные млекопитающие. Заражение человека происходит при употреблении в пищу сырой, малосоленой и вяленой рыбы семейства карповых, содержащей жизнеспособных метацеркариев.

Крупнейшим в мире очагом описторхоза является территория Обь-Иртышского бассейна, где имеются природные предпосылки, обеспечивающие высокую зараженность рыбы. Это особенности ландшафта (Западно-Сибирская низменность) и гидрологического режима рек Оби и Иртыша (неравномерное таяние льдов от верховий к низовьям, длительный паводок, широкая пойма, долгое стояние воды вне русла, хороший прогрев), что создает оптимальные условия для размножения моллюсков рода *Bithynia* и рыб семейства карповых [1].

Несомненно, на частоту поражения населения этим гельминтозом также оказывают влияние кулинарные традиции приготовления рыбы и эффективность проводимых ветеринарно-санитарных мероприятий [2].

Это обусловлено сочетанием природных и социальных факторов: существованием многочисленных биотопов промежуточного хозяина паразита, развитием любительского рыболовства, употреблением в пищу недостаточно обеззараженной рыбы, рыбных отходов и сырой рыбы плотоядными животными. Следует отметить, что истинный уровень пораженности населения трематодозами печени определить сложно, поскольку ранняя стадия инвазии часто протекает без клинических проявлений, а в хронической стадии клиническая симптоматика неспецифична [3-5].

Механизм развития описторхоза включает в себя два аспекта: реакция иммунной системы человека на чужеродный агент, механическое и токсическое повреждение органов и тканей паразитом. Клиническая картина острого описторхоза складывается из токсико-аллергических проявлений. При хронических формах заболевания преобладают симптомы холангита, гепатита, панкреатита, гастрита, дуоденита, а также может развиваться рак печени, желчного пузыря и поджелудочной железы. Поэтому экспертами Всемирной организации здравоохранения описторхисы отнесены к канцерогенам биологического происхождения. Описторхоз нарушает нормальную работу практически всех органов и систем организма. Помимо заболеваний всего желудочно-кишечного тракта страдают сердечно-сосудистая, эндокринная и нервная системы. Все это обуславливает актуальность проблемы описторхоза для практического здравоохранения. Длительная описторхозная инвазия снижает эффективность антигельминтной терапии, ведет к появлению рецидивных форм заболевания. Международное агентство по исследованию рака официально признали *Opisthorchis viverrini* как биологический канцероген 1-й группы в 2009 г.

Канцерогенная роль *O. felinus* еще недостаточно изучена. Однако, жизненные циклы, морфология, локализация в организме человека *O. viverrini* и *O. felinus* схожи [6].

Описторхоз остается реальной клинической проблемой, не уступающей по своему значению инфекциям гепатитов В и С. Описторхоз весьма часто приводит к развитию выраженного фиброза и цирроза печени с вероятностью возникновения рака печени. Он нередко сочетается с вирусным гепатитом С, снижая эффективность противовирусного лечения. Расширение ареала возбудителя в связи с развитием туризма еще больше усугубляет проблему, что обуславливает необходимость активизации усилий по борьбе с описторхозом [7].

Редкие случаи заболевания, связанные с завозом заражённой *O. viverrini* рыбы, регистрируются в Европе и Северной Америке. Спорадические случаи заболевания описторхозом среди населения Республики Беларусь выявляются с 1958 г. С 2002 г. описторхоз введен в форму статистической отчетности. По уровню заболеваемости находится в группе редко распространенных инвазий.

Очаги описторхоза в Беларуси дифференцируют на антропоургические, природные и смешанные. Они, как правило, встречаются в юго-восточной части республики в населенных пунктах, расположенных в бассейнах рек Припяти, Днепра, Березины, Западной Двины. На этих же территориях выявляется наибольшая пораженность личинками описторхов моллюсков и рыб. Вспышки описторхоза регистрируются среди неиммунных людей, особенно лиц, работающих вахтовым методом (до 40%), приезжающих на эндемичные территории. Этим лицам принадлежит основная роль в завозе возбудителей инвазии на территорию республики (из Тюменской области, Ямало-Ненецкого и Ханты-Мансийского автономных округов, Республики Коми, Архангельской области, Казахстана, Украины) [8].

В последние годы участились случаи заболевания людей описторхозом в Жлобинском районе, в бассейне реки Днепр, протекающей по территории Украины и Беларуси, вторым по значимости природным очагом описторхоза.

Проблема описторхоза приобрела актуальность в настоящее время в связи с тем, что в Гомельской области разрешён промысловый лов речной рыбы арендаторам рыболовных угодий. В то же время остаётся нерешённым вопрос обеззараживания «условногодной», заражённой личинками описторхиса рыбы по причине отсутствия в области рыбоперерабатывающих предприятий.

Цель работы: изучение заболеваемости описторхозом в Республике Беларусь (детальная эпидемиологическая характеристика на примере Гомельской области), акцентирование внимания врачей на вопросы своевременного выявления, диагностики опи-

сторхоза и обоснование адекватных эпидемической ситуации профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Материалы и методы. Использованы данные официального учета заболеваемости описторхозом населения; данные лабораторных исследований микробиологической лаборатории Гомельского областного центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, данные информационно-аналитического бюллетеня Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья. Применены методы эпидемиологической диагностики — ретроспективный эпидемиологический анализ, описательно-оценочные методы. Распространенность описторхоза по отдельным территориям и в отдельных группах населения оценивалась по показателям заболеваемости, рассчитанным на 100 тыс. населения. Статистические методы применяли для оценки интенсивных и экстенсивных показателей, средних величин, установления достоверности результатов исследования и их отклонений.

Результаты исследования и обсуждение. Паразитарная патология населения Гомельской области, как и в целом Беларуси, представлена группой глистных инвазий (аскаридоз, гименолепидоз, дифиллоботриоз, описторхоз, тениаринхоз, тениоз, трихинеллез, трихоцефалез, токсокароз, фасциолез, церкариоз, энтеробиоз, эхинококкоз) и протозойными заболеваниями (криптоспоридиоз, лямблиоз, малярия, токсоплазмоз).

Суммарный годовой показатель заболеваемости паразитарными болезнями в Гомельской области по среднемуголетним данным за 2012-2021 гг. составил 272,7 на 100 тыс. населения. Распространение паразитарных болезней среди населения Гомельской области представлено в таблице 1.

Таблица 1. — Заболеваемость паразитарными болезнями в Гомельской области

Болезни	Кол-во заболевших в 2020 г.	Показатель заболеваемости на 100 тыс. населения	Среднеуголетний показатель заболеваемости на 100 тыс. населения	Среднереспубликанские показатели заболеваемости на 100 тыс. населения
Малярия	0	0	0,01	0,01
Аскаридоз	156	14,1	22,4	15,2
Трихоцефалез	8	2,3	2,3	0,9
Энтеробиоз	1343	135,4	140,5	126,3
Гименолепидоз	0	0	3,1	0,04
Описторхоз	38	2,6	2,8	0,5
Тениаринхоз	0	0	0,01	0,02
Дифиллоботриоз	1	0,07	0,03	0,05
Трихинеллез	0	0,3	0,1	0,2

Из числа биогельминтозов лидирует описторхоз. За период 2010-2020 гг. в Гомельской области зарегистрировано 442 случая заболеваемости описторхозом. Наибольшее количество случаев описторхоза зарегистрировано в Жлобинском районе в 2010 и в 2018 гг. — соответственно 47 и 43 случая, а наименьшее в 2014 г. — 22.

В 2020 г. зарегистрировано: 38 случаев описторхоза (Жлобинский район — 31, Речицкий район — 5, Рогачевский район — 2), в 2019 г. — 40 случаев, а за текущий период 2021 г. отмечен значительный рост — 72 случая.

Среднеуголетний показатель заболеваемости населения Гомельской области за анализируемый период составил 2,8 на 100 тыс. населения. Многолетняя эпидемическая тенденция заболеваемости описторхозом в Гомельской области является выраженной, темп прироста — 8,6% (рисунок).



Рисунок. – Многолетняя динамика заболеваемости описторхозом в Гомельской области за 2010-2020 гг.

Заболеваемость в Гомельской области характеризуется неравномерностью территориального распределения. Циркуляция возбудителя выявлена не во всех районах Гомельской области. Более высокий уровень заболеваемости отмечался в Рогачевском, Речицком, Светлогорском, Жлобинском районах по сравнению с остальными районами. Есть все основания полагать, что истинная заболеваемость значительно выше, и подавляющая часть заболеваний описторхозом, как среди городского, так и особенно среди сельского населения не выявляется, проходя под другими диагнозами (таблица 2).

Таблица 2. — Заболеваемость описторхозом в Гомельской области (абсолютные числа)

Год	Жлобинский район	Речицкий район	Рогачевский район	Светлогорский район	г. Гомель
2010	47	2			
2011	31				
2012	33				2
2013	25	5			2
2014	22	6	1		1
2015	37	2		10	
2016	42	6		5	
2017	41	1		1	2
2018	43	1		1	
2019	29	4	1		1
2020	31	5	2		
Всего	381	32	4	17	8

Полученные данные свидетельствуют о наличии на территории Гомельской области активного природного очага.

Основная часть случаев описторхоза за этот период приходится на г. Жлобин и Жлобинский район. Так, из зарегистрированных 442 случаев по Гомельской области, именно на этот регион приходится 86,2 % (381 случай). Заболеваемость описторхозом в Гомельской области остается высокой на протяжении ряда лет и превышает Республиканскую — в среднем в 6 раз. Среднегодовой показатель заболеваемости населе-

ния области за анализируемый период составил 2,38 на 100 тыс. населения. Заболеваемость по Республике находится на более низком уровне — от 0,32 до 0,41 на 100 тыс. населения.

В половозрастной структуре населения среди инвазированных преобладали женщины (70-75%), доля мужчин значительно ниже (25-30%). Основная часть заражённых выявлена методом копроовоскопии при прохождении периодического медосмотра или трудоустройства на работу (85%). Остальные случаи (15%) при обращении в медицинские учреждения и при обследовании в семейных очагах (Жлобинский, Речицкий районы). Это вероятнее всего и является причиной преобладания женского населения над мужским среди обследованного контингента.

Описторхоз зарегистрирован во всех возрастных группах. В структуре заболевших преобладают лица трудоспособного возраста от 18 до 63 лет (98%), однако регистрируются случаи заболеваний среди детского населения (8 случаев) при проведении профилактического обследования (репрезентативная выборка) в Жлобинском районе в 2016-2018 гг. Городское население (73%) преобладает над сельским (27%). Несмотря на проводимую разъяснительную работу среди населения о мерах личной и общественной профилактики биогельминтозов, по-прежнему не удается преодолеть привычки жителей неблагополучных по данным паразитозам территорий употреблять в пищу сырую, вяленую и соленую рыбу.

Паразитологические исследования включают обнаружение яиц описторхисов в кале (копроовоскопия) или дуоденальном содержимом обследуемого пациента. Основным способом диагностики описторхозной инвазии во всем мире (Россия, европейские страны, а также Таиланд, Лаос, Вьетнам, Китай) остается копроовоскопия – исследование под микроскопом образцов кала.

Для данных гельминтов характерна циклическая продукция яиц, поэтому отрицательный результат исследования кала не свидетельствует об отсутствии описторхоза. По разным оценкам, однократный анализ кала выявляет яйца описторхисов у 30-50% больных с высокой степенью инвазии. Поэтому для лиц с подозрением на описторхоз копроовоскопию рекомендуется проводить минимум трехкратно с интервалом 7-10 дней. Особые трудности представляет выявление яиц описторхисов в фекалиях больных с низкой степенью гельминтозной инвазии. Методы формалин-эфирного и уксусно-эфирного осаждения яиц гельминта из кала, применяемые с целью обогащения исследуемой пробы, решают эту проблему далеко не полностью. Следует также отметить, что результаты микроскопии весьма мелких яиц описторхисов (размеры: 0,010-0,019 × 0,023-0,034 мм) в значительной степени зависят от квалификации сотрудника, проводившего анализ. При исследовании дуоденального содержимого для обнаружения яиц описторхисов используют фракции желчи (В и С), полученные при зондировании больных из желчного пузыря и печеночных протоков соответственно (в области практически не проводят данный вид исследования).

Для обнаружения описторхов в организме также применяются иммунологические анализы: при остром описторхозе выявляются в крови специфические к паразиту IgM — антитела (белки, вырабатываемые иммунной системой в ответ на проникновение в организм чужака). Они обеспечивают первичный иммунный ответ. При переходе в хроническую стадию их уровень значительно падает, а далее они вообще исчезают.

При хроническом заболевании определяют специфические к описторхозу IgG. Это белки, которые обеспечивают длительный иммунный ответ, они вырабатываются клетками иммунной системы. К сожалению, методы иммунологической диагностики иногда дают как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. Поэтому спустя 1-1,5 месяца после обнаружения IgM проводится исследование дуоденально-

го содержимого и кала на выявление яиц описторхов. При выявлении IgG — одновременно.

Показано, что ПЦР обладает высокой специфичностью, чувствительностью и позволяют обнаружить генетический материал гельминта при низкой степени инвазии, а также в периоды заболевания, когда копроовоскопия и овоскопический анализ дуоденального содержимого обследуемых пациентов мало информативны. К сожалению, диагностика описторхоза методом ПЦР пока ещё не получила распространения в клинической практике на территории нашей страны, так как это требует соответствующего инструментального оснащения лабораторий, наличия в них персонала, обученного проводить данный анализ, и доступных коммерческих наборов реагентов, зарегистрированных в России [9].

Из дополнительных методов исследований в диагностике описторхоза используют рентгенологические методы (холецистохолангиография), ультразвуковое исследование, компьютерная томография и др.

Выводы. Наиболее значимыми направлениями профилактики являются:

1. Необходимо проводить мероприятия по ограждению внешней среды и восприимчивых организмов от инвазированных описторхисами людей и животных.

2. Для нераспространения инвазии среди населения необходима активная информационно-образовательная работа, которая включает следующие моменты – неупотребление населением рыбы местного улова, соблюдение культуры питания (не употреблять слабосоленую, недостаточно термически обработанную, сырую рыбу); пользование населением канализованными уборными, не скармливать речную рыбу животным.

3. С целью ограждения внешней среды от попадания паразита необходимо обезвреживать сточные и ливневые воды от яиц гельминтов, вынос и запрещение размещения неканализованных уборных с прибрежной зоны.

4. Случаи описторхоза, регистрирующиеся практически ежегодно на территории области, должны обязательно всесторонне рассматриваться и вызывать настороженность специалистов лечебной сети.

5. Профилактика и диагностика описторхоза требует объединения усилий не только паразитологов и врачей лабораторной диагностики, но и специалистов ряда клинических дисциплин.

6. Врачам клинических специальностей следует помнить об этой инвазии при проведении дифференциальной диагностики заболеваний, протекающих с синдромами лихорадки, желтухи, эозинофилии и др. Следует также уделить особое внимание санитарному просвещению населения как важнейшему элементу в комплексе мероприятий по профилактике и борьбе с описторхозом.

7. Исследование карповых рыб имеет исключительно важное значение для индикации очагов описторхозов и выявления в их составе наиболее значимых и продуктивных звеньев, участвующих в реализации жизненного цикла и заражении человека и домашних животных описторхидами [10].

Литература

1. Григорьева, И.Н. Клинико-эпидемиологическая характеристика описторхоза / И.Н. Григорьева // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2012. – № 4. – С. 39-42.

2. Думбадзе, О.С. Случай группового (семейного) заболевания описторхозом на Нижнем Дону / О.С. Думбадзе [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. – № 4. – С. 36-38.

3. Красавцев, Е.Л. Клинико-эпидемиологическая характеристика описторхоза в Гомельской области / Е.Л. Красавцев, В.М. Мицура // Проблемы здоровья и экологии. – 2014. – № 4. – С. 72-75.
4. Описторхоз. Эпидемиология / С.Т. Уразаева [и др.] // Медицинский журнал Западного Казахстана. – 2012. – № 3. – С. 251.
5. Candidate genes involving in tumorigenesis of cholangiocarcinoma induced by *Opisthorchis viverrini* infection / Z. Wu [et al.] // Parasitol. Res. – 2011. – Vol. 109, No. 3. – P. 657-673.
6. Бибик, О.И. Описторхоз – актуальная проблема здравоохранения (обзор и анализ проблемы) / О.И. Бибик // Российский паразитологический журн. – 2020. – Т. 14, № 4. – С. 38-49.
7. Диагностика, клиника и лечение описторхоза / В.В. Цуканов [и др.] // Гастроэнтерология. – 2019. – № 8. – С. 49-53.
8. Раевская, И.А. Эпидемиологическая характеристика и основы профилактики биогельминтозов: учеб.-метод. пособие / И.А. Раевская, Г.Н. Чистенко, Т.С. Гузовская. – Минск: БГМУ, 2014. – 64 с.
9. Трудности диагностики острого описторхоза / Н.С. Маркосьян [и др.] // Современные проблемы науки и образования [Электронный ресурс]. – 2021. – № 3. – Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=30905>. – Дата доступа: 20.10.2021.
10. Ромашова, Е.Н. Эколого-биологические особенности циркуляции описторхид в условиях Воронежской области / Е.Н. Ромашова, Б.В. Ромашов // Российский паразитологический журн. – 2015. – № 4. – С. 49-60.

OPISTORCHOSIS: CURRENT ISSUES OF EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSTICS AND PREVENTION

¹Mamchits L.P., ²Krivostanenko T.D., ¹Gandysh E.V., ¹Chaikovskaya M.A.

¹*Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus*

²*Gomel Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Gomel, Republic of Belarus*

The work was devoted to the study of opisthorchiasis morbidity in the Republic of Belarus. The topic of the study is relevant, since at present the experts of the World Health Organization classify opisthorchis as carcinogens of biological origin. A detailed epidemiological characteristic of opisthorchiasis was given on the example of the Gomel region. The aim of the study was to study the issues of timely detection and diagnosis of opisthorchiasis to justify preventive measures. The average long-term incidence rate of opisthorchiasis in the Republic of Belarus was 2.8 per 100 thousand population. More often the disease was registered among persons of working age from 18 to 63 years old, urban residents, and women.

Keywords: morbidity, opisthorchiasis, epidemiological characteristics, prevention, Belarus.

Поступила 21.10.2021

КОРЬ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2020-2021 гг.

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

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

Резюме. После вспышки кори в Европейском регионе в 2018-2019 гг. последующие два года (2020 и 2021 гг.) характеризуются снижением заболеваемости корью, что отразилось и на ситуации по этой инфекции в Республике Беларусь. Проведенное исследование биологического материала от 248 подозрительных на эту инфекцию пациентов в 2020 г. и 195 пациентов – в 2021 г. (10 месяцев) выявило 3 случая кори (все – в мае 2021 г.). Первая заболевшая – 12-месячная не привитая против кори девочка откуда из страны не выезжала, источник инфекции не был установлен. Ребенок послужил источником инфекции для двух медицинских работников. Результаты секвенирования и филогенетического анализа вируса кори, обнаруженного в носоглоточном мазке и моче заболевшей, показали, что он относится к генетической линии В3, Bradford. Вирус кори этой генетической линии в Республике Беларусь выявлен впервые, что свидетельствует о его завозном происхождении и дает основание классифицировать три случая 2021 г., как связанные с завозным вирусом кори.

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

Введение. Вакцинации против кори живой аттенуированной вакциной, начатая в мире с 60-х гг. XX века, привела к существенному снижению заболеваемости, что позволило поставить цель элиминации кори во всех шести регионах ВОЗ. Несмотря на ранее достигнутые успехи, в 2018-2019 гг. ситуация по кори во многих регионах ухудшилась. Так, в Европейском регионе эти годы ознаменовались существенным ростом заболеваемости корью, число выявленных в 2018 г. случаев составило 83 540, в 2019 г. – 104 248 [1, 2]. В 2020 г. число выявленных случаев кори в Европейском регионе существенно сократилось и составило 12 205 случаев, которые были зарегистрированы в 37 из 53 стран (71%) Европейского региона ВОЗ [3].

Эпидемическая ситуация по кори в Республике Беларусь отражала ситуацию в регионе в целом. Если до 2018 г. в Республике Беларусь регистрировались единичные завозные случаи кори, вызванные вирусами различных генотипов, то начиная с 2018 г. ситуация изменилась, и в 2018 и 2019 гг. были зарегистрированы 259 и 201 случай кори соответственно. По результатам генотипирования вирусов кори выявлено 4 генетических варианта вируса, принадлежащие к двум генотипам – В3 и D8. Установлено не менее 40 эпизодов завоза вируса на территорию Республики Беларусь, 17 из них получили распространение на территории республики, т.е. привели к возникновению цепочек передачи вируса в стране. Генотип вируса был установлен для каждой цепочки передачи); 12 цепочек передачи были короткими (2-8 заболевших); в 5 случаях выявлены достаточно длинные цепочки передачи (17-76 заболевших). В 2019 г. (циркуляция вируса продолжалась с января по август 2019 г.) установлено 58 эпизодов завоза вируса на территорию республики. 24 из них получили распространение, т.е. привели к возникновению 24 цепочек передачи вируса, из которых для 22 (91,7%) установлен генотип. Выполненное генотипирование 64 вирусов кори выявило 10 генетических вариантов вируса, принадлежащих к двум генотипам – В3 и D8. В пределах генотипа В3 выявлены 3 геноварианта двух генетических линий: В3, Dublin и В3, Marikina city; в пределах генотипа D8 – 5 геновариантов трех генетических линий: D8, Frankfurt, D8, Victoria и D8, Gir Somnath. Цепочки передачи вируса кори в большинстве случаев были короткими (2-7 случаев кори), в ряде случаев они включали 10 случаев кори и более.

Целью настоящей работы явился анализ эпидемической ситуации по кори в 2020-2021 (10 месяцев) гг.

Материалы и методы исследования. При проведении лабораторного обследования подозрительных на корь, краснуху лиц в соответствии с рекомендациями ВОЗ основным методом было выявление специфических IgM антител в ИФА [4]. В отдельных случаях (при сомнительном результате исследования IgM антител либо при наличии клинической картины инфекции и отрицательных результатах выявления IgM антител у ранее вакцинированного пациента) проводилось обнаружение РНК вируса в клиническом материале (носоглоточный мазок, моча) с использованием диагностической ОТ-ПЦР в реальном времени. Для установления происхождения вируса и расшифровки цепочек его передачи выполняли секвенирование фрагмента вирусного генома и последующее генотипирование.

Антитела класса IgM к вирусу кори определяли с использованием иммуноферментных тест-систем производства Euroimmune (Германия), Вектор-БЕСТ (Российская Федерация).

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

РНК вируса кори определяли методом диагностической одностадийной ОТ-ПЦР в режиме реального времени праймерами [5], для целей генотипирования выполняли амплификацию фрагмента N гена длиной 450 п.о. с помощью одностадийной ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов реакции [6].

Полученные фрагменты кДНК вируса кори 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 (Life Technologies, США) на капиллярном секвенаторе 3500 (Life Technologies, США).

Редактирование полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием лицензионного программного обеспечения SeqScape v.3.0 (Applied Biosystems, США). Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA версии 10 [7]. Эволюционные расстояния между последовательностями определяли на основании двухпараметрической модели эволюции Кимура. Достоверность топологий филограмм оценивали методом псевдореплик (анализировались 1000 псевдореплик).

Результаты исследования и обсуждение. В течение 2020 г. в Республике Беларусь на корь лабораторно обследовано 248 подозрительных на эту инфекцию пациентов. Случаев кори выявлено не было. В целом показатель исключенных случаев кори достиг рекомендованного ВОЗ (не менее 2 на 100 000 населения) и составил 2,6 на 100 000 населения, однако является существенно более низким в сравнении с предыдущими годами, когда он составлял 3,0-6,0 на 100 000 населения.

За 10 месяцев 2021 г. на корь обследовано 195 подозрительных на эту инфекцию пациентов. У трех пациентов выявлены IgM антитела к вирусу кори.

Все три случая кори были выявлены в мае 2021 г. после отсутствия регистрации случаев этой инфекции на протяжении 20 месяцев (с сентября 2019 г.). Первый выявленный случай – заболевшая девочка 12 месяцев, проживающая в Минском районе (пос. Боровляны), не привитая против кори. Заболевшая девочка послужила источником инфекции для двух медицинских работников Городской детской инфекционной клинической больницы г. Минска. У медицинских работников диагноз корь также был подтвержден лабораторно.

Девочка из Республики Беларусь в течение инкубационного периода заболевания за пределы страны не выезжала, источник инфекции остался не установлен. По-види-

тому, этот ребенок не являлся индексным случаем (первым в цепочке передачи), вероятнее всего индексный случай был пропущен системой эпидемиологического надзора. Доказать завозную природу вируса кори, задействованного в небольшой цепочке передачи, состоящей из трех случаев, помогли результаты секвенирования и филогенетического анализа вируса кори, выявленного в носоглотке и моче 12-месячной заболевшей.

Проведенное секвенирование участка N-гена вируса показало, что он относился к генотипу B3, генетической линии B3, Bradford и отличался от референс-штамма на 0,4% (2 нуклеотидные замены). Анализ базы данных нуклеотидных последовательностей вирусов кори MeaNS показал, что среди более чем 58 000 депонентов лишь 5 вирусов имели идентичную нуклеотидную последовательность. Три вируса были выявлены у заболевших в Омане в апреле 2020 г., два – в Пакистане в июне и в декабре 2020 г. (рисунок 1).

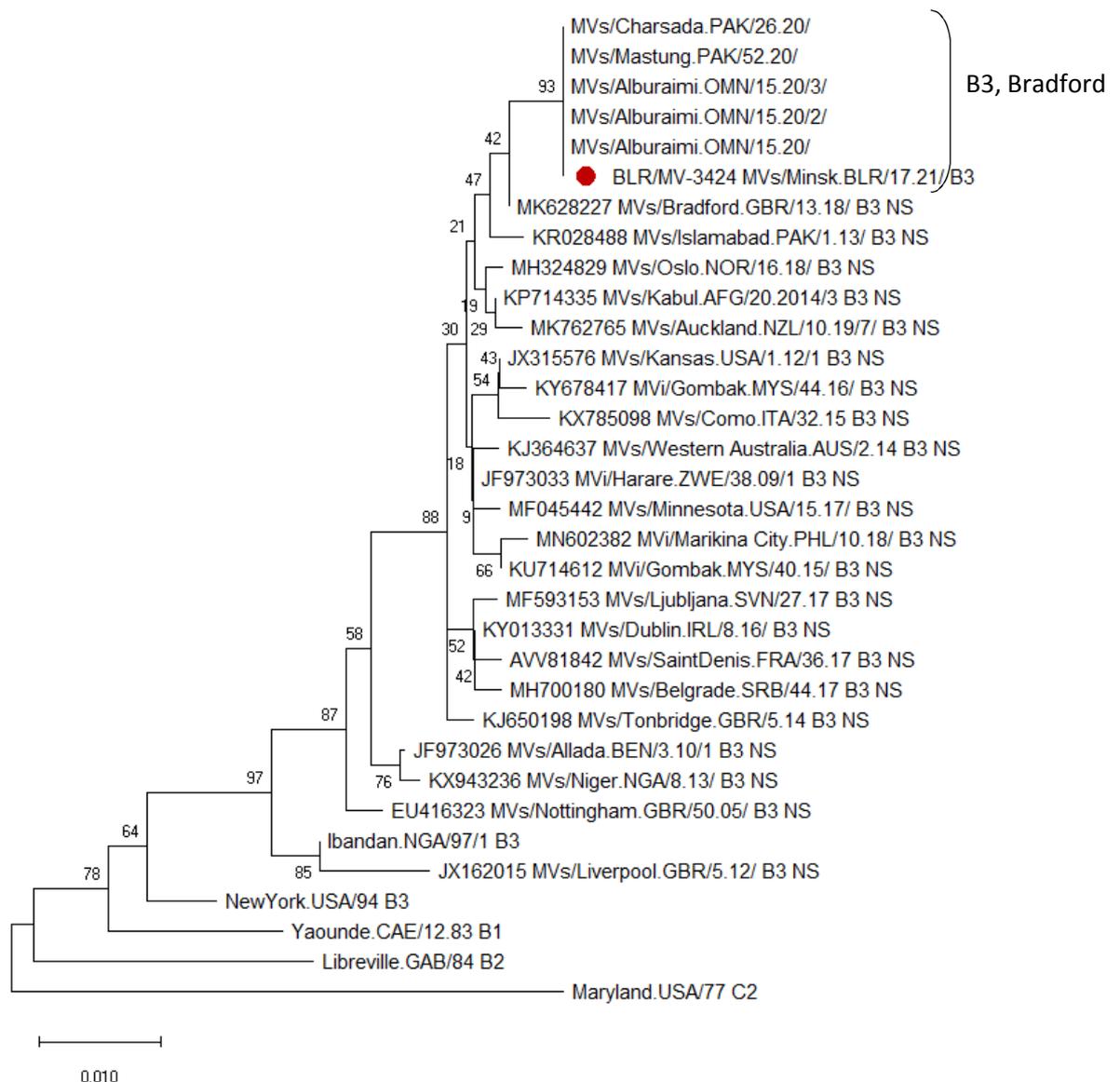


Рисунок 1. – Дендрограмма на основе анализа участка N гена вируса кори, выявленного в Беларуси (●) в 2021 г., референс-штаммов всех генетических линий генотипа B3 и вирусов из базы данных MeaNS. Построено с использованием алгоритма neighbor-joining, 2-параметрической модели Кимура, анализируя 1000 псевдореplik

Первоначально генотип В3 являлся эндемичным для Африки, однако в настоящее время он имеет глобальное распространение и наряду с генотипом D8 является доминирующим в мире. За последние 10 лет, получив широко циркулируя во всем мире, вирус изменялся и в настоящее время наряду с двумя референс-штаммами выделяют 22 генетические линии, отличающихся на 0,2-2,0% (1-9 замен). Вирус, давший название генетической линии В3, Bradford, впервые был выявлен в марте 2018 г. в Великобритании, где в последующие годы преимущественно и распространялся. В базе данных вирусов кори MeaNS представлены всего идентичных 168 депонентов (для сравнения для линии В3, Dublin – самая распространенная линия – около 3000 депонентов). Однако различные геноварианты линии В3, Bradford, отличающиеся на 1-2 замены, выявляются в Омане, Иране, Ираке, Афганистане, а также Великобритании, США, Канаде, Австралии.

Генотипирование вирусов кори в Республике Беларусь проводится с 2006 г., вирус генотипа В3 у заболевшего впервые был обнаружен в 2013 г. Всего за период 2013-2019 гг. выявлено 17 вирусов этого генотипа (в 2020 г. случаев не было), они относились к 4 генетическим линиям: В3, Harare; В3, Kansas; В3, Dublin и В3, Marikina City (таблица, рисунок 2). Вирус кори линии В3, Bradford в Республике Беларусь выявлен впервые, что свидетельствует о его завозном происхождении. Это дает основание классифицировать данные случаи кори, как связанные с завозным вирусом кори.

Таблица. – Информация по вирусам кори генотипа В3, обнаруженным в Республике Беларусь в 2013-2021 гг.

<i>Генетическая линия</i>	<i>Год выявления</i>	<i>Количество генотипированных вирусов</i>	<i>Случаи завоза</i>
В3, Harare	2013-2014	2	
В3, Kansas (геновариант)	2015	1	
В3, Dublin (и геноварианты)	2018-2019	13	завозной из Украины (1), из Азербайджана (3)
В3, Marikina City	2019	1	завозной из Филиппин
В3, Bradford (геновариант)	2021	1	

Таким образом, представленные данные свидетельствуют об успешном выполнении программы элиминации кори в Республике Беларусь и поддержании статуса элиминации на территории страны. Результаты молекулярно-эпидемиологического мониторинга циркуляции вируса кори подтверждают, что практически ежегодно вирусы кори различных генетических вариантов завозятся на территорию Республики Беларусь, но эндемичная передача этого вируса отсутствует.

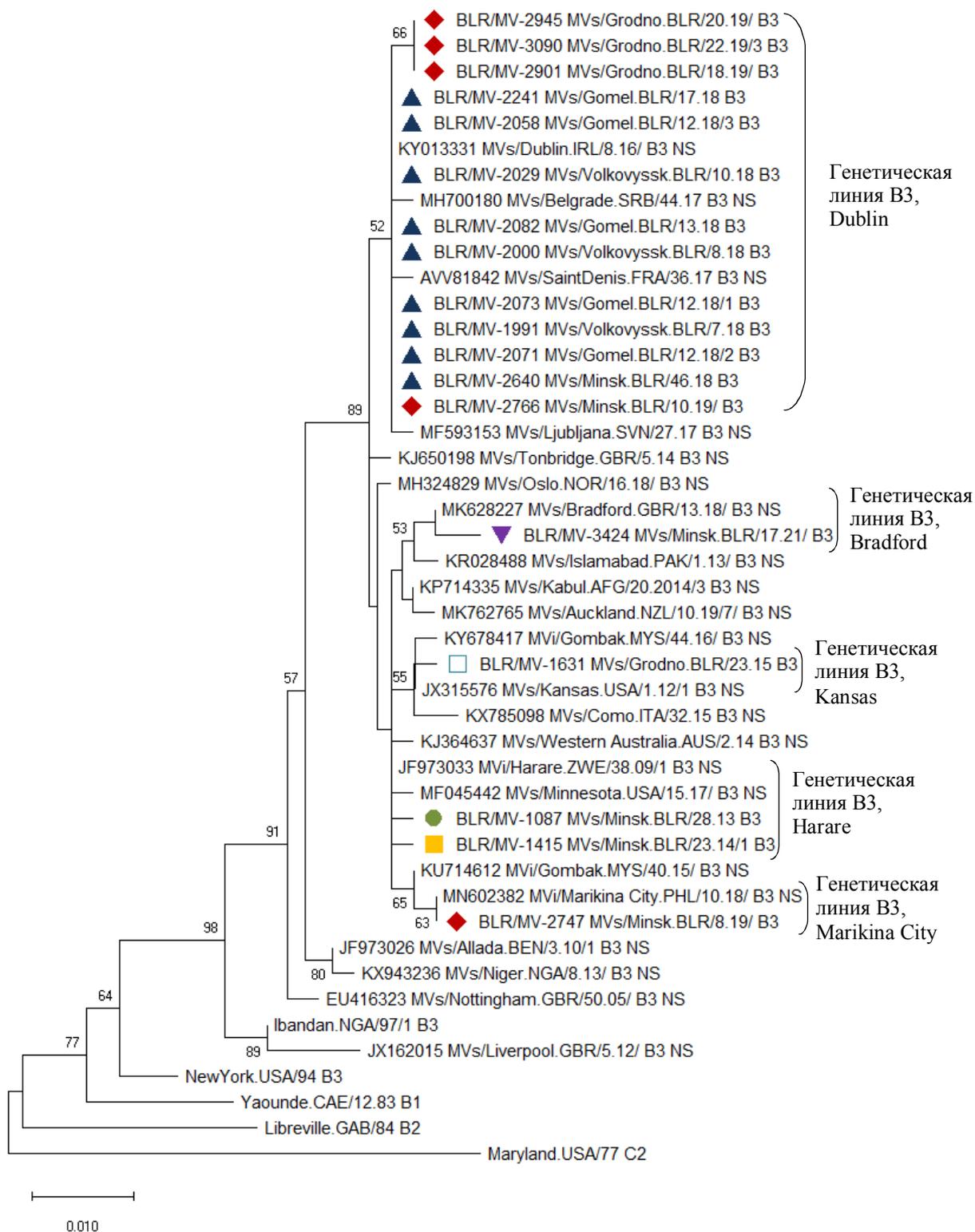


Рисунок 2. – Дендрограмма на основе анализа участка N гена вирусов кори, выявленных в Беларуси в 2013-2021 гг., и референс-штаммов всех генетических линий генотипа В3. Построено с использованием алгоритма neighbor-joining, 2-параметрической модели Кимура, анализируя 1000 псевдореplik

Літэратура

1. A report on the epidemiology of selected vaccine-preventable diseases in the European Region [Electronic resource] / WHO, Regional Office for Europe // WHO EpiBrief. – 2019. – No. 1. – 9 p. – Mode of access: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0013/400252/EpiBrief_1_2019_EN.pdf. – Date of access: 28.05.2021.
2. A report on the epidemiology of selected vaccine-preventable diseases in the European Region [Electronic resource] / WHO, Regional Office for Europe // WHO EpiBrief. – 2020. – No. 1. – 11 p. – Mode of access: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/431745/EpiBrief_1_2020_EN.pdf. – Date of access: 28.05.2021.
3. A report on the epidemiology of selected vaccine-preventable diseases in the European Region [Electronic resource] / WHO, Regional Office for Europe // WHO EpiBrief. – 2021. – No. 1. – 8 p. – Mode of access: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0010/463771/EpiBrief-No.-1-2021-eng.pdf. – Date of access: 28.05.2021.
4. World Health Organization. Manual for the laboratory-based surveillance of measles, rubella, and congenital rubella syndrome [Electronic resource]. – Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2018. – Mode of access: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/laboratory/manual/en/. – Date of access: 28.05.2021.
5. Development of quantitative gene-specific real-time RT-PCR assays for the detection of measles virus in clinical specimens / K.B. Hummel [et al.] // J. Virol. Methods. – 2006. – Vol. 132, No. 1-2. – P. 166-173.
6. Improving molecular tools for global surveillance of measles virus / B. Bankamp [et al.] // J. Clin. Virol. – 2013. – Vol. 58, No. 1. – P. 176-182.
7. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms / S. Kumar [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2018. – Vol. 35, No. 6. – P. 1547-1549.

ESTIMATION OF EFFICIENCY OF MULTIPLEX ONE-STEP REAL TIME RT-PCR ASSAY FOR ROTAVIRUS GENOTYPING

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

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

After the measles outbreak in the European Region in 2018-2019, the next two years (2020 and 2021) are characterized by a decrease in the incidence of measles, which also affected the situation with this infection in the Republic of Belarus. A study of biological material from 248 suspected patients for this infection in 2020 and 195 patients in 2021 (10 months) identified 3 cases of measles (all in May 2021). The first case was a 12-month-old girl who was not vaccinated against measles. The child did not leave the country during the incubation period and the source of the infection was not identified. She was the source of infection for two health workers. The results of sequencing and phylogenetic analysis of the measles virus revealed in the nasopharyngeal swab and urine showed that it belongs to the genetic lineage B3, Bradford. The measles virus of this genetic variant in the Republic of Belarus was detected for the first time, what indicates its imported origin and gives reason to classify the cases as associated with the imported measles virus.

Keywords: measles, measles virus, genotyping, Belarus.

Поступила 15.11.2021

СПЕКТР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СЕПСИСА У ДЕТЕЙ В ИНФЕКЦИОННОМ СТАЦИОНАРЕ

Сергиенко Е.Н.

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

Резюме. Руководствуясь этиологическим принципом определения разновидностей сепсиса, можно выделять бактериальный и грибковый, грамотрицательный и грамположительный сепсис. Существует определенная взаимосвязь между локализацией очага инфекции и характером микрофлоры, запускающей инфекционно-воспалительный процесс. В статье представлены результаты анализа этиологической структуры сепсиса у детей по многолетним данным детского инфекционного стационара. Первое место в этиологической структуре сепсиса занимает менингококковый сепсис. При этом частота заболеваемости и разнообразие этиологической структуры у детей первого года жизни выше, чем в других возрастных группах.

Ключевые слова: сепсис, этиология, возбудитель, дети.

Ведение. По данным литературы частота сепсиса в мире достигает несколько десятков миллионов случаев в год, а летальность – 6-8 миллионов человек в год. При этом уровень госпитальной летальности колеблется от 18% до 50%, а при развитии септического шока может достигать 80% [1, 2]. Сепсис может быть вызван бактериальными, грибковыми, вирусными и паразитарными патогенами. Бактериемия не является обязательной для диагностики сепсиса, и только 30-50% пациентов с септическим шоком имеют положительный результат посева [2]. В недавнем популяционном исследовании смертность у детей с подтвержденной бактериемией была близка к нулю при отсутствии органной дисфункции и увеличивалась до 17% при дисфункции какого-либо органа, подерживая различие «инфекции» и «сепсиса», определяемое как инфекция с наличием органной дисфункции [3].

Цель нашей работы – изучить этиологическую структуру сепсиса у детей по многолетним данным УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница» г. Минска.

Материалы и методы исследования. Проведен анализ 264 медицинских карт стационарных пациентов в возрасте от 1 месяца до 18 лет, которые находились на лечении в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница» г. Минска с 2009 по 2020 гг. По возрастному составу пациенты распределились следующим образом: до 1 года – 91 пациент (34,5%), 1-3 года – 100 детей (37,8%), 4-6 лет – 25 детей (9,5%) и старше 7 лет – 48 пациентов (18,2%). Всем детям, включенным в исследование, проведено исследование крови на стерильность. Забор крови осуществляли из интактных вен. Кроме того, согласно протоколу, при подозрении на менингококковую инфекцию проведено исследование крови, нозофарингеального мазка, ликвора и толстой капли крови на менингококк (по показаниям).

У 137 пациентов с сепсисом (52%) заболевание осложнилось развитием септического шока, а у 42 (15,9%) – имело неблагоприятный (летальный) исход. В 26,5% случаев тяжелое патологическое состояние развилось у детей с неблагоприятным фоном (первичный иммунодефицит, врожденный порок сердца, детский церебральный паралич, болезнь Гиршпрунга, множественные врожденные пороки развития, криптогенный цирроз, системная красная волчанка и т.д.), а среди пациентов с летальным исходом сепсиса наличие сопутствующей патологии отмечено у каждого второго ребенка (в 54% случаев).

Результаты исследования и обсуждение. Этиология сепсиса была установлена в 69,5% случаев. У 107 пациентов (40,5%), к сожалению, этиология сепсиса не подтверждена. В этиологической структуре сепсиса преобладали грамотрицательные бактерии (40,9%), грамположительные микроорганизмы составили 12,9%, грибы – 0,4% и смешанная флора – 5,3% (таблица 1).

Был установлен следующий спектр грамотрицательных возбудителей: *Neisseria meningitidis* – 77,8%; *Pseudomonas aeruginosa* – 3,7%; *Haemophilus influenzae* – 5,6%; *Acinetobacter baumannii* – 3,7%; *Klebsiella pneumoniae* – 5,6%; *Escherichia coli* – 1,8%; *Achromobacter xylosoxidans* и *Salmonella enteritidis* – по 0,9%. Среди грамположительных бактерий стрептококки составили 64,9%, стафилококки – 35,1%.

Таблица 1. – Результаты микробиологического исследования биологического материала пациентов с сепсисом (n=264)

Микроорганизмы	Количество пациентов / %	Микроорганизмы	Количество пациентов / %
Грамположительные бактерии, из них:	37/12,9	Грамотрицательные бактерии, из них:	108/40,9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	7	<i>Neisseria meningitidis</i>	84
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	14	<i>Haemophilus influenzae</i>	6
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	4
<i>Staphylococcus коагул.</i>	4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1
		<i>Escherichia coli</i>	2
		<i>Salmonella enteritidis</i>	1
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
Грибы рода <i>Candida</i>	1/0,4	Смешанная этиология	14/5,3
Возбудитель не установлен – 107/40,5			

Анализ этиологической структуры сепсиса с учетом возраста позволил выявить следующее (таблица 2):

- во всех возрастных группах доминировали грамотрицательные микроорганизмы, причем за счет *N. meningitidis*;
- практически каждый пятый случай верифицированного сепсиса в группах 1-3 года и 4-6 лет был обусловлен грамположительными бактериями;
- среди грамположительных возбудителей в группе детей до 1 года доминировал *Streptococcus agalactiae*, 1-3 года – *Streptococcus pneumoniae*;
- смешанная этиология патологического процесса установлена в группах детей до 1 года и старше 7 лет с частотой 7,7% и 12,5% соответственно;
- в 30-50% случаев установить этиологию септического процесса не удалось.

Анализ этиологической структуры бактериемий в случаях развития септического шока (n=137) показал, что грамотрицательные бактерии составили 37,2%, грамположительные – 9,5%, микст-инфицирование – 5,8% и, к сожалению, практически в половине (47,5%) всех случаев этиологию установить не удалось. Среди микроорганизмов доминировали *Neisseria meningitidis* (50,4%), *Streptococcus pneumoniae* (12,5%), *Klebsiella pneumoniae* (8,3%) и смешанная (бактериальная или грибково-бактериальная) флора (11,1%) (рисунок).

Таблица 2. – Результаты микробиологического исследования биологического материала пациентов с сепсисом (n=264) в разных возрастных группах

	до 1 года n/%	1-3 года n/%	4-6 лет n/%	старше 7 лет n/%
Грамположительные бактерии, из них:	13/14,3	17/17	5/20	2/4,2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	7	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	10	3	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	2	1	-
<i>Staphylococcus коагул.</i>	1	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus,</i> <i>в т.ч. MRSA</i>	4 -	4 1	- -	1 -
Грамотрицательные бактерии, из них:	43/47,3	42/42	7/28	16/33,3
<i>Neisseria meningitidis</i>	29	34	6	15
<i>Haemophilus influenza</i>	2	3	1	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	2	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2	-	-
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	2	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	1	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	4	1	-	1
Грибы рода <i>Candida</i>	-	-	1/4	-
Смешанная этиология (бактериальная, грибково-бактериальная)	7/7,7	1/1	-	6/12,5
Возбудитель не установлен	28/30,7	40/40	12/48	24/50
Всего	91/100	100/100	25/100	48

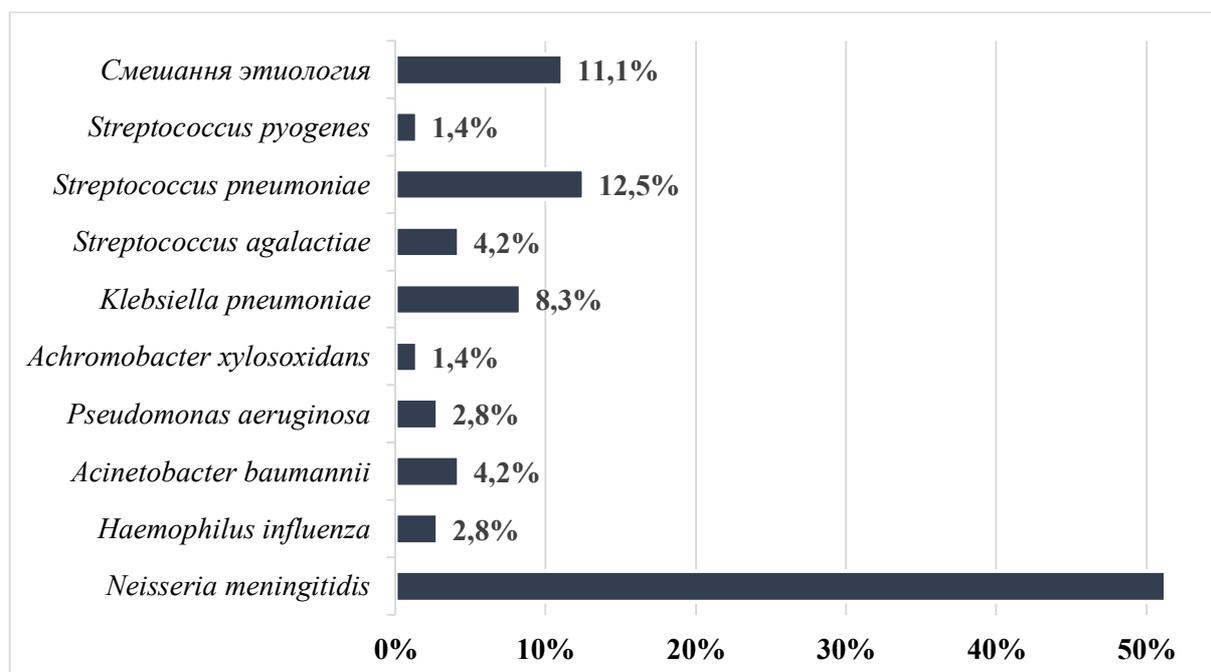


Рисунок. – Микробиологический пейзаж бактериемий пациентов с сепсисом и септическим шоком (n=137)

Вывод. Таким образом, на основании проведенного анализа можно заключить, что этиологическая структура сепсиса в детском возрасте разнообразна и имеет свои особенности в каждой возрастной группе. Первое место в этиологической структуре сепсиса занимает менингококковый сепсис. При этом частота заболеваемости и разнообразие этиологической структуры у детей первого года жизни выше, чем в других возрастных группах.

Литература

1. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) / M. Singer [et al.] // JAMA. – 2016. – Vol. 315, No. 8. – P. 801-810.
2. Randolph, A.G. Pediatric sepsis: Important considerations for diagnosing and managing severe infections in infants, children, and adolescents / A.G. Randolph, R.J. McCulloh // Virulence. – 2014. – Vol. 5, No. 1. – P. 179-189.
3. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012 / R.P. Dellinger [et al.] // Intensive Care Med. – 2013. – Vol. 39, No. 2. — P. 165-228.

THE SPECTRUM OF SEPSIS PATHOGENS IN CHILDREN IN INFECTIOUS HOSPITAL

Serhiyenka E.N.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Guided by the etiological principle of determining the varieties of sepsis, bacterial and fungal, gram-negative and gram-positive sepsis can be isolated. There is a certain relationship between the localization of the infection focus and the microflora nature that triggers the infectious and inflammatory process. The article presents the results of the analysis of the etiological structure of sepsis in children according to long-term data from a pediatric infectious diseases hospital. The first place in the etiological structure of sepsis is occupied by meningococcal sepsis. At the same time, the incidence rate and the diversity of the etiological structure in children of the first year of life is higher than in other age groups.

Keywords: sepsis, etiology, pathogen, children.

Поступила 21.10.2021

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ГРИППА С В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: РЕТРОСПЕКТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ В РАМКАХ ДОЗОРНОГО НАДЗОРА ЗА ГРИППОМ

Сивец Т.С., Сивец Н.В., Шмелева Н.П.

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

Резюме. В Республике Беларусь показана активная циркуляция вируса гриппа С. РНК вируса выявлена у 11,8% исследованных образцах от пациентов в возрасте от 0 до 65 лет. Самая восприимчивая возрастная категория от 1 до 18 лет. Наиболее часто генетический материал вируса выявлялся в назофарингиальных мазках, полученных от детей Брестской области (36,8%) и г. Минска (42,1%). Показана активная циркуляция вируса гриппа С в зимний и весенний период. Вирус гриппа С является причиной заболевания как верхних, так и нижних дыхательных путей с развитием пневмонии.

Ключевые слова: вирус гриппа С, лабораторная диагностика, полимеразная цепная реакция, Беларусь.

Введение. Вирусы гриппа представляют серьезную угрозу для здоровья человека и поэтому находятся в центре внимания национальных и международных органов здравоохранения. Несмотря на всестороннее и многолетнее изучение вируса гриппа актуальность проблемы сохраняется и в настоящее время. Этому способствует уникальная изменчивость возбудителя, что приводит к появлению новых вирусов и возникновению эпидемий и пандемий. Согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) вирус гриппа относится к семейству *Orthomyxoviridae*. Представители трёх родов вызывают заболевания у человека: *Alphainfluenzavirus* (вирус гриппа тип А), *Betainfluenzavirus* (вирус гриппа тип В) и *Gammmainfluenzavirus* (вирус гриппа тип С). Наиболее изученными являются вирусы гриппа типа А и типа В, менее изученными – вирусы гриппа типа С [1].

Впервые вирус гриппа С был выделен в 1947 г. в США у человека с заболеванием верхних дыхательных путей. Наиболее часто вирус гриппа С является причиной заболеваний верхних дыхательных путей у детей раннего возраста, а также у пожилых людей старше 65 лет. Однако в ряде исследований показано, что вирус гриппа С может вызывать поражения нижних дыхательных путей с развитием клинической картины бронхита или пневмонии [2-5]. В 2009 г. впервые описан случай острой энцефалопатии, связанной с гриппом С [6]. В последние годы появились сообщения о выявлении гриппа С у госпитализированных детей с тяжёлым течением заболевания.

Серологические исследования показали наличие антител у людей разных возрастных категорий, что позволяет предположить активную циркуляцию вируса среди населения [7]. Об этом также свидетельствуют и проведенные молекулярно-генетические исследования в ряде стран мира, где частота выявления вируса варьировала от 1,26% (Германия) до 10% (Япония). Инфицирование вирусом гриппа С чаще всего наблюдается в виде моно-инфекции [8, 9], однако известны случаи ко-инфекции с метапневмовирусом, риновирусом и коронавирусом [9].

Опубликованные исследования в основном посвящены клиническим проявлениям инфекции. Клинико-эпидемиологическое значение вируса гриппа С из-за отсутствия систематического эпидемиологического надзора за возбудителем не определено. Проведение более глубоких и детальных исследований позволит получить новые данные о вирусе.

Цель исследования – изучить частоту встречаемости вируса гриппа С в структуре острых респираторных инфекций в Республике Беларусь в рамках дозорного надзора за гриппом в сезон 2018-2019 гг.

Материалы и методы исследования. С целью выявления генетического материала вируса гриппа С за данный период проанализировано 203 образца. Материалом для исследования служили архивные назофарингеальных мазки, полученные в рамках дозорного надзора за гриппом в нашей стране. В ретроспективном исследовании использовали образцы сезона 2018-2019 гг. Мазки были собраны в транспортную среду производства «АмплиСенс» (Российская Федерация), доставлены с соблюдением холодовой цепи и хранились при температуре минус 20°C до проведения исследования.

Выделение РНК/ДНК проводили с использованием технологии выделения на спин-колонках набором реагентов «НуклеСорб» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Республика Беларусь), согласно инструкции производителя. Преимущества такого метода заключаются в повышенной чистоте и хорошем качестве выделенных нуклеиновых кислот.

Для постановки реакции обратной транскрипции использовали набор реагентов «РЕВЕРТАЗА-М-MuLV-50» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Республика Беларусь), согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили в течении 30 мин при температуре 37°C в твердотельном термостате TDB-120 (BioSan, Латвийская Республика), который предназначен для поддержания постоянной температуры образцов в пробирках, помещенных в гнезда алюминиевого блока.

Постановку ПЦР в режиме реального времени проводили на приборе Rotor Gene 6000 (Corbett research, Австралия) с использованием TaqMan технологии. Для исключения неспецифических реакций в каждом эксперименте присутствовал отрицательный контроль (вода для ПЦР) и положительный контроль для обнаружения наличия ингибиторов ПЦР реакции. Режим для проведения ПЦР состоял из следующих циклов: денатурация при 95°C – 5 мин, отжиг праймеров при 58°C – 20 с, элонгация при 72°C – 10 с, 10 циклов без детекции, далее 35 циклов с детекцией.

Выявление генетического материала гриппа С проводили с использованием разработанных праймеров следующей конструкции: F-CCAAATAATGGAAATGGTTGAAG, R-TCTTTCACSTTTTCTTGTGTTTTGCAT, P-ROX-GACGACTACACACCAGACATCC-BHQ1, подобранные к консервативному участку М гена (360-474 п.н.), в соотношении праймеров и зондов 0,3 мкМ/0,1 мкМ. Также использовали реакционную смесь следующего состава: буфер ПЦР буфер (100 мМ Трис-НСI (рН 8,8), 500 мМ КСI, 0,8% (v/v) Nonidet P40-1X, DNTPs – 2 мкМ, Таg ДНК-полимераза – 0,1 ед/мкл, Н₂О для ПЦР до конечного объёма 25 мкл. В качестве положительного контроля использовали плазмидную конструкцию на основе вектора рJET1.2/blunt, содержащего амплифицирующую последовательность.

Результаты исследования и обсуждение. В ходе исследования было проанализировано 203 назофарингеальных мазка от пациентов возрастной категории от 0 до 65 лет, госпитализированных в стационары страны. Генетический материал респираторных возбудителей выявлены в 159 образцах (78,3%). РНК вируса гриппа С – в 19 образцах (11,8%). Этиологическая структура респираторных возбудителей представлена на рисунке 1.

За анализируемый период в этиологической структуре ОРВИ отмечено преобладание негриппозных возбудителей. Среди негриппозных возбудителей в этиологии ОРВИ доминировал риновирус – 36 случаев (22,4%).

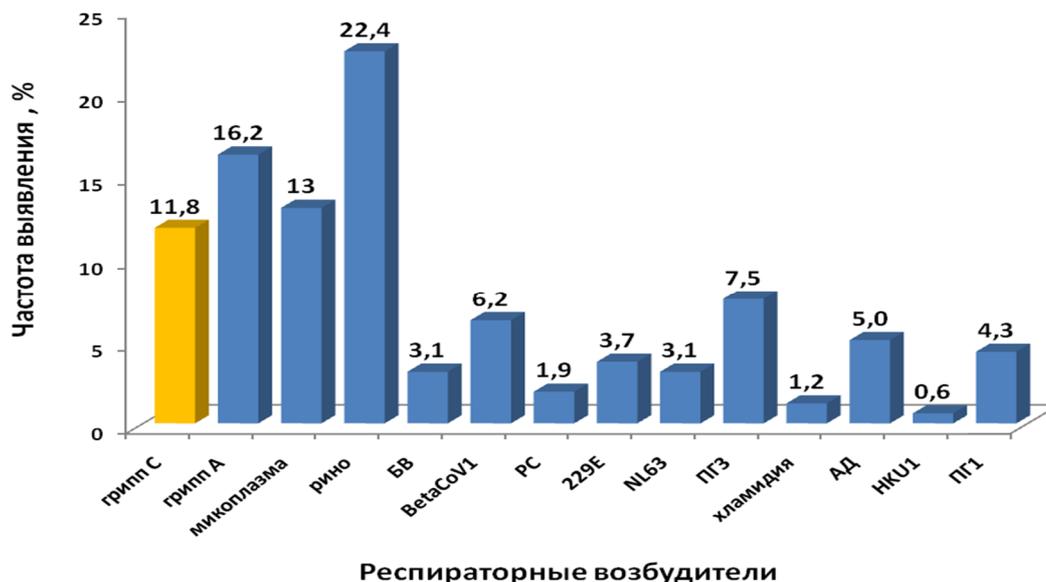


Рисунок 1. – Частота выявления респираторных вирусов в сезон 2018-2019 гг.

Проанализировав внутригодовую динамику заболеваемости гриппом С за данный период, была выявлена активная циркуляция вируса в зимний и весенний период, с пиком активности в апреле. В образцах, полученных в осенний и летний период РНК вируса гриппа С не выявлена. Внутригодовая динамика заболеваемости гриппом С представлена на рисунке 2.

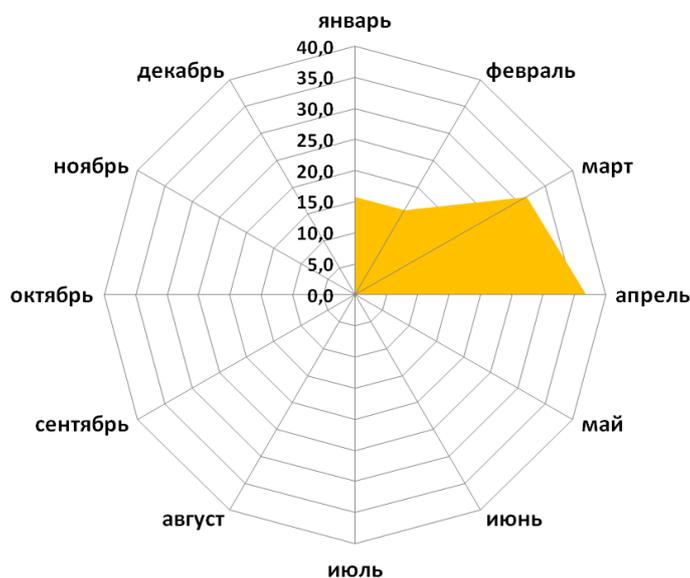


Рисунок 2. – Внутригодовая динамика заболеваемости гриппом С в период 2018-2019 гг.

За данный период исследований было установлено, что наибольшее число положительных находок, ассоциированных с гриппом С, регистрировалось в возрастной группе от 1 до 18 лет.

В рамках исследования показана активная циркуляция вируса гриппа С на территории Республики Беларусь, но частота выявления во всех административных районах значительно варьировала. Наиболее часто генетический материал вируса выявлялся в назофарингеальных мазках, полученных от детей Брестской области – 7 случаев (36,8%) и г. Минска – 8 случаев (42,1%). В Гродненской области было выявлено 2 случая (10,5%)

заражения вирусом гриппа С, в Гомельской и Могилевской областях по 1 случаю инфицирования (5,3%). В образцах из Минской области вируса гриппа С не выявлено.

Изучение нозологических форм заболеваний, ассоциированных с гриппом С, показало следующие закономерности. У 3 пациентов (15,8%) заболевание протекало в виде пневмонии, тяжелое течение острой респираторной инфекции наблюдалось у 6 (31,6%), легкое течение заболевания наблюдалось в 10 случаях, что составило 52,6%. Вирус гриппа С чаще встречался в виде моно-инфекции, но в трех случаях была отмечена ко-инфекция с риновирусом, бокапарвовирусом и вирусом парагриппа 3 типа.

Заключение. В ходе исследования вирус гриппа С был выявлен у 11,8% обследованных пациентов в возрастной категории от 1 до 18 лет. Среди положительных образцов у 84,2% вирус выявлен в виде моно-инфекции, а в 15,2% наблюдалась ко-инфекция. Анализ внутригодовой динамики заболеваемости гриппом С показал активную циркуляцию вируса в зимний и весенний период. Вирус гриппа С является причиной заболевания как верхних, так и нижних дыхательных путей с развитием пневмонии.

Полученные результаты свидетельствуют об участии вируса гриппа С в развитии острых респираторных заболеваний и требуют проведения регулярного мониторинга для получения более глубоких клинико-эпидемиологических данных.

Литература

1. World Health Organization (WHO). Influenza (seasonal) fact sheet, 6 November 2018 [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>. – Date of access: 20.11.2021.
2. Homma, M. Age distribution of the antibody to type C influenza virus / M. Homma, S. Ohyama, S. Katagiri // *Microbiol. Immunol.* – 1982. – Vol. 26, No. 7. – P. 639-642.
3. Prevalence of the antibody to influenza C virus in a northern Luzon Highland Village, Philippines / H. Nishimura [et al.] // *Microbiol. Immunol.* – 1987. – Vol. 31, No. 11. – P. 1137-1143.
4. Katagiri, S. An outbreak of type C influenza in a children's home / S. Katagiri, A. Ohizumi, M. Homma // *J. Infect. Dis.* – 1983. – Vol. 148, No. 1. – P. 51-56.
5. Community-acquired influenza C virus infection in children / H. Moriuchi [et al.] // *J. Pediatr.* – . – 1991. – Vol. 118, No. 2. – P. 235-238.
6. Acute encephalopathy associated with influenza C virus infection / M. Takayanagi [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2009. – Vol. 28, No. 6. – P. 554.
7. Wang, M. Hemagglutinin-esterase-fusion (HEF) protein of influenza C virus / M. Wang, V. Michael // *Protein Cell.* – 2016. – Vol. 7, No. 1. – P. 28-45.
8. Cocirculation of influenza C viruses with distinct internal genome constellations in Iwate Prefecture, Japan, in 2016 / M. Takahashi [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2018. – Vol. 71. – P. 393-395.
9. Influenza C virus and human metapneumovirus infections in hospitalized children with lower respiratory tract illness / Y. Shimizu [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2015. – Vol. 34, No. 11. – P. 1273-1275.

INFLUENZA C VIRUS CIRCULATION IN THE REPUBLIC OF BELARUS: RETROSPECTIVE INFLUENZA SURVEILLANCE STUDY

Sivets N.S., Sivets N.V., Shmialiova N.P.

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

For the period of 2018-2019 retrospective influenza surveillance study was performed for the purpose of influenza C virus circulation establishment on the territory of Belarus. The virus RNA was detected in 11.8% of the studied samples from patients aged 0 to 65 years. The most susceptible age group was from 1 to 18 years old. Most often, the viral genetic material was detected in nasopharyngeal smears obtained from children in Brest region (36.8%) and Minsk city (42.1%). Active influenza C virus circulation in winter and spring was shown. Influenza C virus causes illness of both the upper and lower respiratory tract with the development of pneumonia. In the view of the given data, influenza C virus monitoring should become a subject of concern for Belarusian public medical care services.

Keywords: influenza C virus, laboratory diagnostics, polymerase chain reaction, Belarus.

Поступила 27.10.2021

МИКРОБИОЛОГИЯ

Оригинальные исследования

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ

Голубович Е.Л., Шишпоренок Ю.А., Гудков В.Г.

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

Резюме. В период 01.02-30.09.2021 проведено микробиологическое исследование 3 890 образцов мочи от детей и взрослых обоего пола и разного возраста с симптомами инфекций мочевых путей. Из 2 987 (76,78%) образцов выделены 11 видов микроорганизмов. Наиболее часто выявлялись *Escherichia coli* (45,4%), *Enterococcus faecalis* (23,0%) и *Staphylococcus aureus* (15,7%). Изучение чувствительности/устойчивости выделенных штаммов к антимикробным препаратам установило, что энтерококки проявляли чувствительность к фурадонину, левофлоксацину, офлоксацину, амоксициллин/клавулановой кислоте и имипенему. Штаммы золотистого стафилококка были чувствительны к ципрофлоксацину, гентамицину и доксициклину. Основной уропатоген (*E. coli*) сохраняет чувствительность к цефалоспорином и фторхинолонам.

Ключевые слова: инфекции мочевых путей, этиология, чувствительность к антибиотикам.

Введение. Инфекции мочевых путей (ИМП) в амбулаторной практике являются одной из наиболее распространенных групп заболеваний бактериальной этиологии, занимая по этому показателю 2-е место после группы бактериальных инфекций дыхательных путей. Согласно статистическим данным у 50% женщин в мире хотя бы раз в жизни отмечается эпизод ИМП, при этом у 25-40% из них в течение 6-12 месяцев возникает рецидив заболевания.

Согласно позиции Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Европейского центра по профилактике и контролю заболеваний (European Centre for Disease Prevention and Control) проблема устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам, в том числе, антибиотикам, уже давно является не прогнозом на будущее, а представляет собой реальную серьезную опасность. По данным ВОЗ, около 50% антибиотиков используются не по назначению. Нередко для лечения используют препараты широкого спектра действия, когда заболевание можно вылечить антибиотиком узкого спектра. В результате у пациентов развивается лекарственная устойчивость. Нерациональное применение антибиотиков для лечения ИМП может способствовать формированию и распространению антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [1, 2].

Цель исследования – изучить этиологическую структуру ИМП у пациентов, обратившихся в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии для микробиологического исследования мочи, и чувствительность выделенных микроорганизмов к антибиотикам.

Материалы и методы исследования. За период 01.02-30.09.2021 было исследовано 3 890 образцов мочи, полученных от детей и взрослых обоего пола различного возраста с

острыми и обострением хронических ИМП. Микробиологическое исследование проводилось не позднее 2 ч от момента забора путем посева материала на чашки Петри с 5%-ным кровяным агаром, ЖСА, средой Эндо, агаром для культивирования энтерококков, средой Сабуро. Режим инкубации посевов выбирался в зависимости от определяемой микрофлоры: при 37°C в течение 24-48 ч для выявления бактериальной микрофлоры, при 30°C в течение 72 ч для выявления грибковой микрофлоры [3]. Идентификация выделенных культур микроорганизмов проводилась на основании результатов изучения культуральных, морфологических и биохимических свойств, в том числе, с помощью автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (BioMerieux).

Чувствительность к антибиотикам определялась диско-диффузионным методом. Интерпретация результатов осуществлялась в соответствии с рекомендациями EUCAST v10.0 [4]. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием стандартной статистической программы Microsoft Office Excel 2010.

Результаты исследования и обсуждение. Половая структура обследованных пациентов приводится в таблице 1.

Таблица 1. – Половая структура обследованных пациентов

Пол	Количество обследованных	
	Абсолютное число	%
Мужской	633	16,3±1,80%
Женский	3 257	83,7±1,80%
Всего	3 890	100,0

Из таблицы видно, что количество лиц женского пола, обратившихся для микробиологического исследования мочи (3 257 человек), в 5,14 раза превышает количество обратившихся мужчин (633 человека), а их доля среди обследованных лиц составила 83,7±1,80% и 16,3±1,80% соответственно ($p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют о существенно более высокой обращаемости женщин для амбулаторного обследования по поводу ИМП по сравнению с мужчинами.

Результаты посева исследуемых образцов мочи на питательные среды приведены в таблице 2.

Таблица 2. – Результаты посева исследуемых образцов мочи

Результат исследования	Количество образцов	Удельный вес %
Нет роста микроорганизмов	903	23,2±2,06%
Рост 1 вид микроорганизма	2266	58,3±2,40%
Рост 2 видов микроорганизмов	721	18,5±1,89%
Всего	3 890	100,0

Как видно из приведенных в таблице 2 данных микробиологическое исследование не выявило микроорганизмов в 903 (23,2±2,06%) из 3 890 исследованных образцов. Вместе с тем, 2 987 образцов мочи дали рост одного (2 226 образцов) или одновременно двух (721 образец) видов микроорганизмов. Таким образом, доля образцов, из которых выделены микроорганизмы (76,8±2,06%) существенно ($p < 0,05$) превышает удельный вес образцов, не давших роста. Это свидетельствует о значительной роли микробных агентов в этиологии ИМП.

Проведена идентификация выделенных микроорганизмов, их видовая структура представлена в таблице 3.

Таблица 3. – Видовая структура микроорганизмов, выделенных из мочи

Вид микроорганизмов	Количество выделенных микроорганизмов	
	Абсолютное число	Доля, %
<i>Escherichia coli</i>	1683	45,4±2,43%
<i>Enterococcus faecalis</i>	852	23,0±2,05%
<i>Staphylococcus aureus</i>	582	15,7±1,77%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	145	3,9±0,94%
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	115	3,1±0,84%
<i>Proteus mirabilis</i>	108	2,9±0,82%
<i>Candida albicans</i>	74	2,0±0,68%
<i>Enterobacter cloacae</i>	67	1,8±0,65%
<i>Proteus vulgaris</i>	56	1,5±0,59%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26	0,7±0,41%
Всего	3708	100,0

Из таблицы 3 следует, что в результате исследования было выделено 3 708 штаммов различных видов бактерий и грибов. Наиболее часто в исследованных образцах биоматериала обнаруживались микроорганизмы вида *Escherichia coli* (обнаружены в 45,4±2,43% образцов), *Enterococcus faecalis* (выявлены в 23,0±2,05% образцов) и *Staphylococcus aureus* (обнаружены в 15,7±1,77% образцов).

Среди минорных видов выявлены *Klebsiella pneumoniae* (3,9±0,94%), *Staphylococcus saprophyticus* (3,1±0,84%), *Proteus mirabilis* (2,9±0,82%), *Candida albicans* (2,0±0,68%), *Enterobacter cloacae* (1,8±0,65%), *Proteus vulgaris* (1,5±0,59%), *Pseudomonas aeruginosa* (0,7±0,41%).

Как отмечалось выше, ассоциации двух видов микроорганизмов были обнаружены в 721 пробе мочи, при этом чаще всего встречалась ассоциация *E. coli* и *En. faecalis* (79,0±1,99%), значительно реже (21,0±1,99%) наблюдались ассоциации стафилококков с различными видами энтеробактерий ($p < 0,05$).

Изучена чувствительность преобладающих по частоте выделения из исследованных образцов штаммов *E. coli*, *En. faecalis* и *St. aureus* к ряду антимикробных препаратов.

В таблице 4 представлены результаты определения чувствительности *E. coli* к антибиотикам.

Как видно из приведенных в таблице 4 данных подавляющее большинство исследованных штаммов *E. coli* оказались чувствительными (S) к офлоксацину (86,8±1,65%), триметоприм-сульфаметоксазолу (79,2±1,98%), цефтазидиму (74,3±2,13%) и цефтриаксону (60±2,39%).

Преобладающее большинство выделенных штаммов *E. coli* характеризовались высокими уровнями устойчивости (R) к амоксициллин-клавулановой кислоте (80,3±1,94%) и цефотаксиму (61,8±2,37%). Умеренную чувствительность (I) в отношении ципрофлоксацина, амикацина, фурадонина, гентамицина проявляли от 39,3 до 49,7% штаммов кишечной палочки.

В таблице 5 представлены результаты определения чувствительности к антибиотикам штаммов *E. faecalis*.

Таблица 4. – Чувствительность/устойчивость к антибиотикам штаммов *Escherichia coli*

Антибиотики	Удельный вес, %							
	Резистентный штамм (R)		Умеренно чувствительный штамм (I)		Чувствительный штамм (S)		Всего	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Цефотаксим	1040	61,8±2,37	163	9,7±1,44	480	28,5±2,20	1683	100,0
Цефтриаксон	528	31,4±2,26	145	8,6±1,37	1010	60±2,39	1683	100,0
Цефтазидим	374	22,2±2,03	59	3,5±0,90	1250	74,3±2,13	1683	100,0
Фурадонин	481	28,6±2,20	662	39,3±2,38	540	32,1±2,28	1683	100,0
Амикацин	492	29,2±2,22	705	41,9±2,41	486	28,9±2,21	1683	100,0
Гентамицин	365	21,7±2,01	837	49,7±2,44	481	28,6±2,20	1683	100,0
Триметоприм-сульфаметоксазол	334	19,8±1,94	15	0,9±0,46	1334	79,2±1,98	1683	100,0
Офлоксацин	212	12,6±1,62	10	0,6±0,38	1461	86,8±1,65	1683	100,0
Ципрофлоксацин	297	17,6±1,86	794	47,2±2,43	592	35,2±2,33	1683	100,0
Амоксициллин-клавулановая кислота	1351	80,3±1,94	192	11,4±1,55	140	8,3±1,34	1683	100,0

Таблица 5. – Чувствительность/устойчивость к антибиотикам штаммов *Enterococcus faecalis*

Антибиотики	Удельный вес, %							
	Резистентный штамм (R)		Умеренно чувствительный штамм (I)		Чувствительный штамм (S)		Всего	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Доксициклин	155	18,2±1,88	406	47,7±2,43	291	34,1±2,31	852	100,0
Фурадонин	66	7,7±1,30	137	16,1±1,79	649	76,2±2,08	852	100,0
Левифлоксацин	192	22,6±2,04	32	3,7±0,92	628	73,7±2,15	852	100,0
Офлоксацин	184	21,6±2,01	35	4,1±0,97	633	74,3±2,13	852	100,0
Ципрофлоксацин	190	22,3±2,03	421	49,4±2,44	241	28,3±2,20	852	100,0
Амоксициллин-клавулановая кислота	87	10,2±1,48	36	4,2±0,98	729	85,6±1,71	852	100,0
Имипенем	135	15,9±1,78	77	9±1,4	640	75,1±2,11	852	100,0

Из данных таблицы 5 видно, что большинство энтерококков (от 73,7 до 85,6% выделенных штаммов *E. faecalis*) проявляет чувствительность (S) к имипенему, левифлоксацину, фурадонину, амоксициллин/клавулановой кислоте, офлоксацину. Умеренная чувствительность (I) к ципрофлоксацину и доксициклину отмечена почти у половины (47,7±2,43-

49,4±2,44%) штаммов *E. faecalis*. Минимальный удельный вес резистентных (R) штаммов этого вида микроорганизмов (7,7±1,30%) обусловлен фурадоном, максимальный (21,6±2,01-22,6±2,04%) – антибиотиками из группы фторхинолонов ($p < 0,05$).

В таблице 6 представлены результаты определения чувствительности к антибиотикам *Staphylococcus aureus*.

Таблица 6. – Чувствительность/устойчивость к антибиотикам штаммов *Staphylococcus aureus*

Антибиотики	Удельный вес %							
	Резистентный штамм (R)		Умеренно чувствительный штамм (I)		Чувствительный штамм (S)		Всего	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Триметоприм-сульфаметоксазол	162	27,9±2,19	247	42,3±2,41	173	29,8±2,23	582	100,0
Доксициклин	51	8,8±1,38	24	4,2±0,98	507	87±1,64	582	100,0
Бензилпенициллин	582	100,0±0	0	0±0	0	0±0	582	100,0
Оксациллин	183	31,4±2,26	0	0±0	399	68,6±2,26	582	100,0
Левифлоксацин	527	90,6±1,42	10	1,7±0,63	45	7,7±1,30	582	100,0
Гентамицин	49	8,5±1,36	11	1,8±0,65	522	89,8±1,48	582	100,0
Эритромицин	430	73,9±2,14	28	4,8±1,04	124	21,3±2,00	582	100,0
Ципрофлоксацин	147	25,2±2,12	25	4,3±0,99	410	70,5±2,22	582	100,0
Амоксициллин-клавулановая кислота	392	67,3±2,29	0	0±0	190	32,7±2,29	582	100,0
Ванкомицин	162	27,8±2,18	222	38,2±2,37	198	34±2,31	582	100,0

Представленные в таблице 6 данные свидетельствуют, что все штаммы золотистого стафилококка оказались устойчивыми (R) к бензилпенициллину, а 527 из них (90,6±1,42) – к левифлоксацину. Помимо этого, большинство выделенных штаммов стафилококка (73,9±2,14% и 67,3±2,29%) продемонстрировали высокий уровень устойчивости (R) к эритромицину и амоксициллин-клавулановой кислоте соответственно.

Преобладающее большинство штаммов стафилококка проявляли чувствительность (S) к гентамицину (89,8±1,48%), доксициклину (87±1,64%) и ципрофлоксацину (70,5±2,22%). Умеренную чувствительность (I) к триметоприм-сульфаметоксазолу проявили 247 (42,3±2,41%) штаммов стафилококка, к ванкомицину – 222 (38,2±2,37%) исследованных штаммов.

Исследование также выявило 183 (31,4±2,26%) метициллинрезистентных штамма стафилококка (MRSA).

Заключение. Проведено микробиологическое исследование 3 890 образцов мочи от пациентов обоего пола различного возраста с симптомами инфекции мочевых путей. В 76,8±2,06% случаев из мочи были выделены микроорганизмы, как в монокультуре, так и в ассоциации, наиболее частой была ассоциация *Escherichia coli* и *Enterococcus faecalis* (79,0±1,99%). Энтерококки, стафилококки и дрожжеподобные грибы были выделены в 23,0±2,05%, 18,8±1,90% и 2,0±2,42% случаев соответственно. Энтеробактерии составили в общей сложности 55,5±2,42% от всех выделенных возбудителей, преобладающим видом была *Escherichia coli* (45,4±2,43%).

Определение чувствительности/устойчивости выделенных штаммов к антимикробным препаратам установило, что энтерококки проявляли чувствительность к фурадонину, левофлоксацину, офлоксацину, амоксициллин/клавулановой кислоте и имипенему (76,2±2,08%, 73,7±2,15%, 74,3±2,13%, 85,6±1,71%, и 75,1±2,11% штаммов соответственно). Штаммы золотистого стафилококка в 70,5±2,22% случаев были чувствительны к ципрофлоксацину, 89,8±1,48% – гентамицину и 87±1,64% – доксициклину. Основной уропатоген (*E. coli*) проявил чувствительность к цефалоспорином и фторхинолонам (74,3±2,13% и 86,8±1,65% штаммов соответственно).

Результаты исследования свидетельствуют, что для лечения ИМП следует учитывать данные микробиологического исследования мочи и определения чувствительности возбудителей к антибиотикам, а также данные, полученные в результате локального мониторинга выявления и чувствительности уропатогенов. Это позволит повысить эффективность лечения, ограничить нерациональное использование антибиотиков широкого спектра действия и будет способствовать снижению вероятности формирования антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.

Литература

1. В Европе вдвое возросло число случаев устойчивости к карбапенемам [Электронный ресурс]. – Официальный сайт газеты «Медицинский вестник», 2014. – Режим доступа: <http://medvestnik.by/ru/news/view/v-evrope-vdvoe-vozroslo-chislo-sluchaev-ustojchivosti-k-karbanenam-3462-2014/>. – Дата доступа: 20.10.2021.
2. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [Electronic resource] / World Health Organization, 2014. – 232 p. – Mode of access: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>. – Date of access: 20.10.2021.
3. Микробиологические методы исследования биологического материала: инструкция по применению / Н.Д. Коломиец [и др.]. – Минск: БелМАПО, 2010. – 124 с.
4. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST 2020 [Electronic resource]. – Mode of access: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables. – Дата доступа: 20.10.2021.

ETIOLOGY OF BACTERIAL URINARY TRACT INFECTIONS AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF THE MAIN PATHOGENS

Golubovich E.L., Shyshporonok J.A., Gudkov V.G.

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

In the period from 01.02.2021 to 30.09.2021, a microbiological study of 3,890 urine samples from children and adults of both sexes and different ages with symptoms of urinary tract infections (UTI) was carried out. Of the 2,987 (76.78%) samples, 11 species of microorganisms were isolated. The most frequently detected *Escherichia coli* (45.4%), *Enterococcus faecalis* (23.0%), and *Staphylococcus aureus* (15.7%). The study of the sensitivity / resistance of the isolated strains to antimicrobial drugs established that enterococci showed sensitivity (S) to furadonin, levofloxacin, ofloxacin, amoxicillin / clavulanic acid and imipenem. *Staphylococcus aureus* strains were susceptible (S) to ciprofloxacin, gentamicin, and doxycycline. The main uropathogen (*E. coli*) retains sensitivity (S) to cephalosporins and fluoroquinolones.

Keywords: urinary tract infections, etiology, sensitivity to antibiotics.

Поступила 22.11.2021

ДЕТЕКЦИЯ МИКОПЛАЗМЕННОЙ КОНТАМИНАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ПРОБОПОДГОТОВКИ

Григорьева Е.Е., Фомина Е.Г., Корень С.В., Зверко В.В.

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

Резюме. Определены оптимальные условия пробоподготовки исследуемого материала для эффективной детекции микоплазменной контаминации в клеточных культурах методом полимеразной цепной реакции. Показано, что для достижения высокой чувствительности анализа целесообразно проводить концентрирование образцов и предварительное выделение ДНК из культуральной жидкости и клеточной суспензии.

Ключевые слова: культура клеток, микоплазменная контаминация, полимеразная цепная реакция.

Введение. Микоплазмы являются наиболее часто встречающимися контаминантами клеточных культур. Согласно литературным данным микоплазменная инфекция поражает порядка 5% первичных и 15-35% перевиваемых культур клеток [1, 2].

Микоплазмы (класс *Mollicutes*) представляют собой группу мелких микроорганизмов, лишенных клеточной стенки, обладающих малым геномом, характеризующихся ограниченными синтетическими возможностями и низкой скоростью роста. Небольшие размеры, способность проходить через фильтры, используемые для стерилизации питательных сред, а также устойчивость ко многим антибиотикам затрудняют своевременное выявление и устранение контаминации [3, 4]. Присутствие микоплазм в клеточных культурах может приводить к изменению широкого спектра свойств культивируемых клеток: угнетению роста, снижению пролиферативной активности, ухудшению адгезивной способности, замедлению формирования монослоя, нарушению функционирования мембранных рецепторов, изменению экспрессии генов и продукции цитокинов [4, 5].

Несмотря на высокую специфичность в отношении природных хозяев, микоплазмы являются неспецифичными в отношении вида клеток, инфицируемых *in vitro*. Источником контаминации микоплазмами, как правило, служат компоненты питательных сред животного происхождения, а также внутрилабораторная передача инфекции из окружающей среды. Микоплазмы способны длительное время персистировать в клетках эукариот без признаков клеточной патологии. В латентной форме микоплазменная инфекция без специального анализа может оставаться незаметной. При этом изменение параметров роста культуры и биологических свойств зараженных культур клеток может существенно снижать качество экспериментальной работы, приводить к получению невоспроизводимых или ложных результатов, а также к их ошибочной интерпретации [1–5]. В связи с этим возникает необходимость осуществления постоянного контроля за возможной контаминацией.

Разработано и описано в литературе большое количество методов выявления микоплазм в образцах клеточных культур: микробиологическое культивирование, окрашивание индикаторной культуры ДНК-связывающими флуорохромами, электронная микроскопия, иммунофлуоресценция, иммуноферментный анализ, биохимические тесты, гибридизационный анализ и ряд других [1, 3, 4].

Применяемые в настоящее время в рамках системы контроля качества коллекционного фонда коллекции культур клеток человека и животных РНПЦ эпидемиологии и микробиологии метод прямого посева на питательные среды, а также окрашивание препаратов с помощью флуоресцентного красителя Hoechst 33258, продолжают оста-

ваться "золотым стандартом" для обнаружения микоплазменной контаминации [6, 7], однако они не лишены недостатков и ограничений. Микробиологический метод при использовании правильно приготовленных сред характеризуется высокой чувствительностью, но проведение данного теста требует длительного времени (до 28 суток) и дорогостоящих компонентов. Следует также иметь в виду, что многие виды микоплазм плохо растут на бесклеточных средах или вообще не могут быть выращены *in vitro* [3, 4]. Цитохимический подход относительно прост в применении и позволяет детектировать в клеточных культурах некультивируемые или плохо растущие на бесклеточных средах микоплазмы. Однако его довольно сложно стандартизировать, результат окрашивания интерпретируется субъективно, при этом некоторые особенности состояния клеточной культуры могут быть причиной ошибочных заключений относительно контаминированности микоплазмами [4].

Высокоэффективным и перспективным способом детекции микоплазменной контаминации в настоящее время считается полимеразная цепная реакция (ПЦР) [2, 6, 8-10]. Метод ПЦР в виду небольшой продолжительности исследования, воспроизводимости и объективного учета результатов наилучшим образом подходит для быстрой рутинной проверки образцов на наличие микоплазм. Он также позволяет избежать работы с живыми микоплазмами, что существенно снижает риск распространения контаминации в лаборатории.

Международными нормативными документами [7] регламентирована возможность использования технологий, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, в рамках проведения контроля за отсутствием микоплазменной контаминации клеточных культур. При этом обязательным условием является должным образом проведенная валидация метода на всех его этапах и выполнение фармакопейных требований, предъявляемых к чувствительности метода.

Цель данного исследования – установить оптимальные условия пробоподготовки для эффективной детекции микоплазм в клеточных культурах методом полимеразной цепной реакции.

Материалы и методы исследования. В качестве модельных образцов в работе использовали две закладки клеточной линии BGM – "зараженную" и "чистую", в которых микробиологическим методом было установлено наличие или подтверждено отсутствие микоплазменной контаминации, соответственно. Перед проведением исследования клетки в течение двух недель выращивали в среде ДМЕМ, содержащей 2мМ L-глутамин, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, без добавления антибиотиков при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Для исследования использовали 1 мл культуральной жидкости или клеточной суспензии (10⁵ клеток/мл). При концентрировании образцов культуральной жидкости клетки и клеточный дебрис осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 2000 об./мин. Надосадочную жидкость переносили в новые пробирки и центрифугировали при 13000 об./мин в течение 10 мин. Супернатант аккуратно удаляли, оставляя на дне 10-20 мкл жидкости. Добавляли 50 мкл фосфатно-солевого буфера, тщательно ресуспендировали и прогревали при +95°C в течение 10 мин.

Осаждение клеток из клеточной суспензии производили путем центрифугирования 1 мл исследуемого материала в течение 5 мин при 2000 об./мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в 200 мкл ТЕ-буфера.

Для выделения ДНК из культуральной жидкости и суспензии клеток применяли набор реагентов «GeneJET Genomic DNA Purification Kit» (Thermo Scientific, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

ПЦР-анализ исследуемых проб на присутствие микоплазм проводили с использованием набора реактивов для выявления контаминации микоплазмой культур клеток методом ПЦР «MycReport» (Евроген, Российская Федерация) в соответствии с ин-

струкцией производителя. Компонент набора MP содержит смесь специфических праймеров для амплификации участка ДНК, кодирующего рибосомальную 16S РНК бактерий рода *Mycoplasma*. Компонент набора MS содержит ДНК-матрицу внутреннего контроля и смесь специфичных к ней праймеров. Амплификацию осуществляли на приборе Quant Studio 5 (Applied Biosystems, США).

Анализ продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле. В качестве электродного буфера использовали однократный TBE-буфер. Для визуализации анализируемой ДНК гель окрашивали раствором бромистого этидия с последующим просмотром в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

Результаты исследования и обсуждение. Использование полимеразной цепной реакции для выявления контаминации культур клеток микоплазмами имеет ряд преимуществ: быстрота выполнения анализа (до 6 часов), воспроизводимость, высокая специфичность. При этом чувствительность обнаружения микоплазм при ПЦР-исследовании во многом зависит от типа исследуемого образца и способа его пробоподготовки.

Согласно литературным данным материалом для анализа может служить непосредственно культуральная жидкость (супернатант), а также пробы ДНК, выделенные из клеток и супернатантов клеточных культур [3, 4, 8, 10]. Показано также, что предварительное концентрирование исходного образца путем центрифугирования или ультрафильтрации является действенным подходом для повышения чувствительности реакции [6, 9].

Для сравнения эффективности детекции микоплазм методом ПЦР при использовании материала различного типа на примере модельной зараженной и незараженной микоплазмами клеточной культуры BGM было проведено исследование трех видов образцов: культуральной жидкости после концентрирования без экстракции ДНК; ДНК, выделенной из культуральной жидкости после концентрирования, а также ДНК, выделенной из клеточной суспензии после концентрирования.

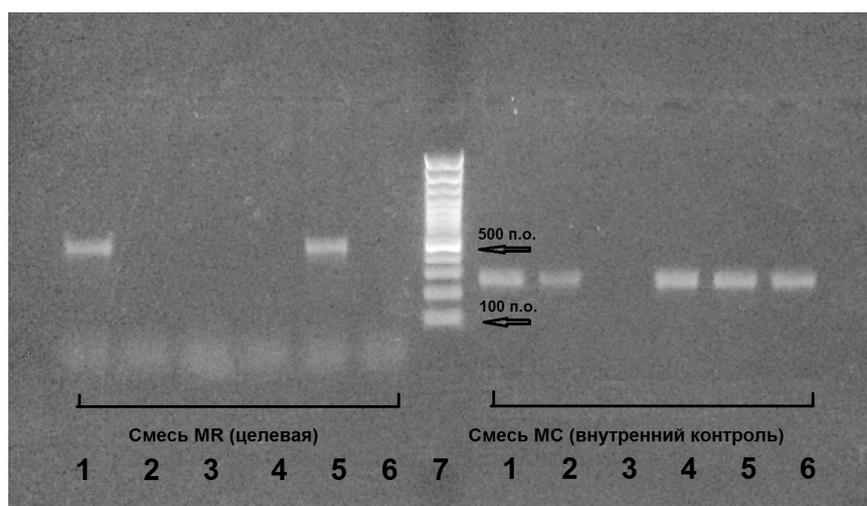
Для выявления ДНК микоплазм был использован коммерческий набор реагентов "MycReport", структура праймеров которого позволяет гарантированно обнаружить геномную ДНК шести видов микроорганизмов, составляющих около 95% случаев микоплазменных инфекций культур клеток – *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma hyorhinis* и *Acholeplasma laidlawii*.

Анализ научных публикаций, а также рекомендаций производителей ряда коммерческих наборов для ПЦР-диагностики микоплазменной контаминации клеточных линий свидетельствует о потенциальной возможности использования образцов культуральной жидкости без выделения ДНК, главным образом при необходимости экспресс-теста. Основное преимущество такого подхода – сокращение времени выполнения исследования [10].

Результаты проведенного нами эксперимента показали, что в ходе ПЦР специфический фрагмент размером порядка 500 пар оснований (п.о). для заведомо контаминированного микоплазмами образца клеточной культуры амплифицировался только на матрице ДНК, выделенной из культуральной жидкости. При использовании в качестве матрицы культурального супернатанта без экстракции ДНК имело место ингибирование реакции, о чем свидетельствует отсутствие амплификата размером 272 п.о. для внутреннего контрольного образца (рисунок 1).

Таким образом, использование в качестве матрицы культуральной жидкости без выделения ДНК может снижать чувствительность ПЦР-анализа. При этом существенно возрастает риск получения ложноотрицательных результатов из-за присутствия в образце ингибиторов ПЦР, в качестве которых могут выступать компоненты питательных

сред, секретируемые клетками белки и др. В таком случае особую актуальность приобретает применение в исследовании внутреннего контрольного образца.



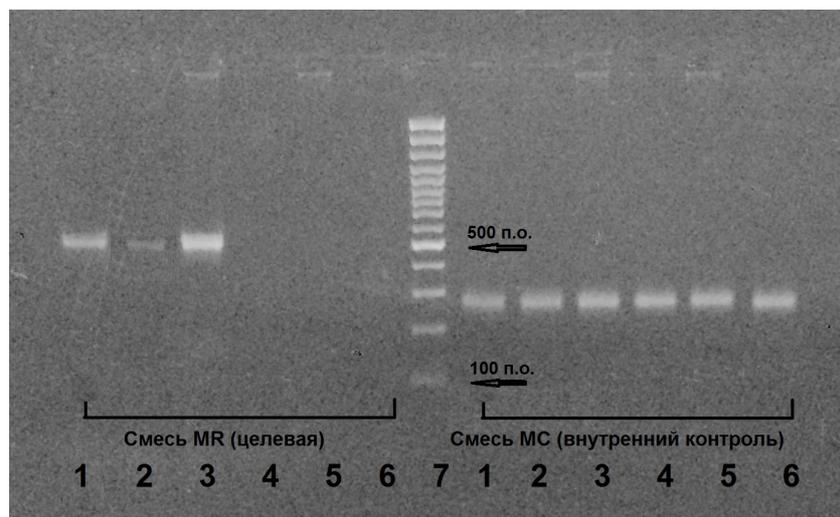
1 – положительный контрольный образец; 2 – культуральная жидкость "чистой" клеточной культуры; 3 – культуральная жидкость контаминированной микоплазмами клеточной культуры; 4 – ДНК, выделенная из культуральной жидкости "чистой" клеточной культуры; 5 – ДНК, выделенная из культуральной жидкости контаминированной микоплазмами клеточной культуры; 6 – отрицательный контрольный образец; 7 – маркер молекулярных масс (100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, США)

Рисунок 1. – Электрофоретический анализ продуктов амплификации, полученных на матрице образцов различного типа пробоподготовки

При сравнении результатов ПЦР на матрице ДНК, выделенной из культуральной жидкости и клеточной суспензии модельных образцов, обращал на себя внимание тот факт, что количество специфического ПЦР-продукта размером порядка 500 п.о. было существенно больше при использовании в качестве матрицы ДНК, выделенной из клеточной суспензии "зараженной" культуры, чем при амплификации на матрице ДНК, выделенной из ее культуральной жидкости. При этом видимых различий в результативности реакции при амплификации фрагмента внутреннего контроля не отмечалось (рисунок 2).

Подобные результаты могут объясняться более высоким содержанием в исследуемом образце микоплазм, которые ассоциированы с эукариотическими клетками или расположены внутриклеточно, по сравнению с содержанием микоплазм, свободно находящихся в культуральной жидкости. Кроме того, клеточный осадок, образующийся при центрифугировании, удерживает на своей поверхности микроорганизмы-контаминанты, благодаря чему потери микоплазм с удаляемой надосадочной жидкостью сводятся к минимуму [6, 9].

Отсутствие у микоплазм ригидной клеточной стенки обеспечивает возможность тесного контакта цитоплазматических мембран клеток паразита и хозяина. Некоторые микоплазмы имеют специфические структуры, опосредующие адгезию к мембране эукариотической клетки [4]. Сообщается также, что отдельные виды микоплазм способны проникать внутрь и выживать в клетках-хозяевах в течение ограниченного периода времени. Так, на примере *Mycoplasma gallisepticum* показана возможность интернализации этого микроорганизма во время ранних стадий инфицирования определенных клеточных линий (в частности, MRC-5 и Vero) [10].



1 – положительный контрольный образец; 2 – ДНК, выделенная из культуральной жидкости контаминированной микоплазмами клеточной культуры; 3 – ДНК, выделенная из контаминированной микоплазмами клеточной суспензии; 4 – ДНК, выделенная из культуральной жидкости "чистой" клеточной культуры; 5 – ДНК, выделенная из "чистой" клеточной суспензии; 6 – отрицательный контрольный образец; 7 – маркер молекулярных масс (100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, США)

Рисунок 2. – Электрофоретический анализ продуктов амплификации, полученных на матрице ДНК, выделенной из культуральной жидкости и клеточной суспензии

Таким образом, неопределенность в соотношении ассоциированных и не ассоциированных с эукариотическими клетками микоплазм ограничивает использование супернатанта клеточных субстратов в качестве единственного исследуемого образца при тестировании на наличие контаминации. В случае если клеточная культура заражена штаммами микоплазм с высокой адгезией к данному типу клеток, подавляющее большинство микоплазм могут развиваться прикрепленными к клеточной поверхности. Как следствие, в культуральной жидкости содержание этих микроорганизмов-контаминантов будет низким, что отрицательно скажется на чувствительности их обнаружения.

Заключение. При детекции микоплазменной контаминации клеточных культур методом полимеразной цепной реакции для достижения высокой чувствительности анализа целесообразно проводить концентрирование материала и предварительное выделение ДНК из культуральной жидкости и клеточной суспензии. Необходимым условием является использование при проведении ПЦР-исследования внутреннего контрольного образца.

Разработка и внедрение метода выявления микоплазм на основе ПЦР в рутинную практику коллекции клеток человека и животных позволит повысить эффективность систематического мониторинга за отсутствием микоплазменной контаминации клеточных линий, а также сделать проведение исследований в рамках его осуществления менее продолжительным и трудоемким.

Литература

1. Микоплазмы – контаминанты клеточных культур / Н.В. Шалунова [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2016. – Т. 16, № 3. – С. 151-160.
2. Cell lines authentication and mycoplasma detection as minimum quality control of cell lines in biobanking / C. Corral-Vazquez [et al.] // Cell Tissue Bank. – 2017. – Vol. 18, No. 2. – P. 271-280.
3. Rottem, S. Contamination of tissue cultures by Mycoplasmas / S. Rottem, J. Kornspan, N. Kosower // Biomedical Tissue Culture / ed.: L. Ceccherini-Nelli. – InTech, 2012. – P. 35-58.

4. Микоплазменные контаминации клеточных культур: везикулярный трафик у бактерий и проблема контроля инфектогенов / В.М. Чернов [и др.] // Acta Nature. – 2014. – Т. 6, № 3. – С. 43-54.
5. Колокольцова, Т.Д. Патологические аспекты микоплазменной контаминации клеточных культур / Т.Д. Колокольцова, И.Н. Сабурин // Патогенез. – 2013. – Т. 11, № 3. – С. 29-31.
6. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: review of alternative non-microbiological techniques / D. Volokhov [et al.] // Mol. Cell. Probes. – 2011. – Vol. 25, No. 2-3. – P. 69-77.
7. European Pharmacopoeia. Ph. Eur. 10.1. Section 2.6.7 Mycoplasmas. 10th ed.; 2020.
8. Ёлшин, Н.Д. Изучение возможности использования метода qPCR для контроля отсутствия микоплазменной контаминации в клеточных культурах / Н.Д. Ёлшин, А.В. Петров // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017. – Т. 17, № 3. – С. 173-179.
9. Детекция микоплазм в клеточных линиях эукариот методом ПЦР в реальном времени с использованием различных способов концентрирования образца / А.А. Чапленко [и др.] // Цитология. – 2020. – Т. 62, № 1. – С. 56-63.
10. Sung, J. A highly sensitive internally-controlled real-time PCR assay for mycoplasma detection in cell cultures / J. Sung, J. Ross Hawkins // Biologicals. – 2020. – Vol. 64, No. 3. – P. 58-72.

DETECTION OF MYCOPLASMA IN CELL CULTURES BY POLYMERASE CHAIN REACTION USING DIFFERENT PREPARATION METHODS

Grigorieva E.E., Fomina E.G., Koran S.V., Zverko V.V.

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

The optimal conditions for sample preparation for effective detection of mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction have been determined. It was shown that to achieve high sensitivity of the analysis concentration of the samples and preliminary DNA isolation from spent culture medium and eukaryotic cell suspension is recommended.

Keywords: cell lines, PCR assay, mycoplasma contamination.

Поступила 21.10.2021

ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ЭТАЛОННЫЕ ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ, КАК СРЕДСТВО СТАНДАРТИЗАЦИИ, ОБЕСПЕЧЕНИЯ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Гудков В.Г., Пугач В.В., Горбунов В.А., Красько А.Г., Шишпоренок Ю.А.,
Анискович Е.Д., Молочкова Я.В., Тимофеева Е.В.

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

Резюме. Описаны основные этапы разработки и получения первых 10 отечественных эталонных штаммов микроорганизмов (ЭШМ), по своему функциональному назначению соответствующих наиболее востребованным прототипам ЭШМ международной коллекции АТСС.

Ключевые слова: эталонные штаммы, бактерии, грибы, коллекция BELRIEM.

Введение. Эталонные штаммы патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (ЭШМ) широко применяются для стандартизации, обеспечения и контроля качества различных видов микробиологических исследований, включая изготовление микробиологических питательных сред, выделение чистых культур, определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, противомикробной активности дезинфицирующих и антисептических средств, микробиологической чистоты и стерильности различных объектов [1-5]. Среди ряда международных и национальных коллекций ЭШМ широкую известность и распространение получила Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection – АТСС). Представленные в коллекции АТСС штаммы подробно охарактеризованы, сертифицированы на международном уровне и применяются практически во всем мире, используются они и в Республике Беларусь.

В Республике Беларусь применение ЭШМ для указанных выше целей регламентировано действующими нормативными правовыми актами [6-9]. Однако, из-за отсутствия отечественных ЭШМ они приобретаются за рубежом, что приносит ряд временных, правовых, финансовых издержек и обуславливает целесообразность разработки и организации производства отечественных ЭШМ.

Цель работы – создать пополняемую коллекцию и организовать производство отечественных эталонных штаммов бактерий и грибов, являющихся функциональными аналогами штаммов АТСС, для замещения импортных аналогов.

Материалы и методы исследования. Функциональное назначение разрабатываемых ЭШМ – контроль качества микробиологических питательных сред, определение противомикробной активности антисептических и дезинфицирующих средств, определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

В качестве прототипов использовались 10 ЭШМ из коллекции АТСС: *Staphylococcus aureus* АТСС 6538, *Staphylococcus aureus* АТСС 29213, *Enterococcus faecalis* АТСС 29212, *Enterococcus faecium* АТСС 6057, *Escherichia coli* АТСС 25922, *Escherichia coli* АТСС 11229, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 27853, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 15442, *Candida albicans* АТСС 10231.

Критерии соответствия по функциональному назначению разрабатываемых ЭШМ штаммам-прототипам и перечень контролируемых параметров ЭШМ определялся на основании микробиологических и молекулярно-генетических исследований.

Микробиологические исследования включали определение видовой принадлежности микроорганизмов на основании культуральных (роста в определенных условиях, на дифференциально-диагностических и селективных микробиологических питательных средах), морфологических (характера роста колоний микроорганизмов в чистых культурах, тинкториальных свойств, морфологии отдельных клеток при микроскопии) и био-

химических (утилизации и ферментации биохимических субстратов, продукции специфических химических соединений, ферментов агрессии) признаков. В качестве референсного метода верификации видовой принадлежности использовалось биохимическое профилирование штаммов микроорганизмов с помощью автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (Biomérieux), а также молекулярно-генетическая идентификация методом амплификации нуклеиновых кислот. На основании результатов этих исследований определялся перечень контролируемых параметров для каждого штамма.

Исследование чувствительности к антибиотикам проводилось в соответствии с действующими в Республике Беларусь техническими нормативными правовыми актами (ТНПА) [7]. В качестве основного использовался диско-диффузионный метод определения чувствительности к антибиотикам с определением диаметров зон задержки роста, в качестве референсного метода – определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) антибиотиков при помощи автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (Biomérieux). Интерпретация результатов исследований осуществлялась согласно актуальной версии международных критериев Европейского комитета по определению чувствительности микроорганизмов к противомикробным средствам (EUCAST).

Чувствительность штаммов микроорганизмов к антисептическим (АС) и дезинфицирующим (ДС) средствам определялась с использованием штампов-репликаторов и в количественном суспензионном тесте в соответствии с действующими в Республике Беларусь ТНПА [8, 10].

Определение чувствительности к АС и ДС при помощи штампов-репликаторов включало несколько этапов. На первом из них осуществлялась контаминация штампов штампов-репликаторов стандартизованными с помощью денситометра до 1 McF, в случае работы с бактериальными патогенами, и до 2 McF, в случае работы с дрожжеподобными грибами, суспензиями микроорганизмов. Контаминация штампов осуществлялась погружением в лунки основания репликатора, содержащие стандартизованные суспензии микроорганизмов. По истечении 5 минут крышка с штампами помещалась на опорное кольцо для высушивания микробной суспензии в асептических условиях на воздухе при комнатной температуре в затемненном месте. Следующим этапом исследования являлась экспозиция контаминированных бактериями штампов штампов-репликаторов с помещенными в лунки рабочими растворами АС и ДС путем погружения штампов в лунки на время, указанное в инструкции производителей этих средств.

Нейтрализация растворов АС и ДС проводилась путем погружения штампов штампа-репликатора в лунки его основания, заполненные универсальным нейтрализатором. Нейтрализация АС и ДС осуществлялась на протяжении 10 минут.

На заключительном этапе исследования штампы штампов-репликаторов извлекались из лунок с нейтрализатором и на 5 секунд слегка прижимались к поверхности агара Мюллера-Хинтон на чашках Петри. Посевы выдерживались в термостате в оптимальных для роста исследуемых культур микроорганизмов условиях, после чего осуществлялся учет результатов исследования по наличию или отсутствию роста микроорганизмов в месте контакта штампов с питательной средой.

При выполнении количественного суспензионного теста взвеси суточных агаровых культур микроорганизмов стандартизовались до 1 McF в физиологическом растворе, смешивались с растворами ДС или АС в рабочих концентрациях в соотношении 1:10. Время экспозиции соответствовало инструкции производителя этих средств. В качестве положительного контроля использовались стандартизованные суспензии исследуемых микроорганизмов в смеси со стерильной водопроводной водой. По истечении времени экспозиции проводилось устранение антимикробного эффекта ДС и АС с помощью уни-

версального нейтрализатора. Из нейтрализованной смеси ДС или АС с суспензией микроорганизмов делались высевы по 100 мкл на сектора чашек с селективными или дифференциально-диагностическими питательными средами. Посевы инкубировались при оптимальных для роста исследуемых культур условиях, после чего подсчитывалось число выросших на питательных средах колоний и определялось количество выживших микроорганизмов (КОЕ/мл). Рассчитывались десятичные логарифмы количества микроорганизмов в опыте и положительном контрольном образце, а также факторы редукции (как разность между десятичным логарифмом количества микроорганизмов в положительном контрольном образце и десятичным логарифмом количества микроорганизмов в суспензии, обработанной ДС или АС) для растворов различных ДС и АС. Средство признавалось эффективным в отношении штамма микроорганизма в том случае, если рассчитанное значение фактора редукции для него составляло не менее 5.

ПЦР в режиме «реального времени» проводилась для детекции видоспецифических участков генома исследуемых микроорганизмов. Выделение нуклеиновых кислот проводилось из суточных культур этих микроорганизмов. Программирование прибора, учет, анализ и интерпретация результатов ПЦР-анализа осуществлялись в соответствии с инструкциями по применению использованных наборов реагентов.

Результаты исследования и обсуждение. Дизайн исследования по разработке отечественных ЭШМ включает 4 стадии. Первая из них предусматривала выбор штаммов-прототипов из коллекции АТСС по их функциональному назначению.

Изучены макро- и микроскопические морфологические особенности этих эталонных штаммов, оценена способность их роста на дифференциально-диагностических и селективных питательных средах, при помощи видоспецифических тестов определены биохимические профили, получена информация о чувствительности к противомикробным средствам, дана молекулярно-генетическая характеристика эталонных штаммов микроорганизмов с использованием методов амплификации значимых фрагментов их генома.

В результате выполнения этой стадии исследования определены контролируемые фенотипические и генотипические параметры прототипных эталонных штаммов и на их основе разработаны технические задания (ТЗ) на получение первых 10 отечественных ЭШМ.

В таблице 1 приведен перечень штаммов-прототипов из коллекции АТСС и соответствующих отечественных ЭШМ.

Таблица 1. – Перечень и назначение разрабатываемых отечественных и прототипных ЭШМ

Отечественные ЭШМ	Прототипы АТСС	Назначение видов ЭШМ
<i>BELRIEM® StaphA-1</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1, 2
<i>BELRIEM® StaphA-2</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	3
<i>BELRIEM® EFs-1</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1, 3
<i>BELRIEM® EFm 1</i>	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	2
<i>BELRIEM® EC 1</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1, 3
<i>BELRIEM® EC 2</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	2
<i>BELRIEM® PA 1</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1
<i>BELRIEM® PA 2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	3
<i>BELRIEM® PA 3</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	2
<i>BELRIEM® CA 1</i>	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1, 2, 3

Примечания:

- 1 – контроль качества микробиологических питательных сред;
- 2 – определение противомикробной активности антисептических и дезинфицирующих средств;
- 3 – определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Вторая стадия НИР предполагала скрининг чистых культур микроорганизмов тех видов, которые могут быть использованы для создания отечественных эталонных штаммов. По результатам скрининга сформированы рабочие коллекции чистых культур из 50 штаммов микроорганизмов соответствующего вида каждая. Согласно разработанным на отечественные эталонные штаммы ТЗ у собранных в рабочих коллекциях штаммов определены основные фено- и генотипические параметры. По результатам проведенных исследований отобрано по 2 штамма каждого вида микроорганизмов, которые обладали фено- и генотипическими параметрами, полностью отвечающими требованиям указанных ТЗ. Эти штаммы рассматривались в качестве кандидатов для разработки отечественных ЭШМ. Данные о соответствии значений контролируемых параметров разрабатываемых ЭШМ и прототипных штаммов АТСС представлены в таблицах 2-4.

Таблица 2. – Соответствие контролируемых морфологических и культуральных параметров отечественных ЭШМ и прототипных штаммов АТСС

ЭШМ BELRIEM®	Значения контролируемых параметров		ЭШМ АТСС	Соответствие параметров
	Морфологические	Культуральные		
BELRIEM® StaphA-1	Грамположительные кокки, расположенные группами или по отдельности	Наличие роста на желточно-солевом, мантино-солевом агаре. На агаре Мюллера-Хинтон – округлые колонии белого или желтоватого цвета, слабовыпуклые	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Соответствуют
BELRIEM® StaphA-2			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Соответствуют
BELRIEM® EFs-1	Грамположительные кокки, расположенные небольшими цепочками или попарно	Наличие роста на энтерококк-агаре. На агаре Мюллера-Хинтон – округлые выпуклые мелкие колонии белого цвета	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Соответствуют
BELRIEM® EFm 1			<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	Соответствуют
BELRIEM® EC 1	Грамотрицательные палочки	Наличие роста на неселективных питательных средах в аэробных условиях при температуре 37±1°C	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Соответствуют
BELRIEM® EC 2			<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	Соответствуют
BELRIEM® PA 1	Грамотрицательные палочки	Наличие роста на цетримидном агаре	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Соответствуют
BELRIEM® PA 2	Грамотрицательные палочки	Наличие роста на цетримидном агаре. Наличие колоний 2 типов: с неровными краями, около 2 мм в диаметре; мелкие блестящие, гладкие. Допускается наличие признаков лизогенной культуры	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Соответствуют
BELRIEM® PA 3			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Соответствуют
BELRIEM® CA 1	Грамположительные клетки овоидной формы, почкующиеся, в молодых культурах расположены преимущественно поодиночке	Наличие роста на агаре Сабуро с добавлением гентамицина. По истечении 2 суток инкубации колонии кремового цвета, блестящие, гладкие	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Соответствуют

Таблица 3. – Соответствие контролируемых биохимических и молекулярно-генетических параметров отечественных ЭШМ и прототипных штаммов ATCC

ЭШМ BELRIEM®	Значения контролируемых параметров		ЭШМ ATCC	Соответствие параметров
	Биохимические	Молекулярно-генетические		
BELRIEM® StaphA-1	Ферментация маннита, продукция лецитиназы и плазмокоагулазы, наличие β-гемолитической активности	Наличие S-образной кривой нарастания флуоресценции по каналу детекции продуктов амплификации специфической мишени, значение Ct – менее порогового	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Соответствует
BELRIEM® StaphA-2			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Соответствуют
BELRIEM® EFs-1	Не определяются		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Соответствуют
BELRIEM® EFm 1			<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	Соответствуют
BELRIEM® EC 1	Ферментация глюкозы, лактозы		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Соответствуют
BELRIEM® EC 2			<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	Соответствуют
BELRIEM® PA 1	Продукция флуоресцеина, пиоцианина, 2-аминоацетофенона		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Соответствуют
BELRIEM® PA 2			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Соответствуют
BELRIEM® PA 3			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Соответствуют
BELRIEM® CA 1			<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Соответствуют

Таблица 4. – Соответствие контролируемых параметров чувствительности к противомикробным средствам отечественных ЭШМ и прототипных штаммов ATCC

ЭШМ BELRIEM®	Значения контролируемых параметров	ЭШМ ATCC	Соответствие параметров
BELRIEM® StaphA-1	Чувствительность к дезинфицирующим и антисептическим средствам	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Соответствуют
BELRIEM® StaphA-2	Чувствительность к амикацину, цефокситину, норфлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину, гентамицину, эритромицину, тетрациклину, нитрофурантоину.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Соответствуют
BELRIEM® EFs-1	Чувствительность к имипенему, левофлоксацину, норфлоксацину, ванкомицину, нитрофурантоину	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Соответствуют
BELRIEM® EFm 1	Чувствительность к дезинфицирующим и антисептическим средствам	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	Соответствуют

BELRIEM® EC 1	Чувствительность к амикацину, амоксициллину-клавулановой кислоте, ампициллину, цефепиму, цефтазидиму, цефокситину, норфлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину, гентамицину, нитрофурантоину, имипенему.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Соответствуют
BELRIEM® EC 2	Чувствительность к дезинфицирующим и антисептическим средствам	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	Соответствуют
BELRIEM® PA 1	Не определяются	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Соответствуют
BELRIEM® PA 2	Чувствительность к амикацину, цефепиму, цефтазидиму, левофлоксацину, гентамицину, имипенему, пиперациллину-газобактаму.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Соответствуют
BELRIEM® PA 3	Чувствительность к дезинфицирующим и антисептическим средствам	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Соответствуют
BELRIEM® CA 1	Чувствительность к дезинфицирующим и антисептическим средствам	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Соответствуют

Следующая стадия исследования состояла в разработке методик получения отечественных ЭШМ на основе отобранных ранее штаммов-кандидатов. Они подверглись детальному микробиологическому и молекулярно-биологическому изучению основных свойств, определяющих назначение эталонных штаммов в соответствии с техническим заданием на каждый штамм, в сравнительных исследованиях с прототипами из коллекции ATCC. Разработаны также программы и начато изучение стабильности штаммов, прошедших по 5 пассажей, по контролируемым параметрам.

Четвертая стадия НИР была направлена на разработку технологических инструкций на производство каждого из 10 отечественных ЭШМ, включая порядок скрининга и отбора штаммов указанных видов микроорганизмов, потенциально пригодных для получения эталонных штаммов, определение контролируемых параметров и методы их оценки, способы накопления биомассы, а также отработку способа лиофилизации. Изготовление опытных партий и депонирование отечественных эталонных штаммов в Республиканской коллекции патогенных биологических агентов.

Заключение. Проведены исследования по разработке первых 10 отечественных ЭШМ, соответствующих по своим функциональным и определяющим их назначение биологическим свойствам прототипам из коллекции ATCC.

В процессе выполнения работы были сформированы 4 рабочие коллекции чистых культур 6 видов микроорганизмов, по 50 штаммов в каждой; разработаны технические задания на 10 ЭШМ и методики их получения; технологические инструкции на производство и программы изучения стабильности, проекты инструкций по применению. Изготовлены опытные партии ЭШМ, в соответствии с разработанной программой продолжается изучение их стабильности. Осуществлено депонирование ЭШМ в Республиканской коллекции патогенных биологических агентов.

Таким образом, создана научная и экспериментальная база для разработки комплекта нормативно-технической документации, государственной регистрации и организации производства нового для Республики Беларусь вида изделий медицинского назначения – эталонного штамма микроорганизма.

Литература

1. Genomic alterations of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 after prolonged passage in the laboratory / P.-J. Chin [et al.] // *Microbiol. Resour. Announc.* – 2018. – Vol. 7, No. 18. – e01108-18. doi:10.1128/MRA.01108-18
2. Study of the lipid profile of ATCC and clinical strains of *Staphylococcus aureus* in relation to their antibiotic resistance / C. Bisignano [et al.] // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, No. 7. – P. 1276. doi:10.3390/molecules24071276
3. Sebaa, S. Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm / S. Sebaa, Z. Boucherit-Otmani, P. Courtois // *Mol. Med. Rep.* – 2019. – Vol. 19, No. 4. – P. 3201-3209.
4. Mechanism of *S. aureus* ATCC 25923 in response to heat stress under different water activity and heating rates / L. Zhang [et al.] // *Food Control.* – 2020. – Vol. 108. – P. 106837.
5. Микробиологические методы исследования биологического материала: инструкция по применению / сост.: Н.Д. Коломиец [и др.]. – Минск, 2010. – 124 с.
6. Хранение, приготовление и контроль качества питательных сред [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.soligorskce.by/index.php?option=com_content&view=article&id=3253%3A2012-02-28-13-42-19&Itemid=21. – Дата доступа: 28.10.2021.
7. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 13.11.2008, № 226-1200 / сост.: А.М. Марейко [и др.]. – Минск, 2008.
8. Методы проверки и оценки антимикробной активности дезинфицирующих и антисептических средств: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 22.12.2003, № 11-20-204-2003 / сост.: В.П. Филонов [и др.]. – Минск, 2003. – 41 с.
9. Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред: ГОСТ ISO 11133-2016. – Введ. 01.07.2017. – (Межгосударственный стандарт).
10. Методы испытания прогномикробной активности дезинфицирующих средств: временная инструкция М-ва здравоохранения Респ. Беларусь / сост.: Е.И. Гудкова [и др.]. – Минск, 1998. – 8 с.

DOMESTIC REFERENCE STRAINS OF MICROORGANISMS FOR STANDARDIZATION, PROVISION AND QUALITY CONTROL OF MICROBIOLOGICAL STUDIES

Gudkov V.G., Pugach V.V., Gorbunov V.A., Krasko A.G., Shishporenok Yu.A., Aniskovich E.D., Molochkova Ya.V., Timofeeva E.V.

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

The main stages of development and production of the first 10 domestic reference strains of microorganisms (ESM), corresponding in their functional purpose to the most popular ESM prototypes of the international ATCC collection, are described.

Keywords: reference strains, bacteria, fungi, BELRIEM collection.

Поступила 15.12.2021

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕНОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АМИНОГЛИКОЗИДАМ У *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Дубовик П.И., Титов Л.П.

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

Резюме. Материалом для исследования являлись 247 штаммов *Enterococcus faecalis*, выделенные от пациентов с кардиологическими, хирургическими, гинекологическими, перинатальными, урологическими и бронхолегочными патологиями. Был осуществлен биоинформационный поиск праймеров и зондов для детекции генов устойчивости к аминогликозидам *E. faecalis* — *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *ant(6')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*. В результате проведенного анализа была оценена распространенность исследуемых генов резистентности среди выбранной группы изолятов. Экспериментальная апробация подтвердила высокую корреляцию между фенотипической и генотипической устойчивостью к гентамицину. Среди устойчивых только к амикацину изолятов 72,4% штаммов не содержали ни одного из анализируемых генов, что может быть связано с присутствием других генетических детерминант, обеспечивающих резистентность.

Ключевые слова: энтерококк, полимеразная цепная реакция, резистентность, аминогликозиды, амикацин, гентамицин

Введение. На сегодняшний день использование антибиотикотерапии является одним из основных подходов в лечении широкого спектра бактериальных заболеваний. Возникновение и распространение устойчивых к противомикробным препаратам бактериальных штаммов представляет собой серьезную проблему общественного здравоохранения и создает трудности определения эффективной медикаментозной стратегии для медицинских учреждений по всему миру.

Одними из наиболее значимых условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированных с внутрибольничными инфекциями, являются грамположительные бактерии рода *Enterococcus*. До обнаружения у энтерококков множественной резистентности к антибиотикам в 1970 г. их считали относительно безобидными представителями нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека и животных. Однако в последние десятилетия они рассматриваются в качестве актуальных эмерджентных инфекционных агентов, приводящих к заболеваниям мочевыводящих путей, бактериемиям, внутрибрюшным инфекциям и эндокардитам [1, 2].

Подавляющее большинство клинически значимых энтерококковых инфекций у человека вызывает *Enterococcus faecalis* — микроорганизм, одновременно обладающий как высокой вирулентностью, так и множественной лекарственной устойчивостью [3]. Естественная резистентность *E. faecalis* включает цефалоспорины, аминогликозиды, макролиды и сульфаниламиды, а также клиндамицин и хинупристин/далфопристин [4]. Более того, энтерококки демонстрируют потенциал устойчивости практически ко всем противомикробным препаратам, используемым при терапии инфекций человека [5].

Лечение тяжелых инвазивных энтерококковых инфекций обычно основано на комбинации антибиотика, действующего на клеточную стенку (например, ампициллин и ванкомицин), и аминогликозида (гентамицин или стрептомицин). Устойчивость к высоким уровням аминогликозидных антибиотиков (HLAR) обычно возникает из-за продукции ферментов, модифицирующих аминогликозиды (AME) [6]. Эти ферменты, такие как ацентилтрансфераза AAC(6')-Ie-APH(2''), нуклеотидилтрансферазы ANT(6')-Ia и ANT(4')-Ia, фосфотрансфераза APH(3')-IIIa, кодируются мобильными генетическими элементами и широко распространены среди *Enterococcus spp.*, из-за чего своевремен-

ное выявление резистентных штаммов является актуальной проблемой в борьбе с заболеваниями, вызванными *E. faecalis*.

Использование диагностическими лабораториями метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) обусловлено быстротой анализа, высокой достоверностью, чувствительностью и производительностью. С учетом актуальности исследований, направленных на определение устойчивых к противомикробными препаратами штаммов *E. faecalis*, нами были разработаны праймеры и зонды для выявления генов резистентности к аминогликозидам — *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *ant(6')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*.

Цель настоящего исследования — разработать праймеры, зонды, определить условия проведения ПЦР в режиме реального времени (РВ) для выявления генов резистентности к антибиотикам класса аминогликозиды у *E. faecalis*.

Материалы и методы исследования. В работе использовались 247 штаммов *E. faecalis* из рабочей коллекции, выделенные от пациентов стационаров и поликлиник Республики Беларусь с кардиологическими (n=18, 7,3%), хирургическими (n=28, 11,3%), гинекологическими (n=19, 7,7%), перинатальными (n=117, 47,4%), урологическими (n=28, 11,3%) и бронхолегочными (n=29, 11,7%) патологиями.

Для культивирования изолятов использовали Энтерококкагар (ЦКП ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Идентификацию микроорганизмов проводили путем детекции гена D-аланин-D-аланинлигазы *ddl* методом ПЦР-РВ. Чувствительность к антибактериальным препаратам класса аминогликозиды (коммерческие препараты одной серии: амикацин, гентамицин) определяли стандартным диско-диффузионным методом и методом E-теста. Для этого использовали взвесь суточной культуры энтерококков, соответствующую по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащую примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Стандартный инокулюм наносили пипеткой на поверхность чашки Петри с плотной питательной средой — агаром Мюллера-Хинтона (Liofilchem, Италия) в объеме 1 мл, равномерно распределяли по поверхности покачиванием, после чего удаляли избыток инокулюма пипеткой. После инокуляции на поверхность питательной среды наносили диски с антибактериальными препаратами при помощи стерильного пинцета, после чего инкубировали чашки в термостате при температуре 37°C в течение 18-24 ч. Учет результатов проводили после инкубации путем измерения диаметра зон задержки роста тестируемого микроорганизма. Интерпретация осуществлялась на основании сопоставления результатов исследования (диаметра зоны подавления роста, мм; значений МПК, мкг/мл) с пограничными значениями Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST 11.0) для *E. faecalis*.

Нуклеотидные последовательности генов были получены из банка данных GenBank. Сравнение нуклеотидных последовательностей с исследуемыми видами микроорганизмов осуществлялось с использованием алгоритма BLAST. Анализ исследуемых последовательностей генов производился при помощи программы MEGA10. Олигонуклеотидные праймеры и зонды синтезированы ОДО «АртБиоТех», Беларусь.

Экстракцию бактериальной ДНК проводили методом кипячения. Реакцию амплификации осуществляли на приборе Rotor-Gene 3000 (Corbett Research Ltd, Великобритания) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени.

Результаты исследования и обсуждение.

Изучение фенотипической резистентности. Для исследуемых изолятов было осуществлено измерение зон задержки роста при использовании диско-диффузионного метода оценки чувствительности к антибактериальным препаратам. Согласно EUCAST 10.0, диаметр зоны подавления роста для чувствительных штаммов составляет ≥ 8 мм, что относит их к «дикому типу», характеризующемуся природной резистентностью низкого уровня. Также был использован метод E-тестов, при котором значение МПК

>128 мг/л соответствует резистентным изолятам. Для штаммов, не имеющих зоны задержки роста, значение минимальной ингибирующей концентрации составляет >256, так как 256 является крайним значением концентрации препарата на тест-полоске. Результаты определения чувствительности к АБП для 247 штаммов представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Чувствительность к антибактериальным препаратам класса аминогликозиды анализируемых штаммов

Тип резистентности	Резистентность только к гентамицину	Резистентность только к амикацину	Резистентность к амикацину и гентамицину	Отсутствие резистентности
Количество штаммов (%)	6 (2,4)	76 (30,8)	116 (47)	49 (19,8)

Примечательно, что все резистентные штаммы не образовывали зоны задержки роста на Е-тестах, что соответствует высокому уровню устойчивости к используемому антибактериальному препарату.

Разработка праймеров и зондов. В целях исследования полученных результатов на молекулярно-генетическом уровне были разработаны праймеры и зонды для четырех генов, наиболее характерных для устойчивых к аминогликозидам бактерий *E. faecalis*: *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *ant(6')-Ia*. Для разработки праймеров были проанализированы нуклеотидные последовательности указанных генов у различных штаммов *E. faecalis*, геномы которых представлены в базе NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

С использованием метода выравнивания в программе MEGA10 была получена последовательность для описанных генов, с помощью которой установлены их консервативные и варибельные области. Последовательность праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах вида. Для подбора праймеров и условий проведения ПЦР была использована программа «Primer 3.0». При подборе праймеров соблюдались следующие условия, выполнение которых позволяет добиться лучшей эффективности и специфичности реакции:

- длина праймеров в пределах 18-25 п.о.;
- длина продукта амплификации от 50 до 300 п.о.;
- температура отжига праймеров от 50 до 60°C;
- GC-состав праймеров, определяющий Tm (температуру плавления), должен находиться в пределах 40-60% (оптимально 45-55%). При этом значения Tm обоих праймеров должны быть близкими.

Характеристика подобранных праймеров приведена в таблице 2.

Таблица 2. — Характеристика праймеров, используемых для амплификации генов резистентности к аминогликозидам *E. faecalis*

Наименование праймера	Размер ампликона, п.о.	Последовательность	Tm, °C	GC, %
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-F</i>	176	ACAGAGCCTTGGGAAGATGA	52-58	50
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-R</i>		CTCCAATAATTTGGCTCTCCT	50-57	43
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-FAM</i>		CTGATGAGATAGTCTATGGTATGGATC	57-65	41

<i>aph(3')-IIIa-F</i>	162	GAAAGCTGCCTGTTCCAAAG	52-58	50
<i>aph(3')-IIIa-R</i>		GAAAGAGCCTGATGCACTCC	54-60	55
<i>aph(3')-IIIa-FAM</i>		TCCTGCACTTTGAACGGCATGATGGCT	60-71	52
<i>ant(4')-Ia-F</i>	168	CTGCCATGTTGATTGGTCTG	52-58	50
<i>ant(4')-Ia-R</i>		TATCCGTGTCGTTCTGTCCA	52-58	50
<i>ant(4')-Ia-FAM</i>		CATCATCGCATCTGTTATACGAC	53-61	43
<i>ant(6')-Ia-F</i>	232	CCCAGAGGAGAGCTTTGATG	54-60	55
<i>ant(6')-Ia-R</i>		TGTCCGTTTGCCCTCATAAT	50-56	45
<i>ant(6')-Ia-FAM</i>		TACTGCATTTCCCGGTGGACA	54-61	52

При помощи программы OligoAnalyzer 3.1 была проведена оценка термодинамических параметров праймеров и проверка их внутренней вторичной структуры на возможность образования шпилек, димеров и дуплексов. Таким образом, на данном этапе нами был проведен подбор праймеров и определены условия их функционирования для постановки ПЦР.

Аmplification специфических ПЦР продуктов проводилась в реакционной смеси объемом 25 мкл, состоящей из 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы, 0,2 мкл 25 мМ смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 1 мкл Mg²⁺, 2,5 мкл 10X ПЦР-буфера, 1 мкл каждого из праймеров, 0,5 мкл зонда, деионизированной воды. Как показывает таблица 3, для выбранных пар праймеров в серии экспериментов проводилась оптимизация температурного и временного режима программы амплификации, что обеспечило специфичность ПЦР-РВ.

Таблица 3. — Условия амплификации фрагментов генов *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *ant(6')-Ia*

Гены	Шаг	Кол-во циклов	Температура	Время
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> <i>aph(3')-IIIa</i> <i>ant(4')-Ia</i> <i>ant(6')-Ia</i>	предварительная денатурация	1	94°C	3 мин
	денатурация	35	94-95°C	20-40 с
	отжиг		50-68°C	20-40 с
	элонгация		68-72°C	30-40 с на 1 т. п.о.

Таким образом, разработка праймеров и зондов к генам устойчивости к аминогликозидам позволила нам провести детекцию этих генов у 247 штаммов *E. faecalis* методом ПЦР-РВ. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. — Частота встречаемости генов резистентности к аминогликозидам у штаммов *E. faecalis*

Фенотип резистентности	Количество штаммов	Встречаемость генов (%)			
		<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>ant(4')-Ia</i>	<i>ant(6')-Ia</i>
Гентамицин	6	4 (66,7)	2 (33,3)	0 (0)	0 (0)
Амикацин	76	11 (14,5)	16 (21)	0 (0)	8 (10,5)
Гентамицин + амикацин	116	94 (81)	77 (66,4)	2 (1,7)	47 (40,5)

Среди пяти штаммов, не проявляющих фенотипической резистентности, 03.15.04 и 03.15.159 имели «молчащие» гены *aac(6')-Ie-aph(2'')* и *aph(3')-IIIa*, 03.15.54 — *aac(6')-Ie-aph(2'')* и *ant(4')-Ia*, 03.15.110 и 03.15.210 — *aph(3')-IIIa*. Среди устойчивых только к амикацину изолятов 55 (72,4%) не имели ни одного из исследуемых генов, что может свидетельствовать о наличии других генетических детерминант, отвечающих за проявление данного типа резистентности. Резистентные к гентамицину штаммы, в т.ч. в составе фенотипа гентамицин + амикацин, проявляли выраженную корреляцию с результатами, определенными после применения диско-диффузионного метода и метода Е-тестов — только 15 (12,3%) штаммов не содержали анализируемые гены.

В таблице 5 показана частота встречаемости сочетаний исследуемых генов среди штаммов *E. faecalis*.

Таблица 5. — Частота встречаемости сочетаний генов резистентности к аминогликозидам у штаммов *E. faecalis*

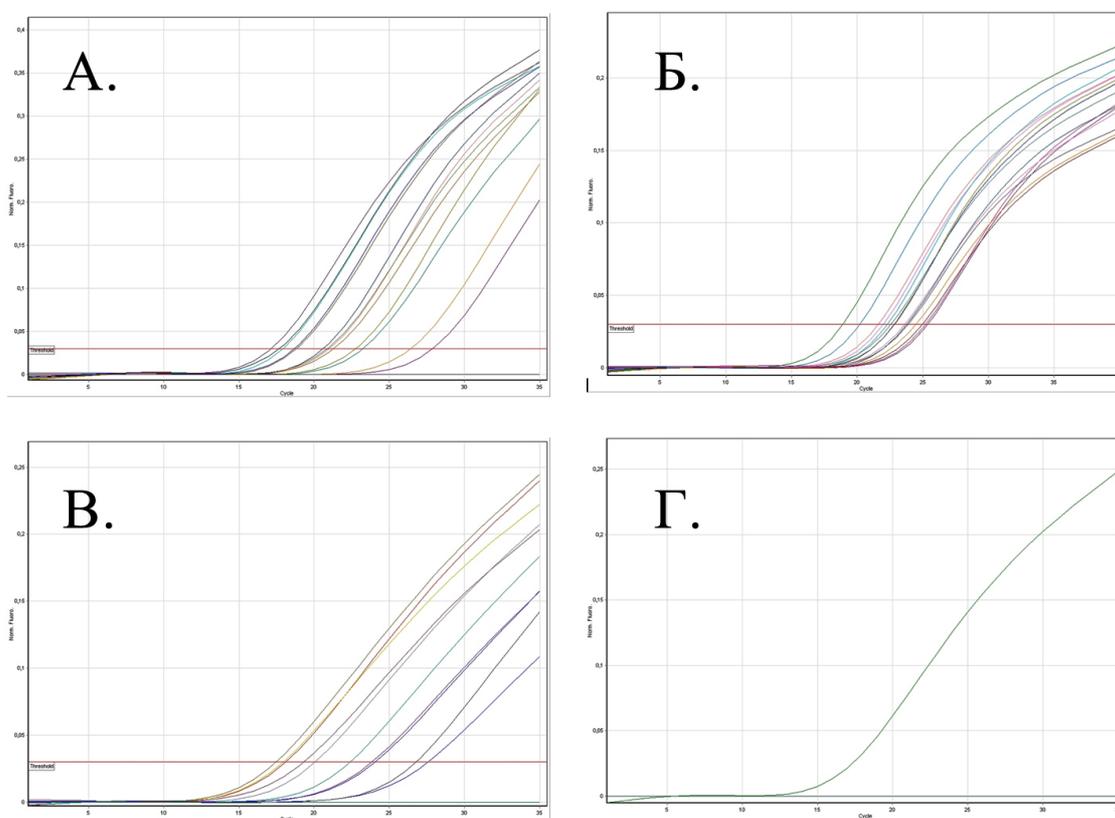
Сочетания генов	Фенотип резистентности			Итого
	Гентамицин	Амикацин	Гентамицин + амикацин	
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i>	2	3	18	21
<i>aph(3')-IIIa</i>	0	7	2	9
<i>ant(4')-Ia</i>	0	0	0	0
<i>ant(6')-Ia</i>	0	1	1	2
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> + <i>aph(3')-IIIa</i>	2	4	31	37
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> + <i>ant(4')-Ia</i>	0	0	0	0
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> + <i>ant(6')-Ia</i>	0	1	3	4
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> + <i>aph(3')-IIIa</i> + <i>ant(4')-Ia</i>	0	0	1	1
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> + <i>aph(3')-IIIa</i> + <i>ant(6')-Ia</i>	0	3	41	44
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> + <i>ant(4')-Ia</i> + <i>ant(6')-Ia</i>	0	0	0	0
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> + <i>aph(3')-IIIa</i> + <i>ant(4')-Ia</i> + <i>ant(6')-Ia</i>	0	0	1	1
<i>aph(3')-IIIa</i> + <i>ant(4')-Ia</i>	0	0	0	0
<i>aph(3')-IIIa</i> + <i>ant(6')-Ia</i>	0	2	3	5
<i>aph(3')-IIIa</i> + <i>ant(4')-Ia</i> + <i>ant(6')-Ia</i>	0	0	0	0
<i>ant(4')-Ia</i> + <i>ant(6')-Ia</i>	0	0	0	0

Таким образом, для фенотипа резистентности гентамицин + амикацин наиболее распространенными являлись профили *aac(6')-Ie-aph(2'')* + *aph(3')-IIIa* (26,7%) и *aac(6')-Ie-aph(2'')* + *aph(3')-IIIa* + *ant(6')-Ia* (35,3%). Штамм 03.15.165 оказался единственным, имеющим все четыре анализируемых гена устойчивости к антибиотикам.

На рисунке представлены результаты ПЦР-РВ на наличие генов резистентности для некоторых изученных штаммов.

Заключение. Для 247 штаммов *E. faecalis* проведена характеристика фенотипических проявлений устойчивости к аминогликозидам (гентамицин, амикацин) и осуществлен поиск соответствующих генов, обеспечивающих резистентность.

Проведен биоинформационный поиск праймеров для детекции выбранных генов *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *ant(6')-Ia*, в соответствии с заданными требованиями сконструировано четыре пары праймеров и проведено изучение их термодинамических параметров. Осуществлена оптимизация временного и температурного режима ПЦР, концентрации компонентов, а также определены условия, обеспечивающие наибольшую специфичность реакции для выявления генетических детерминант резистентности к аминогликозидам.



А — кривая накопления продуктов амплификации области гена *aph(3')-IIIa*; Б — кривая накопления продуктов амплификации области гена *aac(6')-Ie-aph(2'')*; В — кривая накопления продуктов амплификации области гена *ant(6')-Ia*; Г — кривая накопления продуктов амплификации области гена *ant(4')-Ia*

Рисунок. — Кривые накопления продуктов амплификации областей генов резистентности исследуемых штаммов *E. Faecalis*

В результате проведенного анализа оценена распространенность исследуемых генов резистентности среди выбранной группы изолятов. Для устойчивых к гентамицину штаммов была выявлена высокая корреляция между фенотипической резистентностью и наличием исследуемых генов. Самыми распространенными сочетаниями генов у ре-

зистентных к гентамицину штаммов оказались *aac(6')-Ie-aph(2'') + aph(3')-IIIa* (26,7%) и *aac(6')-Ie-aph(2'') + aph(3')-IIIa + ant(6')-Ia* (35,3%). Среди устойчивых только к амикацину изолятов 72,4% штамма не содержали ни одного из анализируемых генов, что может быть связано с присутствием других генетических детерминант, обеспечивающих резистентность.

Результаты проведенных исследований показывают, что разработанные праймеры и зонды могут быть эффективно использованы в клинической и диагностической практике для определения штаммов, обладающих резистентностью высокого уровня к гентамицину, а также для определения терапевтической стратегии при лечении инфекций, вызванных *E. faecalis*.

Литература

1. Mundy, L.M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance / L.M. Mundy, D.F. Sahm, M. Gilmore // Clin. Microbiol. Rev. – 2000. – Vol. 13, No. 4. – P. 513-522.
2. Fiore, E. Pathogenicity of *Enterococci* / E. Fiore, D. Van Tyne, M.S. Gilmore // Microbiol. Spectr. – 2019. – Vol. 7, No. 4. – 10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018.
3. Van Tyne, D. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin / D. Van Tyne, M. Martin, M. Gilmore // Toxins. – 2013. – Vol. 5, No. 5 – P. 895-911.
4. EUCAST: EUCAST [Electronic resource]. – Mode of access: <https://eucast.org/>. – Date of access: 21.09.2021.
5. Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat / M. Golob [et al.] // BioMed Res. Int. – 2019. – Vol. 2019 – P. 1-12.
6. Faecal carriage of high-level aminoglycoside-resistant and ampicillin-resistant *Enterococcus* species in healthy Iranian children / E. Jannati [et al.] // J. Glob. Antimicrob. Resist. – 2020. – Vol. 20 – P. 135-144.

DEVELOPMENT OF PRIMERS AND PROBES FOR DETECTION OF AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE GENES IN *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Dubovik P.I., Titov L.P.

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

The material for the study was 247 of *Enterococcus faecalis* strains isolated from patients with cardiological, surgical, gynecological, perinatal, urological and bronchopulmonary pathologies. Bioinformatic search was carried out for primers and probes for the detection of *E. faecalis* aminoglycoside resistance genes — *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *ant(6')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*. The prevalence of the studied resistance genes among the selected group of isolates were estimated. Experimental testing confirmed a high correlation between phenotypic and genotypic resistance to gentamicin. Among the isolates resistant only to amikacin, 72.4% of the strain did not contain any of the analyzed genes, which may be due to the presence of other genetic determinants providing resistance.

Keywords: enterococcus, polymerase chain reaction, resistance, aminoglycosides, amikacin, gentamicin.

Поступила 05.11.2021

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ СРЕДСТВ В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДЕРМАТОФИТИЙ

¹Звягинцева К.Б., ²Пугач В.В., ¹Канашкова Т.А., ²Дронина А.М.,
¹Буткевич В.В.

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

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

Резюме. Проведено исследование по определению чувствительности к противогрибковым средствам клинических изолятов патогенных грибов *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.* при помощи метода микроразведений в 96-луночных планшетах с определением минимальных ингибирующих концентраций противогрибковых средств. Клинические изоляты дерматофитов получены от пациентов УЗ «Городской клинический кожно-венерологический диспансер» г. Минска. В результате проведенного исследования установлено, что степень выраженности ингибирующего эффекта различных противогрибковых средств варьировала в широких пределах в зависимости от рода дерматофита. Полученные данные свидетельствуют о необходимости разработки и применения схем этиотропной терапии дерматофитий с учётом данных о чувствительности клинических изолятов грибов.

Ключевые слова: *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*, чувствительность, устойчивость, противогрибковые средства, минимальная ингибирующая концентрация.

Введение. Дерматомикозы являются одной из значимых групп патологии кожи и её придатков. По данным УЗ «Городской клинический кожно-венерологический диспансер» г. Минска, микозы кожи и её придатков в 2015-2019 гг. занимали второе место в общей структуре заболеваемости после аллергодерматозов. При этом, в соответствии со статистической отчётной документацией дерматовенерологических диспансеров Республики Беларусь за тот же период, тенденции к снижению заболеваемости микозами не отмечается.

Одной из основных групп патогенных для человека грибов являются грибы-дерматофиты. Наиболее значимыми в патологии человека являются представители родов *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.* [1]. В последние годы наблюдается более частое выявление смешанных микозов у пациентов с установленными диагнозами «микоз стоп», «микоз кожи ладоней», «онихомикоз», при этом нередко в качестве этиологического фактора при микст-инфекциях выступают ассоциации дерматофитов и плесневых грибов, а также дерматофитов и дрожжеподобных грибов. В ряде стран микозом стоп болеет до 50% населения [2]. В Республике Беларусь в период 2015-2019 гг. заболеваемость дерматофитиями варьировала в пределах от 5,71‰ (2015 г.) до 6,03‰ (2018 г.).

Актуальным направлением проведения исследований в области диагностики и лечения дерматофитий является изучение профилей резистентности клинических изолятов грибов. Биологические особенности, природная резистентность некоторых видов дерматофитов к основным применяемым в клинической практике антимикотикам, а также токсичность применяемых для лечения грибковых инфекций противомикробных средств обуславливают длительное лечение пациентов с дерматомикозами [3]. В связи с этим, нередко случаи нарушения назначенных схем этиотропной терапии, что создаёт предпосылки для формирования резистентных к противогрибковым средствам штаммов дерматофитов.

В связи с вышеизложенным, специалистами в области диагностики и лечения дерматомикозов предлагается проведение обязательного тестирования чувствительности к противогрибковым средствам клинических изолятов дерматофитов, выделенных от пациентов с хроническими, рецидивирующими или упорными формами инфекции [4]. Информация о спектрах чувствительности дерматофитов к противомикробным средствам позволяет повысить качество и эффективность назначаемого лечения за счёт применения средств, проявляющих наибольшую активность в отношении конкретного штамма возбудителя [5, 6].

Цель проведения настоящего исследования – определение чувствительности изолятов грибов-возбудителей дерматофитий (*Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*), к противогрибковым средствам.

Материалы и методы исследования. Для исследования были отобраны 49 изолятов *Trichophyton spp.* и 34 изолята *Microsporum spp.*, выделенных из клинического материала (соскобы кожи, фрагменты ногтей) пациентов, находившихся на лечении в УЗ «Городской клинический кожно-венерологический диспансер» г. Минска с диагнозами «В35.1 Микоз ногтей», «В35.2 Микоз кистей», «В35.3 Микоз стоп», «В35.4 Микоз туловища», «В35 Микроспория», «В35.6 Эпидермофития паховая».

Исследуемый клинический материал высевали на агар Сабуро и инкубировали на протяжении 7-10 суток при 27°C. По истечении времени инкубации осуществляли учёт роста колоний, схожих по морфологическим признакам с колониями возбудителей дерматофитий. Для определения чувствительности дерматофитов к противогрибковым средствам использовали метод серийных разведений в жидкой питательной среде, с определением минимальной ингибирующей концентрации (МИК) противогрибкового средства и показателей МИК₅₀ и МИК₉₀ в соответствии с требованиями, установленными методом E.Def 11.0, разработанного EUCAST [7].

Результаты исследования и обсуждение. Результаты проведенных исследований и значения определяемых параметров представлены в таблице.

Таблица. – Значения МИК₅₀ и МИК₉₀ противогрибковых средств

Род дерматофита	Показатели МИК (мкг/мл)	Противогрибковое средство						
		ИТЗ	КЛЗ	ГРФ	ТЕР	ФЛК	АМФ	НИС
<i>Trichophyton spp.</i> n=49	МИК ₅₀	0,13	0,002	0,5	0,001	1	0,006	4
	МИК ₉₀	0,5	0,008	2	0,005	2	0,008	4
<i>Microsporum spp.</i> n=34	МИК ₅₀	0,06	0,003	0,25	0,005	0,25	0,003	0,25
	МИК ₉₀	0,06	0,008	1	0,008	2	0,003	2

Примечание: ИТЗ – итраконазол, КЛЗ – клотримазол, ГРФ – гризеофульвин, ТЕР – тербинафин, ФЛК – флуконазол, АМФ – амфотерицин В, НИС – нистатин.

Как следует из приведенных в таблице данных, степень выраженности ингибирующего эффекта различных противогрибковых средств варьировала в широких пределах в зависимости от рода дерматофита. Все исследованные противогрибковые средства, за исключением нистатина, проявляли активность в отношении клинических изолятов дерматофитов в относительно низких концентрациях. Диапазон значений МИК₉₀ для дерматофитов различных родов составил 0,003-4 мкг/мл. Среди противогрибковых средств наибольшую активность в отношении клинических изолятов *Trichophyton spp.* и *Microsporum spp.* проявили амфотерицин В, показатель МИК₉₀ которого составил 0,003 мкг/мл и 0,008 мкг/мл, соответственно, клотримазол (МИК₉₀ составил 0,008 мкг/мл и

0,003 мкг/мл соответственно), тербинафин (МИК₉₀ составил 0,005 мкг/мл и 0,008 мкг/мл соответственно). Значительно меньшей активностью в отношении клинических изолятов *Trichophyton spp.* и *Microsporum spp.* обладали нистатин (МИК₉₀ составил 4,0 мкг/мл и 2,0 мкг/мл соответственно), гризеофульвин (МИК₉₀ составил 2,0 мкг/мл и 1,0 мкг/мл соответственно) и флуконазол (МИК₉₀ составил 2,0 мкг/мл для дерматофитов обоих родов).

Заключение. На основании полученных в результате проведенного исследования данных можно заключить, что в активности отдельных противогрибковых средств в отношении разных родов дерматофитов присутствуют выраженные различия, что необходимо учитывать при назначении этиотропной терапии пациентам с дерматофитиями. Так, было показано, что тербинафин, амфотерицин В, итраконазол проявляют более выраженную активность в отношении клинических изолятов грибов-дерматофитов, что не коррелирует с данными мировой научной литературы [8-10] и, вероятно, является региональной особенностью возбудителей дерматофитий, циркулирующих в Республике Беларусь. Таким образом, для повышения эффективности применяемых схем лечения пациентов с дерматомикозами, предпочтительным представляется включение в них таких антимикотиков, как тербинафин, итраконазол, амфотерицин В. В то же время, нистатин, гризеофульвин и флуконазол, как средства, проявившие наименьшую активность в отношении клинических изолятов возбудителей дерматофитий, не следует назначать для лечения грибковых инфекций у пациентов в качестве средства выбора для монотерапии или основного действующего вещества в препаратах при использовании комбинированных схем лечения микозов.

Разработка и внедрение в практику микробиологических лабораторий методов и алгоритмов определения чувствительности дерматофитов к противогрибковым средствам позволит осуществлять подбор антимикотиков для лечения пациентов с микозами, основываясь на принципах рациональной этиотропной терапии, а также сформировать представление о распространённости лекарственной устойчивости среди возбудителей дерматофитий.

Литература

1. На пути совершенствования лабораторной диагностики онихомикозов / А.Ю. Сергеев [и др.] // Успехи медицинской микологии. – 2006. – Т. 8. – С. 89-90.
2. Дерматовенерология: клинические рекомендации / под ред А.А. Кубановой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 320 с.
3. Кубанов, А.А. Результаты многоцентрового скринингового исследования этиологической структуры возбудителя онихомикоза в Российской Федерации / А.А Кубанов, Н.В. Фриго // Вестник дерматологии и венерологии. – 2007. – № 4. – С. 6-11.
4. Цыкин, А.А. Диагностика онихомикозов с использованием ПЦР / А.А. Цыкин, О.Л. Иванов, К.М. Ломоносов // Современная микология в России. – 2008. – Т. 2. – С. 464-465.
5. Котрехова, Л.П. Этиология, патогенез, клинические формы микоза стоп и основные методы его лечения / Л.П. Котрехова // РМЖ. – 2010. – Т. 18, № 2. – С. 770.
6. Веселов, А.В. Эмпирическая, превентивная и профилактическая терапия инвазивных микозов: современное состояние / А.В. Веселов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2009. – Т. 11, № 4. – С. 286-304.
7. Reforming the United Nations for peace and security [Electronic resource]: How to: perform antifungal susceptibility testing of microconidia-forming dermatophytes following the new reference EUCAST method E.Def 11.0, exemplified by *Trichophyton*. – Mode of access: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(20\)305267/fulltext?dgcid=raven_jbs_aip_email](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(20)305267/fulltext?dgcid=raven_jbs_aip_email). – Date of access: 20.10.2021
8. Reforming the United Nations for peace and security [Electronic resource]: *In vitro* susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. – Mode of access: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1348-0421.12109>. – Date of access: 26.10.2021.

9. Estimation of direct healthcare costs of fungal diseases in the United States / K. Benedict [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2019. – Vol. 68. – P. 1791-1797. doi: 10.1093/cid/ciy776.

10. Monod, M. Antifungal resistance in dermatophytes: Emerging problem and challenge for the medical community / M. Monod // J. Med. Mycol. – 2019. – Vol. 29. – P. 283-284. doi: 10.1016/j.mycomed.2019.100913.

ACTIVITY OF CERTAIN ANTIFUNGAL AGENTS AGAINST CLINICAL ISOLATES OF DERMATOPHYTOSES CAUSATIVE AGENTS

¹Zviagintseva K.B., ²Pugach V.V., ¹Kanashkova T.A., ²Dronina A.M.,
¹Butkevich V.V.

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

²Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

The study was carried out to determine the susceptibility to antifungal agents of clinical isolates of pathogenic fungi *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*, using the microdilution method in 96-well plates with determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) of antifungal agents. It was found that the degree of the inhibitory effect of different antifungal agents varied widely depending on the genus of dermatophyte. The data obtained indicate the need to develop and apply schemes for etiotropic therapy of dermatophytoses, considering the data on the susceptibility of clinical isolates of fungi.

Keywords: *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*, susceptibility, resistance, antifungal agents, minimum inhibitory concentration.

Поступила 27.12.2021

РАЗРАБОТКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ГЕНОДИАГНОСТИКИ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* «*CHLAMYDIA TRACHOMATIS*-ПЦР/РВ»

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

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

Резюме. Разработан отечественный набор реагентов «*Chlamydia trachomatis*-ПЦР/РВ» с детекцией продуктов реакции методом ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК *C. trachomatis* и проведена оценка его аналитических характеристик. Сконструированная ПЦР тест-система способна к обнаружению различных циркулирующих генетических вариантов *C. trachomatis* за счет одновременной амплификации двух независимых генетических мишеней – участка хромосомальной ДНК и ДНК криптической плазмиды в геноме хламидий. Использование высокочувствительного и специфичного ПЦР-набора «*Chlamydia trachomatis*-ПЦР/РВ» в практическом здравоохранении позволит оптимизировать диагностику хламидийной инфекции.

Ключевые слова. *Chlamydia trachomatis*, ПЦР, хламидиоз, тест-система.

Введение. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является наиболее используемым и достоверным методом лабораторной диагностики большинства инфекционных заболеваний. Он характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, воспроизводимостью, быстротой и автоматизацией, унификацией и стандартизацией.

В соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 20.05.2009 № 486, основным способом диагностики хламидийной инфекции являются методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), к числу которых относится ПЦР [1]. В то же время, существует большое генетическое разнообразие возбудителя хламидиоза, что осложняет диагностику. К ним относятся «шведский» (nvCT), «финский» варианты, а также бесплазмидные штаммы *Chlamydia trachomatis*.

Криптическая плазида до недавнего времени являлась основной мишенью в геноме хламидий для детекции многими коммерческими ПЦР-диагностикумами. Ее основным преимуществом является многокопийность – одновременное присутствие до 15 копий в расчете на клетку. В 2006 г. в Швеции был выявлен «новый вариант» *C. trachomatis* (nvCT) с делецией размером 377 пар нуклеотидов в *orf1* фрагменте криптической плазмиды. Этот фрагмент использовался в качестве целевой мишени практически во всех тест-системах, используемых для ПЦР-диагностики в Швеции. Поскольку продолжительное время инфекция не была диагностирована, «шведский» вариант хламидий получил достаточно широкое распространение среди населения и оказал негативный социальный и экономический эффект. По данным разных исследователей, доля этих штаммов составляет в Швеции от 20 до 65% [2]. Другой немаловажной проблемой для диагностики также является существование бесплазмидных штаммов *C. trachomatis*, встречающихся от 1 до 16% случаев [3]. Следствием этого является большая вероятность получения ложноотрицательных результатов при тестировании набором, в основе которого лежит детекция исключительно плазмидного фрагмента ДНК хламидийного генома. Такие генетические вариации возбудителя положили основу для поиска иных, более надежных целевых последовательностей в геноме возбудителя.

Так, в качестве наиболее оптимальной мишени используют хромосомные гены, вовлеченные в основной метаболизм, либо кодирующие антигены. К ним относятся рибосомальные гены или гены, кодирующие белки наружной мембраны [3]. Однако, в 2019 г. обнаружен «финский» вариант *C. trachomatis* (FI-nvCT) с мутацией в гене 23s рРНК [4].

Этот локус использовался в качестве целевой мишени в хламидийном геноме для дуплексной тест-системы, которая применялась для диагностики хламидиоза и гонореи в Финляндии, Норвегии и Швеции. Подобно «шведскому, «финский» вариант, оставаясь не диагностированным, также имеет тенденцию к расширению его географического ареала.

Существование мутаций в диагностически значимых участках генома возбудителя побуждает к необходимости постоянного мониторинга за циркулирующими штаммами *C. trachomatis* для получения информации о молекулярно-биологической гетерогенности возбудителя. Кроме того, для эффективной диагностики и предотвращения распространения *C. trachomatis* необходимо разрабатывать новые и совершенствовать используемые наборы реагентов для ПЦР-анализа.

Цель работы – разработать отечественную диагностическую тест-систему, позволяющую выявлять ДНК «диких», бесплазмидных, мутантных штаммов *C. trachomatis* методом ПЦР в режиме реального времени.

Материалы и методы исследования. Подбор специфических праймеров и зондов формата TaqMan к диагностическим генам-мишеням *C. trachomatis*, определенным как стабильно детектируемые (хромосомный участок гена, кодирующего 16S рРНК и участок плазмиды *orf8*) проводили с использованием программного обеспечения Oligo Analyzer Tool на сайте eu.idtdna.com, программы «Vector NTI», алгоритма BLAST и базы данных GenBank NCBI. Выбор соответствующих олигонуклеотидов производился с учетом основных критериев, влияющих на дальнейшую амплификацию (длина, температура плавления, процентное соотношение GC-оснований, отсутствие димеров и шпилек).

Контрольные образцы на основе рекомбинантных плазмидных ДНК, содержащих диагностически значимые фрагменты ДНК *C. trachomatis*, получали по методике, описанной ранее [5].

Для получения внутреннего контрольного образца (ВКО) с целью контроля этапов экстракции и амплификации, использовали рекомбинантную плазмидную ДНК с клонированной последовательностью фрагмента гена *egfp* (enhanced green fluorescent protein). Также подбирали праймеры и гибридационную пробу для амплификации ВКО.

Подбор приемлемого соотношения количества праймеров и гибридационных зондов, а также необходимого количества матрицы, определения общего объема реакционной смеси проводили опытным путем. Оптимальную температуру отжига праймеров определяли с использованием градиента температур в диапазоне от 45°C до 60°C. В качестве ДНК-матрицы при проведении ПЦР использовали как полученные положительные контрольные образцы, так и биологические пробы, содержащие ДНК *C. trachomatis*.

ПЦР-амплификацию осуществляли на приборах iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) и «Rotor Gene Q» (Qiagen (Германия) с использованием олигонуклеотидов, синтезированных ООО «АртБиоТех» (Республика Беларусь). Состав реакционной смеси включал 5 мкл 10xTaq-буфера, 3 мкл 50mM MgCl₂, 1 мкл дНТФ (10 мМ каждого), 2 ед. ArtTaq ДНК-полимеразы (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь), праймеры для амплификации фрагмента гена *orf8* плазмиды – 15 пмоль/мкл прямого (СТ F) и 15 пмоль/мкл обратного праймера (СТ R), праймеры для амплификации фрагмента гена 16S рРНК – 7,5 пмоль/мкл прямого (16SCT F) и 7,5 пмоль/мкл обратного праймера (16SCT R), праймеры для амплификации ДНК ВКО – 7,5 пмоль/мкл прямого (214 F) и 7,5 пмоль/мкл обратного праймера (309 R), по 10 пмоль/мкл зонда CT probe и 16SCT probe и 5 пмоль/мкл зонда 234FAM, 10 мкл ДНК, деионизованная вода до конечного объема 50 мкл. Режим амплификации составлял: 95°C – 3 мин; 95°C – 20 с, 58°C – 20 с (регистрация флуоресцентного сигнала по каналу ROX и FAM), 72°C – 20 с.

Определение диагностической чувствительности и специфичности разработанного набора реагентов проводили с использованием образцов ДНК, выделенных из биологического материала, заведомо содержащего *C. trachomatis* (n=37) и не содержащего *C. trachomatis* (n=54). Экстракция всех образцов проводилась с добавлением ВКО. Наличие/отсутствие возбудителя урогенитального хламидиоза в образцах подтверждено с использованием коммерческого ПЦР-набора «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis*» (АО «Вектор-Бест», Российская Федерация) и с помощью выделения возбудителя в культуре клеток.

Подсчитывали абсолютное количество истинноположительных, истинноотрицательных, ложноположительных и ложноотрицательных результатов ПЦР при использовании разработанного набора.

Диагностическую специфичность набора реагентов определяли по формуле 1 [6]:

$$ДС = \frac{ИО}{ИО + ЛП} \cdot 100\%(1),$$

где ДС – диагностическая специфичность,
ИО – истинноотрицательные результаты теста,
ЛП – ложноположительные результаты теста.

Диагностическую чувствительность набора реагентов определяли по формуле 2 [6]:

$$ДЧ = \frac{ИП}{ИП + ЛО} \cdot 100\%(2),$$

где ДЧ – диагностическая чувствительность,
ИП – истинноположительные результаты теста,
ЛО – ложноотрицательные результаты теста.

После определения диагностической чувствительности и специфичности рассчитывали диагностическую эффективность по формуле 3 [6]:

$$ДЭ = \frac{ИП + ИО}{ИП + ЛП + ИО + ЛО} \cdot 100\%,$$

где ДЭ – диагностическая эффективность,
ИП – истинноположительные результаты теста,
ИО – истинноотрицательные результаты теста,
ЛП – ложноположительные результаты теста,
ЛО – ложноотрицательные результаты теста.

Определение аналитической чувствительности проводилось с использованием рекомбинантных плазмидных ДНК, содержащих в своем составе диагностические фрагменты генома *C. trachomatis* (участок плазмидного гена *orf8* и хромосомного гена 16S рРНК), в разведениях от 10^{-1} до 10^{-10} что соответствует от $1 \cdot 10^{10}$ до 10 копиям плазмиды. Образцы получены путём 10-кратного титрования плазмидной ДНК известной концентрации. Проводили ПЦР сначала с одной парой праймеров, а затем с двумя.

При оценке аналитической специфичности в качестве ДНК матрицы использовали 10 мкл образца, содержащего ДНК одного из следующих видов: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, вирус простого герпеса 1 и 2 типа, цитомегаловирус, вирус папилломы человека 16 типа, вирус Эпштейна-Барр), *Chlamydomydia pneumoniae*.

Результаты исследований и обсуждение. Дизайн набора реагентов для генодиагностики различных циркулирующих генетических вариантов *C. trachomatis* включает одновременную детекцию двух независимых генетических мишеней – участков хромосомальной ДНК и ДНК криптической плазмиды. В качестве диагностически значимых последовательностей генома *C. trachomatis* были выбраны два гена-мишени: участок

гена, кодирующего 16S рРНК, расположенный на хромосоме, и участок плазмиды *orf8*, наиболее стабильно обнаруживаемый в плазмидном репликоне клинических изолятов.

С целью оптимизации условий ПЦР подобранные олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды были использованы для определения возможности совмещения двух систем праймеров и зондов в ПЦР с одновременной детекцией двух мишеней. В ходе проведения исследований применяли разные концентрации компонентов реакционной смеси: количество праймеров и зондов, исследуемой матрицы, а также варьировали температурный режим отжига праймеров.

В результате экспериментов по оценке влияния количества в реакционной смеси праймеров и гибридизационных зондов было установлено их оптимальное соотношение при совместной амплификации для одновременной детекции двух мишеней *S. trachomatis*. Определено, что уменьшение в два раза количества праймеров (7,5 пмоль), направленных на амплификацию участка гена, кодирующего 16S рРНК по сравнению с олигонуклеотидами, амплифицирующими плазмидную мишень (15 пмоль), является оптимальным для устойчивого протекания ПЦР с образованием детектируемого количества продуктов реакции. Выбранное количество зондов – 10 пмоль, обеспечивает приемлемый уровень накопления флуоресцентного сигнала.

Количество матрицы, необходимое для оптимальной ПЦР реакции, зависит от источника ДНК, степени ее очистки, длины получаемого ампликона и др. Слишком высокая концентрация ДНК-матрицы в реакционной смеси может ингибировать ПЦР и приводить к неспецифической амплификации. В случае урогенитальной хламидийной инфекции чаще всего наблюдается низкое содержание ДНК в пробе из-за недостаточного количества эпителиальных клеток вследствие неправильного забора биоматериала или персистенции возбудителя без активной продукции полноценных элементарных частиц нового поколения. Были проведены сравнительные эксперименты с добавлением в реакционную смесь 5 либо 10 мкл матрицы. В результате эксперимента показано, что при добавлении 10 мкл матрицы не происходило ингибирования ПЦР и пересечение пороговой линии кривой флуоресценции во всех пробах происходило раньше, чем при добавлении 5 мкл образца.

Далее опытным путем был установлен оптимальный объем реакционной смеси. Проведение ПЦР с 2 парами праймеров и 2 зондами в объеме реакционной смеси 25 мкл приводит к более низкому выходу специфических продуктов амплификации. Напротив, показано, что в объеме 50 мкл обеспечивается наиболее эффективная наработка искомым ампликонов.

Важным параметром, определяющим чувствительность и специфичность ПЦР, является температура отжига праймеров. Определение оптимальных температурных условий реакции первоначально проводили для моноплексных реакций с использованием градиента температур отжига праймеров в диапазоне 45-60°C. Наибольшая варибельность величины флуоресцентного сигнала в зависимости от температуры наблюдалась при амплификации фрагмента гена *orf8* плазмиды, тогда как накопление продукта амплификации в случае хромосомного гена, кодирующего 16S рРНК, в указанном температурном интервале характеризовалось близкими значениями уровня флуоресценции (рисунок 1).

При подборе оптимальной температуры отжига для ПЦР с одновременной детекцией двух мишеней *S. trachomatis* использовали температурный режим на соответствующей стадии амплификации в более узком диапазоне: 50-58°C. Наилучшее соотношение уровней флуоресценции и максимальная эффективность реакции в таком формате наблюдалась при температуре отжига 58°C. Амплификация при понижении температуры приводила к появлению не равнозначных по интенсивности свечения ампликонов, что указывало на предпочтение амплификации одного фрагмента в ущерб другому.

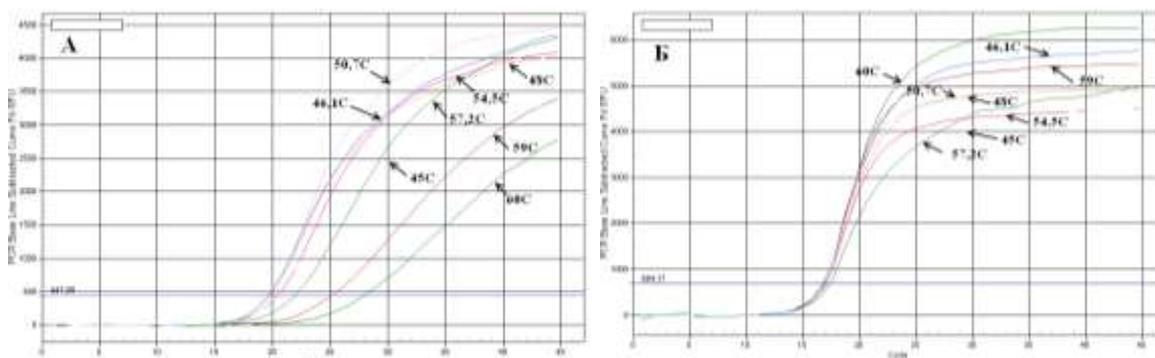
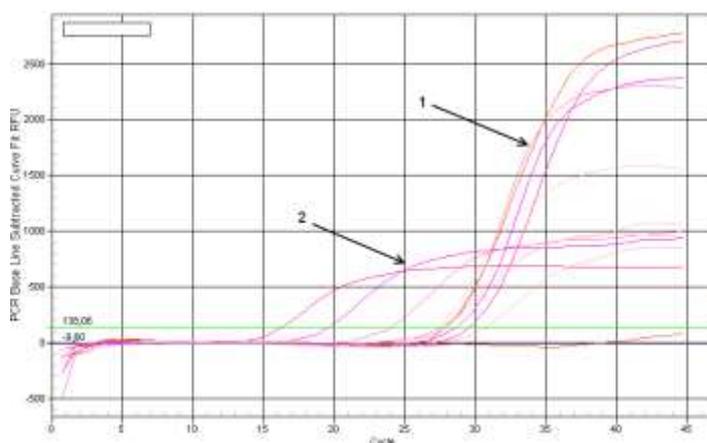


Рисунок 1. – Амплификация фрагмента гена *orf8* плазмиды (А) и хромосомного гена, кодирующего 16S рРНК (Б) в ходе ПЦР с детекцией сигнала в режиме реального времени при градиенте температуры отжига праймеров 45-60°C

Далее исследовали возможность амплификации целевой мишени ВКО в мультиплексной системе с параметрами реакции, ранее определенными для системы с двумя парами праймеров. Для этого по 10 мкл ВКО, содержащего от $3,7 \cdot 10^8$ до $3,7 \cdot 10^4$ ГЭ/мл, добавляли на этапе экстракции в исследуемые образцы биологического материала, содержащие *C. trachomatis*. С выделенной тотальной ДНК проводили ПЦР с тремя парами праймеров – 2 пары праймеров и зонды для детекции целевых мишеней в геноме *C. trachomatis*, и пара олигонуклеотидов и гибридизационная проба для детекции ДНК ВКО. Регистрацию флуоресцентного сигнала измеряли по каналам ROX для детекции ДНК патогена, и FAM – свидетельствующего о накоплении продукта амплификации ВКО. Нарботка целевого участка ДНК ВКО происходила во всех пробах при заданных параметрах реакции и практически не зависела от концентрации ВКО в реакции (рисунок 2).



1 – амплификация целевых мишеней *C. trachomatis*;
2 – амплификация ВКО от $3,7 \cdot 10^8$ до $3,7 \cdot 10^4$ ГЭ/мл

Рисунок 2. – Совместная амплификация ДНК *C. trachomatis* и ВКО с детекцией в режиме реального времени по каналам ROX и FAM соответственно

При проведении многокомпонентного ПЦР-анализа необходимо было убедиться в том, что количество ВКО, добавленное в реакцию, не конкурирует за компоненты среды со специфическими генами-мишенями и не ингибирует накопление специфических продуктов. По результатам исследований, оптимальным установлено $3,7 \cdot 10^6$ ГЭ/мл ВКО, при котором регистрировалось среднее значение порогового цикла ($C_t=24$).

После оптимизации условий постановки ПЦР в режиме реального времени были определены аналитические характеристики разрабатываемого комплекта реагентов: диагностическая чувствительность и специфичность, аналитическая чувствительность и специфичность и диагностическая эффективность.

В результате анализа данных аналитической чувствительности отмечено, что образование специфических продуктов амплификации плазмидного фрагмента гена *orf8* наблюдалось в разведениях до 10^{-9} что соответствует 2 ГЭ в реакции. Амплификация хромосомного участка гена 16s рРНК происходила во всех образцах, что свидетельствует о способности обнаружения в образце единичных копий анализируемой ДНК. В реакции с одновременным выявлением двух мишеней в геноме *C. trachomatis* определена способность к детекции проб, содержащих $1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл.

Экспериментально установлено отсутствие неспецифических реакций при тестировании образцов ДНК вирусов и бактерий, потенциально вызывающих инфекции урогенитального тракта и изолята близкородственного вида, входящего в семейство *Chlamydiaceae* – *Chlamydophila pneumoniae*.

При определении диагностической чувствительности разработанного комплекта реагентов «*Chlamydia trachomatis*-ПЦР/РВ», в 36 из 37 положительных образцов регистрировалось накопление флуоресцентного сигнала, свидетельствующее об амплификации целевых мишеней патогена. Рассчитанный показатель диагностической чувствительности составил 97%.

Проводили определение диагностической специфичности набора. Исследование 54 заведомо отрицательных в отношении *C. trachomatis* образцов показало отсутствие специфических продуктов амплификации диагностических мишеней патогена при использовании разработанной ПЦР-тест-системы, что говорит о 100% диагностической специфичности.

После определения диагностической чувствительности и специфичности определяли диагностическую эффективность. Данный показатель для набора реагентов «*Chlamydia trachomatis*-ПЦР/РВ» определен на уровне 98,9%.

Заключение. Разработана отечественная ПЦР тест-система для лабораторной диагностики хламидиоза «*Chlamydia trachomatis*-ПЦР/РВ» с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени. Использование в качестве генов-мишеней плазмидного (участок гена *orf8*) и хромосомного (участок гена 16S рРНК) фрагмента генетического материала *C. trachomatis* позволит снизить процент ложноотрицательных результатов исследования при диагностике хламидиоза, вызываемого мутантными вариантами *C. trachomatis*.

Набор реагентов «*Chlamydia trachomatis*-ПЦР/РВ» характеризуется высокими аналитическими характеристиками: диагностическая специфичность – 100%, диагностическая чувствительность – 97%, аналитическая чувствительность – $1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл и отсутствием неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК вирусов и бактерий, потенциально вызывающих инфекции урогенитального тракта и изолята близкородственного вида, входящего в семейство *Chlamydiaceae* – *Chlamydophila pneumoniae*, Рассчитанная диагностическая эффективность теста установлена на уровне 98,9%.

Создание и усовершенствование современных, высокочувствительных и специфичных ПЦР-диагностикумов с учетом актуальных знаний о возбудителе имеет важное значение для практического здравоохранения. Использование сконструированной диагностической ПЦР тест-системы «*Chlamydia trachomatis*-ПЦР/РВ» позволит повысить эффективность выявления всех циркулирующих в Республике Беларусь геновариантов *C. trachomatis* и, как следствие, уровень диагностики урогенитальной хламидийной инфекции, а также обеспечит валютосбережение и импортозамещение.

Литература

1. Инструкция по лабораторной диагностике хламидиоза [Электронный ресурс] : приказ М-ва здравоохранения Респ. Беларусь 20 мая 2009 г., № 486 / Гродненский областной кожно-венерологический диспансер. – Режим доступа: <http://gokvd.grodno.by/files/doc/MZRB-Prikaz-2009-05-20-486.pdf>. – Дата доступа: 18.10.2021.
2. 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.
3. Актуальные аспекты лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции / Н.В. Зур [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2016. – Т. 11, № 2. – С. 16-32.
4. 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 / К. Hokyнар [et al.] // *Microorganisms.* – 2019. – Vol. 7, No. 8. – P. 227.
5. Получение генно-инженерных конструкций, содержащих диагностически значимые фрагменты генома *Chlamydia trachomatis* / Е.Г. Фомина [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В.А. Горбунова. – Минск, 2020. – Вып. 13. – С. 109-114.
6. Валидация молекулярно-биологических методов лабораторной диагностики / С.А. Костюк // *Медицинские новости.* – 2012. – № 4. – С. 16-19.

DEVELOPMENT AND ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF "CHLAMYDIA TRACHOMATIS-PCR/RT" TEST KIT FOR CHLAMYDIA TRACHOMATIS GENODIAGNOSTICS

Kapustina Yu.M., Rubanik L.V., Fomina E.G. Grigorieva E.E.

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

A domestic test kit "*Chlamydia trachomatis*-PCR/RT" has been developed with the detection of reaction products by real-time PCR to detect the DNA of *C. trachomatis* and its analytical characteristics have been evaluated. The designed PCR test system was capable of detecting various circulating genetic variants of *C. trachomatis* due to simultaneous amplification of two independent genetic targets – a part of chromosomal DNA and DNA of a cryptic plasmid in the chlamydia genome. The use of a highly sensitive and specific PCR kit "*Chlamydia trachomatis*-PCR/RT" in practical healthcare will optimize the diagnosis of chlamydia infection.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, PCR, chlamydia, test kit.

Поступила 04.11.2021

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К КОМБИНАЦИЯМ АНТИБИОТИКОВ ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* НА ФОНЕ ПАНДЕМИИ COVID-19

Карпова Е.В., Тапальский Д.В.

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

Резюме. Выполнена детекция генов карбапенемаз и определена чувствительность к комбинациям антибиотиков для госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов в 2016, 2017 и 2020 гг. Обнаружена ко-продукция двух сериновых карбапенемаз ОХА-48 и КРС, которая ранее не встречалась в Беларуси. Выполнено высокопроизводительное секвенирование для 4 штаммов *K. pneumoniae* и описаны основные молекулярно-генетических механизмы антибиотикорезистентности.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, карбапенемазы, инфекция COVID-19, Беларусь.

Введение. Пандемия COVID-19 оказывает огромную нагрузку на систему здравоохранения по всему миру. Тяжелобольные пациенты отделений реанимации и интенсивной терапии подвержены повышенному риску присоединения вторичных бактериальных инфекций, вызванных госпитальными штаммами, которые требуют назначения антибактериальной терапии [1]. *Klebsiella pneumoniae* является наиболее частым возбудителем инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), и выделяется у пациентов с пневмонией, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2 [2]. Частота бактериальных инфекций у пациентов с COVID-19 невелика, потому нерациональное назначение антимикробных лекарственных средств может способствовать селекции устойчивых штаммов энтеробактерий [3].

Цель исследования – оценить в динамике чувствительность к комбинациям антибиотиков госпитальных штаммов *K. pneumoniae* и описать молекулярно-генетические механизмы устойчивости.

Материалы и методы исследования. В исследование включены госпитальные штаммы *K. pneumoniae* с множественной и экстремальной устойчивостью к антибиотикам, выделенные от пациентов, госпитализированных в отделение анестезиологии и реаниматологии и другие отделения Витебской областной клинической больницы. Отбор материала осуществлялся в микробиологической лаборатории на протяжении трех временных интервалов (февраль-апрель 2016 г., октябрь-декабрь 2017 г., апрель-май 2020 г.) при проведении рутинных микробиологических исследований.

Все штаммы имели устойчивость к карбапенемам, обусловленную продукцией карбапенемаз. Всего отобрано 37 штаммов (2016 г. – 12, 2017 г. – 10, 2020 г. – 15), при этом все штаммы, отобранные в 2020 г., были выделены из мокроты или крови пациентов с инфекцией COVID-19. Идентификацию штаммов выполняли с использованием бактериологического анализатора АТВ Expression (bioMérieux, Франция) на планшетах ID 32E. Реидентификацию выделенных микроорганизмов и определение их чувствительности к 17 антибиотикам (ампициллину/сульбактаму, пиперациллину, цефуроксиму, цефуроксим аксетилу, цефиксиму, цефтриаксону, цефепиму, азтреонаму, меропенему, левофлоксацину, моксифлоксацину, миноциклину, тетрациклину, тигециклину, хлорамфениколу, колистину, триметоприму) проводили на анализаторе VITEK 2 Compact (bioMérieux, Франция) с использованием диагностических карт VITEK 2 GN и AST-XN-05 в соответствии с инструкциями производителя.

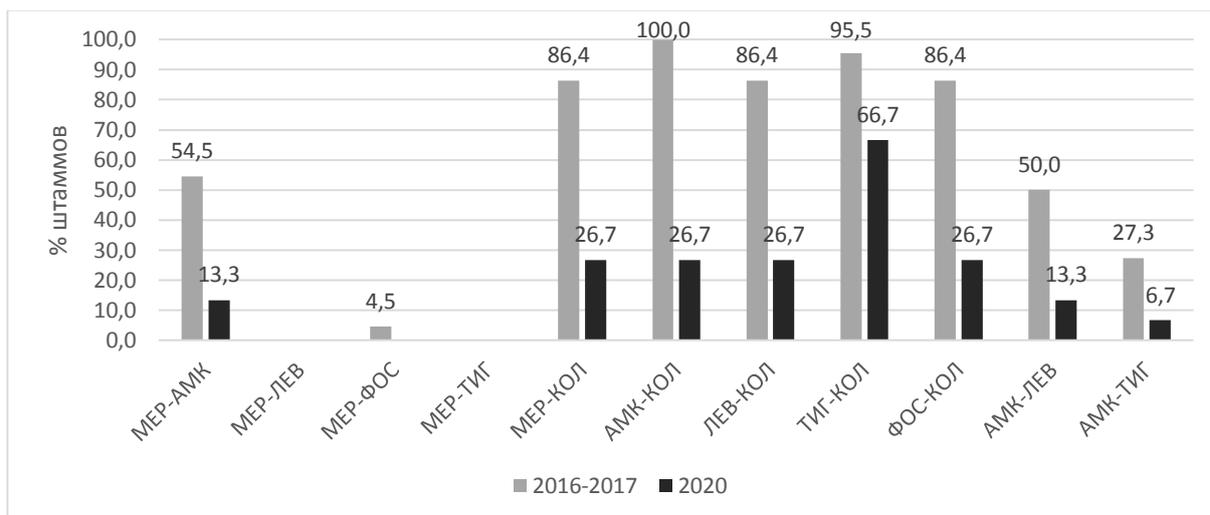
С использованием модифицированного метода тестирования бактерицидности различных комбинаций (MCBT – multiple combination bactericidal testing) определяли чувствительность к 11 комбинациям из двух антибиотиков [4, 5]. В составе комбинаций тестировали антибиотики, взятые в их фармакокинетических/ фармакодинамических (ФК/ФД) концентрациях: меропенем (8 мг/л), амикацин (16 мг/л), левофлоксацин (1 мг/л), фосфомицин (32 мг/л), тигециклин (0,5 мг/л), колистин (2 мг/л). Детекция генов сериновых карбапенемаз КРС и ОХА-48, а также металло-бета-лактамаз NDM, VIM и IMP выполнена методом ПЦР в реальном времени с использованием диагностических наборов «АмплиСенс MDR КРС/ОХА-48-FL» и «АмплиСенс MDR MBL-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Российская Федерация).

Дополнительно для четырех штаммов *K. pneumoniae* выполнено высокопроизводительное секвенирование (NGS). Препараты суммарной ДНК *K. pneumoniae* получали из чистых культур бактерий на основе СТАВ-протокола с использованием коммерческого набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Высокопроизводительное секвенирование выполнялось в геномном секвенаторе Ion PGM System (Thermo Fisher Scientific, США). Первоначальная обработка данных, поступающих от геномного анализатора, а также предварительное выравнивание, осуществлялись в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения Ion Torrent Suite v.4.1 (Thermo Fisher Scientific, США). Сборка и аннотация последовательностей, выполнены с помощью программного пакета Unipro UGENE v.37.0. Идентификацию сиквенс-типов и серогенотипов проводили с использованием международной базы данных Института Пастера (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella>). Обнаружение генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности, плазмидный профиль, осуществляли с использованием специализированных баз данных и веб-ресурсов, находящихся в открытом доступе (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>, <http://arpcard.mcmaster.ca>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты исследования и обсуждение. У всех штаммов выявлена резистентность к меропенему (МПК₅₀ 32 мг/л, МПК₉₀ 128 мг/л), обусловленная продукцией карбапенемаз. Продуцентами карбапенемазы КРС являлись все штаммы, выделенные в 2016 г. Среди штаммов, выделенных в 2017 году, продуцентами карбапенемазы КРС являлись только два штамма, оставшиеся 8 штаммов продуцировали карбапенемазу ОХА-48. Все выделенные в 2020 г. штаммы являлись продуцентами ОХА-48, при этом у одного штамма (*K. pneumoniae* 2564) выявлена ко-продукция карбапенемаз ОХА-48 и КРС.

Отмечено значительное сокращение чувствительности к комбинациям из двух антибиотиков, в том числе к комбинациям с включением колистина (меропенем-колистин и левофлоксацин-колистин с 84,6% до 26,7%, амикацин-колистин со 100% до 26,7%, тигециклин-колистин с 95,5% до 66,7%, рисунок).

У двух штаммов *K. pneumoniae* 420 и 9068, выделенных в 2016 и 2017 гг., выявлена принадлежность к одному сиквенс-типу (ST395), также они имели сходные наборы плазмид и детерминант вирулентности, что может свидетельствовать об их клональном происхождении (таблица). Данные штаммы выделены из различных видов биологического материала (*K. pneumoniae* 420 – кровь, *K. pneumoniae* 9068 – отделяемое раны) с интервалом в 1 год и 8 месяцев от пациентов, госпитализированных в различные отделения (отделение анестезиологии и реанимации, хирургическое отделение). Оба штамма содержали гены карбапенемазы *bla*_{КРС-2}.



МЕР – меропенем, АМК – амикацин, ЛЕВ – левофлоксацин, ФОС – фосфомицин,
ТИГ – тигециклин, КОЛ – колистин

Рисунок. – Чувствительность к комбинациям антибиотиков штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в 2016-2017 и 2020 гг., метод тестирования бактерицидности различных комбинаций

Выделенные в 2020 г. из мокроты пациентов с инфекцией COVID-19 штаммы *K. pneumoniae* 2564 и 3125 относились к различным сиквенс-типам – ST512 и ST23 соответственно. Оба штамма содержали ген карбапенемазы *bla_{OXA-48}*, штамм 2564 дополнительно содержал ген карбапенемазы *bla_{KPC-27}*. Принадлежность *K. pneumoniae* к ST23 часто ассоциируется с гипермукоидным фенотипом, высокой инвазивностью и повышенной патогенностью для человека [6]. Не смотря на принадлежность к серогенотипу K57, штамм *K. pneumoniae* 3125 ST23 имел классический (не гипермукоидный) фенотип. В его геноме не обнаруживались типичные для гипервирулентных клебсиелл гены *rmpA*, *kfu*, *allS*, *iucA*, *magA* и большая плаزمида вирулентности pLVK [7]. Штаммы *K. pneumoniae* 2564 и 3125 были выделены с интервалом в 20 дней от пациентов, госпитализированных в одном отделении (эндокринологическое отделение, перепрофилированное в инфекционное), соответственно на 28-е и на 8-е сутки от начала госпитализации.

У двух штаммов *K. pneumoniae* 420 и 9068, выделенных в 2016 и 2017 гг., выявлена принадлежность к одному сиквенс-типу (ST395), также они имели сходные наборы плазмид и детерминант вирулентности, что может свидетельствовать об их клональном происхождении (таблица). Данные штаммы выделены из различных видов биологического материала (*K. pneumoniae* 420 – кровь, *K. pneumoniae* 9068 – отделяемое раны) с интервалом в 1 год и 8 месяцев от пациентов, госпитализированных в различные отделения (отделение анестезиологии и реанимации, хирургическое отделение). Оба штамма содержали гены карбапенемазы *bla_{KPC-2}*.

Все штаммы, для которых выполнено высокопроизводительное секвенирование, обладали наличием генов β-лактамаз различных типов: TEM, CTX-M, SHV. Присутствие генов OXA-типа выявлено у всех штаммов, однако два из них (*K. pneumoniae* 420 и 9068) – без карбапенемазной активности (OXA-9). Обнаружены гены карбапенемаз β-лактамаз, способных гидролизовать карбапенемы и большинство других β-лактамовых антибиотиков. Штаммы *K. pneumoniae* 420 и 9068 содержали гены карбапенемазы *bla_{KPC}*, штамм *K. pneumoniae* 3125 – *bla_{OXA-48}*. Также у одного штамма выявлена ко-продукция карбапенемаз одновременно двух типов: *bla_{OXA-48}* и *bla_{KPC}*. Обнаруженная у штамма *K. pneumoniae* 2564 ко-продукция двух сериновых карбапенемаз OXA-48 и

КРС является крайне редким явлением и по данным ресурса AMR Map ранее не встречалась в Беларуси и России [8]. Наличие генов карбапенемаз различных типов не было связано с сиквенс-типами. У всех четырех штаммов, для выполнения NGS, выявлена устойчивость к карбапенемам. Минимальная подавляющая концентрация меропенема для штамма *K. pneumoniae* 420 – 128 мг/л, *K. pneumoniae* 9068 – ≥ 32 мг/л, *K. pneumoniae* 3125 – 16 мг/л, *K. pneumoniae* 2564 – 256 мг/л.

Таблица. – Генетические детерминанты антибиотикорезистентности и вирулентности госпитальных штаммов *K. pneumoniae*

Штамм		420	9068	3125	2564	
Сиквенс-тип (MLST)		ST 395	ST 395	ST 23	ST 512	
Серогенотип (ген <i>wzi</i>)		-	K-2	K-57	-	
Детерминанты антибиотикорезистентности	Карбапенемаза	OXA-48	-	-	+	+
		NDM	-	-	-	-
		KPC	2*	2	-	3, 27
	β-лактамы	<i>bla</i> TEM	+	+	-	+
		<i>bla</i> CTX-M	+	-	15	-
		<i>bla</i> SHV	-	31	1,33	182
		<i>bla</i> OXA	9	9	48	48
		<i>bla</i> LEN7	+	-	-	-
	Аминогликозиды	<i>aac</i> (6')	lb-cr	-	lb-cr	lb
		<i>rmt</i> F	-	-	+	-
		<i>aph</i> (3')	-	-	-	-
		<i>aad</i> A	-	-	-	1b
		<i>arm</i> A	-	-	-	-
	Фторхинолоны	<i>gyr</i> A	-	+	-	-
		<i>par</i> C	-	-	-	-
		<i>qnr</i>	S1, S9	S	B1	S
	Фосфомицин	<i>uhp</i> T	-	+	+	-
		<i>Fos</i> A	+	+	+	+
	Хлорамфеникол	<i>cat</i>	A1, B3, I	A1	A1	-
	Тетрациклины	<i>tet</i> (A)	+	+	-	-
	Сульфаниламиды	<i>sul</i>	1	1	-	-
	Триметоприм	<i>dfr</i> A	1	1	-	-
	Рифампицин	<i>arr</i>	-	-	2, 3	-
Макролиды	<i>mph</i> A	-	-	-	-	
	<i>msr</i> E	-	-	-	-	
Детерминанты вирулентности		<i>cva</i> C <i>fyu</i> A <i>tra</i> T	<i>cva</i> C <i>fyu</i> A <i>irp</i> 2 <i>iut</i> A <i>tra</i> T	<i>fyu</i> A <i>iro</i> N <i>irp</i> 2 <i>iuc</i> C <i>iut</i> A <i>ter</i> C <i>tra</i> T	<i>ccl</i> <i>cea</i> <i>iuc</i> C <i>iut</i> A <i>ter</i> C <i>tra</i> T	

*Примечание: наличие генетических детерминант обозначено «+», при наличии генетических вариантов они указаны внутри ячеек.

У 3 штаммов выявлены гены устойчивости к аминогликозидам *aac(6'0)Ib-cr* и *aac(6'0)Ib*, кодирующие производные аминогликозидацетилтрансферазы. Также у всех штаммов обнаружено присутствие генетических детерминант резистентности к фторхинолонам: *qnrS* у штаммов *K. pneumoniae* 420, 9068, 2564, *qnrB1* – у штамма *K. pneumoniae* 3125. Данные гены кодируют белки группы пентапептидных повторов, которые защищают ДНК-гиразу и топоизомеразу IV от ингибирования фторхинолонами и чаще всего являются плазмидоопосредованными, что способствует быстрому горизонтальному распространению в бактериальных популяциях [9].

Обнаружены гены, отвечающие за резистентность к фосфомицину. Ген *uhpT* обнаружен у двух штаммов (*K. pneumoniae* 9068 и 3125), в то время как ген *FosA* выявлен у всех четырех штаммов. Поэтому, данный антибиотик не может эмпирически использоваться в качестве препарата резерва для лечения инфекций, вызванных карбапенеморезистентными штаммами *K. pneumoniae* [10]. Штаммы *K. pneumoniae* 420, 9068 и 3125 содержали детерминанты резистентности к хлорамфениколу (*catA1*, *catB3*, *catI*). Выявлено сочетание генов резистентности к тетрациклину (*tetA*), сульфаниламидам (*sul*) и триметоприму (*dfpA*) у штаммов *K. pneumoniae* 420 и 9068. Детерминанты устойчивости к рифампицину (*arr2* и *arr3*) выявлены только у одного штамма *K. pneumoniae* 3125. Генетические детерминанты резистентности к макролидам (*mphA*, *msrE*) не обнаружены ни у одного штамма.

Нуклеотидные последовательности двух штаммов (*K. pneumoniae* 2564 и 3125) депонированы в базе данных GenBank (учетные записи Biosamples: SAMN19243679, SAMN19243880).

Заключение. Необоснованно широкое назначение антимикробных лекарственных средств у пациентов с инфекцией COVID-19 может стать значительным фактором дополнительной селекции госпитальных штаммов с экстремальной и полной резистентностью. Результаты полногеномного секвенирования штаммов демонстрируют многообразие механизмов антибиотикорезистентности и их уникальные сочетания у отдельных штаммов *K. pneumoniae*, приводящих к формированию устойчивости как к большинству широко использующимся антибиотикам (β -лактамам, аминогликозидам, фторхинолонам, фосфомицину и хлорамфениколу), так и к препаратам резерва (колистину).

Литература

1. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study / F. Zhou [et al.] // Lancet. – 2020. – Vol. 395, No. 10229. – P. 1054-1062.
2. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis / L. Lansbury [et al.] // J. Infect. – 2020. – Vol. 81, No. 2. – P. 266-275.
3. Association between antibiotic consumption and the rate of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria from China based on 153 tertiary hospitals data in 2014 / P. Yang [et al.] // Antimicrob. Resist. Infect. Control. – 2018. – Vol. 7. – Art. 137.
4. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* / B.J. Lang [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2000. – Vol. 162, No. 6. – P. 2241-2245.
5. Тапальский, Д.В. Чувствительность к комбинациям антибиотиков продуцирующих карбапенемазы нозокомиальных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в Беларуси / Д.В. Тапальский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018. – Т. 20, № 3. – С. 182-191.
6. Marr, C.M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new public health threat / C.M. Marr, T.A. Russo // Expert Rev. Anti-Infect. Ther. – 2019. – Vol. 17, No. 2. – P. 71-73.
7. Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / C. Struve [et al.] // mBio. – 2015. – Vol. 6, No. 4. – Art. E00630.

8. AMRmap: an interactive web platform for analysis of antimicrobial resistance surveillance data in Russia / A. Kuzmenkov [et al.] // Front Microbiol. – 2021. – Vol. 2. – P. 620002.

9. Jacoby, G.A. Plasmid-mediated quinolone resistance / G.A. Jacoby, J. Strahilevitz, D.C. Hooper // Microbiol. Spectr. – 2014. – Vol. 2, No. 5. – Art. 10.1128.

10. Silver, L.L. Fosfomycin: mechanism and resistance / L.L. Silver // Cold Spring Harb. Perspect. Med. – 2017. – Vol. 7, No. 2. – Art.a025262.

SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTIC COMBINATIONS OF HOSPITAL *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS AMID THE COVID-19 PANDEMIC

Karpova E.V., Tapalski D.V.

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Carbapenemase genes detection was performed and the dynamics of the susceptibility of hospital *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in 2016, 2017 and 2020 to antibiotic combinations was determined. Co-production of two serine carbapenemases OXA-48 and KPC, which previously had not been found in Belarus, was detected. Whole genome sequencing was performed for 4 *K. pneumoniae* strains. The main molecular genetic mechanisms of the formation of antibiotic resistance have been described.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, carbapenemases, COVID-19 infection.

Поступила 22.10.2021

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЙ ФРАГМЕНТ ГЕНОМА *WADDLIA CHONDROPHILA*, С ЦЕЛЬЮ КОНТРОЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Рубаник Л.В., Григорьева Е.Е.

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

Резюме. Получена рекомбинантная плазмида, содержащая в своем составе диагностически значимый участок 16S рРНК *Waddlia chondrophila*. Гибридная плазмида позволит осуществлять внутрилабораторный контроль специфичности каждой постановки полимеразной цепной реакции. Проведенная работа является фундаментом для организации молекулярно-биологической диагностики *Waddlia chondrophila* в нашей стране.

Ключевые слова: хламидияподобная бактерия, *Waddlia chondrophila*, полимеразная цепная реакция, положительный контрольный образец

Введение. Среди ряда факторов, приводящих к нарушению фертильности как у женщин, так и мужчин, наиболее частыми являются последствия инфекционно-воспалительных заболеваний мочеполовой системы. При этом, несмотря на прогресс и доступность медицинской помощи, этиологическая расшифровка инфекций удается только в 50-70% случаев [1-4].

Работы, проведенные в последние годы в странах Европы и Соединенных Штатах Америки, свидетельствуют о патогенетической значимости хламидияподобного микроорганизма (*Chlamydia-like organisms – CLOs*) – *Waddlia chondrophila* для репродуктивного здоровья человека. Вместе с широко распространенным близкородственным патогеном *Chlamydia trachomatis*, эта облигатная внутриклеточная бактерия, имеющая сходный двухэтапный цикл развития и 80-90% идентичность последовательности 16S рРНК с представителями семейства *Chlamydiaceae*, рассматривается как способная независимо вызывать нарушение фертильности у женщин и мужчин (бесплодие, выкидыш, замершую беременность, преждевременные роды) и инфицировать респираторный тракт новорожденных при прохождении через родовые пути зараженной женщины. При этом в 60-70% случаев инфекция протекает бессимптомно и в хронической форме [5-8].

Учитывая, что *Waddlia chondrophila* сложно выделить и культивировать, так как для этого необходимы специальные питательные среды, перевиваемые культуры клеток McCoy, Vero и др. или культуры амёб (*Acanthamoeba* spp.) и длительный период времени (не менее 5-7 дней), её выявление затруднено [9]. В этой связи ПЦР является методом выбора для детекции данного микроорганизма. Однако идентификация *Waddlia chondrophila* в настоящее время в нашей стране не осуществляется, так как отсутствует апробированная и валидированная методика ПЦР, разработанные диагностикумы.

Начальным этапом применения ПЦР и создания диагностических тест-систем вместе с подбором праймеров, оптимизацией состава реакционной смеси и условий реакции, является получение положительного контрольного образца, обеспечивающего постоянный контроль надежности результатов лабораторных исследований. Положительный контроль позволяет удостовериться, что все компоненты, входящие в состав реакционной смеси, обеспечивают нормальное прохождение реакции.

Цель исследования: получить рекомбинантную плазмидную ДНК, содержащую диагностически значимый фрагмент генома *Waddlia chondrophila*, для последующего использования в качестве положительного контрольного образца при постановке полимеразной цепной реакции.

Материалы и методы исследования. В работе использовали биологический материал, полученный из соскобного материала урогенитального тракта 203 женщин с репродуктивными нарушениями (бесплодие (n=154), выкидыш (n=49), средний возраст пациенток – 29±6 лет).

Выделение ДНК из клинических образцов проводили с использованием набора реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Российская Федерация) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Постановку ПЦР осуществляли на амплификаторе Gradient Palm Cyclor с использованием олигонуклеотидов, синтезированных ООО «АртБиоТех» (Республика Беларусь). Состав реакционной смеси: 5 мкл 10xTaq-буфера (АртБиоТех, Республика Беларусь), 2,0 мкл 50 mM MgCl₂, 1 мкл дНТФ (10 mM каждого), по 25 pM соответствующих праймеров WADCHOF: GAACGAAGTGTGCTCTTGAGT и WADCHOR: CCTCTTAGCACCATATCCGG [10], 0,4 мкл Taq-полимеразы ArtStart (5 ед/мкл) (АртБиоТех, Республика Беларусь), 10 мкл ДНК, деионизованная вода до конечного объема 50 мкл. Режим амплификации: 95°C – 2 мин; 95°C – 15 с, 60°C – 60 с, 72°C – 45 с (35 циклов).

Анализ продуктов амплификации проводили в 2,0% агарозном геле. В качестве электродного буфера использовали однократный TAE-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 фрагмента ДНК 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 37°C в течение 3 часов. В стерильные пробирки вносили полученную культуру клеток по 1,5 мл, охлаждали до +4°C и центрифугировали 10 мин на +4°C при 3000 об./мин, осадок ресуспендировали в 500 мкл 0,1 М CaCl₂. Образцы помещали на +4°C на 40 мин с последующим центрифугированием 10 мин при 3000 об./мин. Полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл 0,1 М CaCl₂. В 100 мкл суспензии компетентных клеток вносили 10 мкл лигазной смеси, выдерживали 30 мин при +4°C, тепловой шок проводили при 42°C 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 час. 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 37°C.

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

пересадения 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 обсуждение. С применением специфических праймеров методом ПЦР на матрице ДНК, выделенной из 2 клинических образцов (идентификационные номера № 4120 и № 5321), был получен амплификат диагностически значимого участка гена, кодирующего 16S рРНК *Waddlia chondrophila*, размером 123 пары нуклеотидов (п.н.) (рисунок 1).



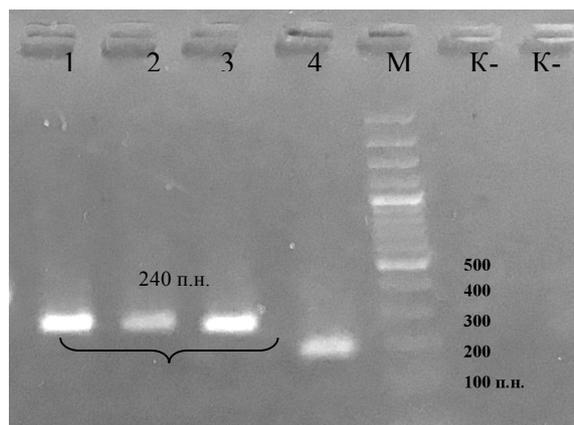
1, 2 – диагностически значимый фрагмент ДНК *W. chondrophila* в пробах № 4120 и № 5321; М – маркер молекулярных масс (100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, США)

Рисунок 1. – Электрофоретический анализ продуктов амплификации диагностически значимого фрагмента ДНК *Waddlia chondrophila*

В качестве вектора для клонирования специфического фрагмента ДНК была использована плаزمида 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.

Аmplифицированный ДНК-фрагмент очищали фенол-хлороформным методом. Клонирование осуществляли по «тупым» концам в полилинкер исходного вектора последовательно в две стадии, предполагающие подготовку фрагмента и его лигирование в вектор. Полученную лигазную смесь 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 37°C три колонии клеток рассеивали штрихом и выращивали при тех же условиях. Из бактериальных клеток *E. coli* выделяли плазмидную ДНК.

Наличие клонированного фрагмента в составе рекомбинантных плазмид определяли методом ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов реакции с использованием праймеров pJET1.2 Forward и pJET1.2 Reverse, ограничивающих область вставки в использованном векторе. Присутствие амплификата заданного размера (123 п.н. + 117 п.н. = 240 п.н.) при отсутствии такового для отрицательного контрольного образца свидетельствовало о наличии в составе гибридной плазмидной ДНК диагностически значимого фрагмента 16S рРНК *Waddlia chondrophila* (рисунок 2).



1-3 – рекомбинантные плазмидные ДНК, содержащие фрагмент генома *Waddlia chondrophila*; К- – отрицательный контроль; М – маркер молекулярных масс (100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, США)

Рисунок 2. – Оценка наличия специфического фрагмента генома *Waddlia chondrophila* в составе рекомбинантных плазмидных ДНК методом ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов реакции

Специфичность клонированного фрагмента в составе рекомбинантной плазмидной ДНК была подтверждена методом секвенирования. Результаты сравнительного анализа полученной в результате секвенирования нуклеотидной последовательности с последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank, показали, что клонированный фрагмент на 99,25% совпадает с референс-последовательностью из базы данных, что свидетельствует о генетической идентичности исследованного ДНК-участка с *Waddlia chondrophila* штамм WSU 86-1044 (GenBank NR_028697.1).

Заключение. Осуществлена апробация ПЦР для обнаружения *Waddlia chondrophila*. Выявлено два положительных образца в группе женщин, имеющих в анамнезе выкидыш. Это может указывать на то, что лицам с нарушенной репродуктивной функцией наряду с обследованием на *Chlamydia trachomatis* рекомендуется исследование биологического материала на предмет выявления хламидияподобной бактерии *Waddlia chondrophila*. Методами генетической инженерии получена рекомбинантная плазмидная ДНК, содержащая диагностически значимый фрагмент 16S рРНК *Waddlia chondrophila*. Полученная гибридная плазида будет служить положительным контрольным образцом и обеспечит в дальнейшем внутрилабораторный контроль специфичности при постановке полимеразной цепной реакции.

Литература

1. Chlamydia related bacteria (*Chlamydiales*) in early pregnancy: community-based cohort study / F. Reid [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2017. – Vol. 23. – P. 119.e9-119.e.14.
2. Role of *Chlamydia trachomatis* and emerging *Chlamydia*-related bacteria in ectopic pregnancy in Vietnam / S. Hornung [et al.]. // Epidemiol. Infect. – 2015. – Vol. 143. – P. 2635-2638.
3. *Chlamydia trachomatis* and chlamydia-like bacteria: new enemies of human pregnancies / A. Ammerdorffer [et al.] // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2017. – Vol. 30, No. 3. – P. 289-296.
4. *Waddlia chondrophila* and male infertility / D. Baud [et al.] // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8. – P. 136.
5. Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae* / A. Taylor-Brown [et al.] // Pathog. Dis. – 2015. – Vol. 73. – P. 1-15.

6. The *Waddlia* genome: a window into chlamydial biology / C. Bertelli [et al.] // PLoSOne. – 2010. – Vol. 5. –e10890.
7. *Waddlia chondrophila* and *Chlamydia trachomatis* antibodies in screening infertile women for tubal pathology / S.P. Verweij [et al.] // Microbes Infect. – 2015. – Vol. 17. – P. 745-748.
8. *Waddlia chondrophila*, a *Chlamydia*-related bacterium, has a negative impact on human spermatozoa / D. Baud [et al.] // Hum. Reprod. – 2018. – Vol. 33, No. 1. – P. 3-10.
9. Kebbi-Beghdadi, C. Permissivity of Vero cells, human pneumocytes and human endometrial cells to *Waddlia chondrophila* / C. Kebbi-Beghdadi, O. Cisse, G. Greub // Microbes Infect. – 2011. – Vol. 13. – P. 566-574.
10. PCR-test for identification and species differentiation of *Waddlia chondrophila* / V.K. Zezekalo [et al.] // Sci. Messenger LNU Vet. Med. Biotechnol. Ser.: Veterinary Sci. – 2019. – Vol. 21, No. 93. – P. 143-148.

**OBTAINING RECOMBINANT PLASMID CONTAINING DIAGNOSTICALLY
SIGNIFICANT FRAGMENT OF *WADDLIA CHONDROPHILA* GENOME
TO CONTROL THE POLYMERASE CHAIN REACTION**

Rubanik L.V., Grigorieva E.E.

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

A recombinant plasmid containing a diagnostically significant region 16S rRNA *Waddlia chondrophila* was obtained. The hybrid plasmid will allow for in laboratory control of the specificity of polymerase chain reaction. The work carried out is the foundation for the organization of molecular biological diagnostics of *Waddlia chondrophila* in Belarus.

Keywords: Chlamydia-like bacteria, *Waddlia chondrophila*, polymerase chain reaction, positive control sample.

Поступила 04.11.2021

АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *TRICHOMONAS VAGINALIS* К МЕТРОНИДАЗОЛУ НА ОСНОВАНИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ГИДРОГЕНОСОМ ПРОСТЕЙШЕГО

Рубаник Л.В., Жукова Ю.С., Полещук Н.Н.

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

Резюме. Оценена распространенность анаэробной резистентности *Trichomonas vaginalis* к метронидазолу на основании экспрессии генов ключевых гидрогеносомальных ферментов простейшего – пируват ферредоксин оксидоредуктазы, ферредоксина, гидрогеназы и малатдегидрогеназы. Получены данные о гетерогенности белорусской популяции патогена в отношении восприимчивости к метронидазолу: 58,57% изолятов определены как чувствительные, 12,86% – слабочувствительные, 28,57% отнесены к устойчивым. Лабораторное тестирование с помощью ПЦР, отвечающее требованиям экспрессности, автоматизированности, высокой специфичности и чувствительности, является важным инструментом повышения эффективности противопротозойного лечения и персонализированного ведения пациентов.

Ключевые слова: *Trichomonas vaginalis*, резистентность, метронидазол, пируват ферредоксин оксидоредуктаза, ферредоксин, гидрогеназа, малатдегидрогеназа.

Введение. Трихомониаз – одно из наиболее распространенных инфекционных заболеваний мочеполового тракта, вызываемое урогенитальной трихомонадой. Инфекция ежегодно диагностируется не менее чем у 143 млн. человек на земном шаре [1, 2]. Усовершенствование методов лабораторной диагностики и постоянный мониторинг заболеваемости обуславливают тенденцию к постепенному уменьшению количества регистрируемых случаев. Так в 2019 г. заболеваемость в Республике Беларусь составляла 53,2 случая на 100 000 населения по сравнению с 56,2 в 2018 г. и 61,9 в 2017 г. соответственно. Тем не менее, в сопоставлении с заболеваемостью другими инфекциями, передаваемыми половым путем в 2019 г. (сифилис – 4,4; гонококковая инфекция – 8,2; хламидиоз – 43,8 случаев на 100 000 населения) эпидемиологическую ситуацию по трихомониазу можно считать неблагоприятной [3]. Сохранение высокого значения данного показателя свидетельствует о необходимости дальнейшей профилактической работы, усовершенствования лабораторной диагностики и стратегии лечения.

Немаловажной проблемой является персистентная трихомонадная инфекция и реинфекция, которые отмечаются у 5-31% лиц (преимущественно женщин) и чаще всего обусловлены склонностью к хронизации, инфицированием от непролеченного/нового зараженного партнера и лекарственной устойчивостью патогена [4, 5]. Для лечения трихомониаза в качестве основного лекарственного средства рекомендуется метронидазол [6]. Однако первый случай резистентности к метронидазолу был описан уже через 2 года после разрешения применения в практике этого лекарственного средства, т.е. в 1962 г. В настоящее время, по разным данным резистентность к метронидазолу повсеместно увеличивается и оценивается от 5% до 17% [2, 4, 7-9]. При этом опасность заключается в том, что все нитроимидазолы имеют аналогичные механизмы противопротозойной активности, и, следовательно, выявляющаяся устойчивость влагалищных трихомонад к метронидазолу часто коррелирует с устойчивостью возбудителя и к другим нитроимидазольным препаратам.

Для простейшего описаны два механизма резистентности: аэробный и анаэробный. Анаэробный механизм резистентности связывают с уменьшением или блокированием

активности гидрогеносомальных ферментов пируват ферредоксин оксидоредуктазы (pyruvate ferredoxin oxidoreductase – PFOR), ферредоксина (ferredoxin–FDX), гидрогеназы (hydrogenase – HYDR) и малатдегидрогеназы (malate dehydrogenase – MDH) простейшего. Как известно метронидазол и его производные попадают в клетку патогена посредством пассивной диффузии. Далее внутри простейшего метронидазол с помощью вышеуказанных гидрогеносомальных ферментов преобразуется в нитрорадикальную форму, которая и вызывает повреждение ДНК и как следствие – гибель простейшего. В случае снижения или утраты активности гидрогеносомальных ферментов нарушается процесс активации метронидазола. Аэробный путь резистентности происходит из-за нарушения поглощения кислорода, снижения оксидазной активности. Считают, что оба пути резистентности могут существовать независимо и взаимно дополняют друг друга при достижении простейшим абсолютной устойчивости к метронидазолу. Наиболее изучен в настоящее время анаэробный механизм резистентности патогена.

Многие годы золотым стандартом определения чувствительности у факультативного анаэроба *T. vaginalis* к метронидазолу является метод серийных разведений метронидазола в жидкой питательной среде. В качестве критерия оценки чувствительности используется минимальная ингибирующая концентрация (МИК), под которой понимают наименьшую концентрацию лекарственного средства, вызывающую иммобилизацию у 100% клеток трихомонад или минимальная летальная концентрация (МЛК), обеспечивающая лизис клеток простейшего [7-10]. Однако метод трудоемок, длителен и поэтому не получил широкого применения в практике.

С развитием молекулярной биологии и расширением фундаментальных знаний о патогене, все большее внимание привлекают молекулярно-биологические методы изучения явления устойчивости *T. vaginalis* к метронидазолу и его производным [2, 4, 7-9].

Цель работы – определить экспрессию генов ключевых ферментов гидрогеносом, детерминирующих резистентность *Trichomonas vaginalis* к метронидазолу.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования служили 70 изолятов *T. vaginalis*, которые были получены из мазков-соскобов урогенитального тракта мужчин и женщин.

Для определения экспрессии генов, детерминирующих чувствительность/устойчивость *T. vaginalis* к метронидазолу и его производным, первоначально выделяли РНК набором реагентов «Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реагентов «ОТ-1» (Синтол, РФ).

Аmplификацию осуществляли на амплификаторе GradientPalmCycler в объеме 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5 мкл 10xTaq-реакционного буфера; 0,2 мкл Taq полимеразы (5 ед/мкл) (ArtStart, АртБиоТех, РБ); 1,5 мкл MgCl₂ (50 мМ); 0,5 мкл дНТФ (каждый в концентрации 10 мМ); праймеры в конечной концентрации 25 пмоль каждый; 5 мкл ДНК образца; вода до конечного объема.

Для определения активности гена пируват ферредоксин оксидоредуктазы у изолятов *T. vaginalis* использовали набор праймеров со следующими последовательностями: PforF 5'-СТCGTTTGGGGTGCTACATT-3' и PforR 5'-СТGATCCCAAACCTTGAG-3'. Для детекции экспрессии гена ферредоксина набор праймеров: FerrF 5'-СТTGCTT-GCGCTATCACACT-3' и FerrR 5'-AAAGCGATTCATTTTGAATGТААСТ-3'. Определение активности гена гидрогеназы осуществляли с помощью набора праймеров: HydF5'-TGCACACGAAAGAAGGATGA-3' и HydR5'-TCGCATGGTGTATCTGGTAA-3', а для гена малатдегидрогеназы – MalF5'-CATCTGTAGCCTCCCAGTCC-3' и 5'-MalR ACGAGCAGCTTGTTCATCCT-3' [3]. Все праймеры производства ОДО «Праймтех», РБ.

Режим амплификации включал предденатурацию при 95°C – 5 мин, с последующими 35 циклами, состоящими из стадии денатурации 95°C – 30 с, отжига 55°C – 30 с и

элонгации 72°C – 60 с, финальной элонгации при 72°C – 5 мин. Анализ продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле с последующим 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 50 п.н. (M50BP, ОДО «Прайм-тех», РБ).

Результаты исследования и обсуждение. В текущем исследовании выбраны гены пируват ферредоксин оксидоредуктазы, ферредоксина, гидрогеназы и малатдегидрогеназы для определения анаэробного механизма резистентности изолятов *T. vaginalis* к метронидазолу.

Показано, что экспрессия гена пируват ферредоксин оксидоредуктазы была детектирована у 47 (67,14%) из 70 изолятов. Активность транскрипции гена не выявлена у 23 (32,86%) изолятов *T. vaginalis*. В отношении гена ферредоксина цифры были следующими: 40 (57,14%) позитивных и 30 (42,86%) отрицательных проб. Для гена малатдегидрогеназы аналогичные показатели составили 39 (55,71%) и 31 (44,29%) соответственно. Больше всего среди проанализированной выборки выявлено изолятов, у которых отсутствовала экспрессия гена, отвечающего за продукцию гидрогеназы – 34 (48,57%) (рисунок 1).

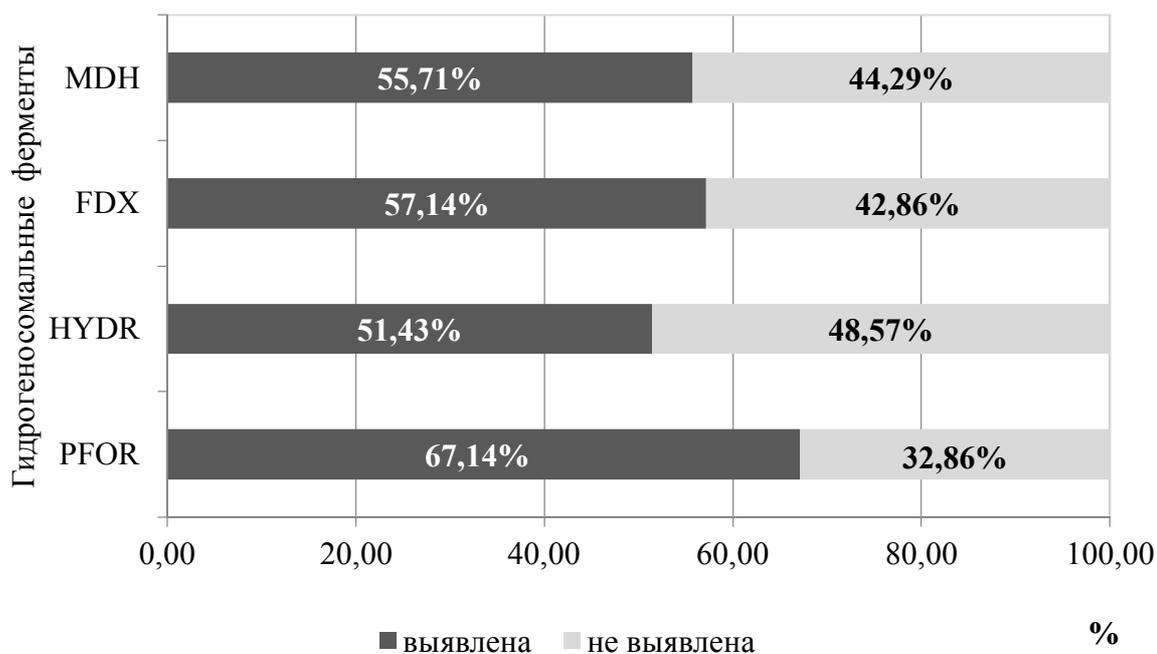


Рисунок 1. – Соотношение в исследованной выборке изолятов *T. vaginalis* с сохраненной/нарушенной экспрессией генов гидрогеносомальных ферментов: PFOR, FDX, HYDR, MDH

При этом комплексный анализ показал, что у 41 (58,57%) изолята *T. vaginalis* сохранена работа всех четырех генов, отвечающих за продукцию гидрогеносомальных ферментов простейшего: пируват ферредоксин оксидоредуктазы, ферредоксина, гидрогеназы и малатдегидрогеназы, что может свидетельствовать об их чувствительности к метронидазолу (рисунок 2).

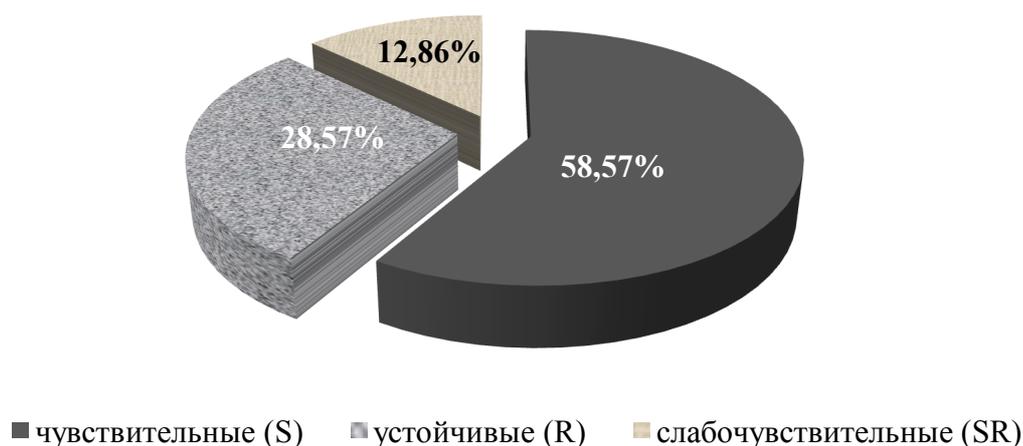


Рисунок 2. – Результат определения чувствительности/устойчивости к метронидазолу среди проанализированных изолятов *T. vaginalis*

У 9 (12,86%) изолятов отмечены различные комбинации, когда в отношении сразу нескольких генов не было выявлено экспрессии. Так, у 6 изолятов отмечена экспрессия гена пируват ферредоксин оксидоредуктазы, но блокирована активность гидрогеназы, ферредоксина, малатдегидрогеназы. В другом варианте (у 3 изолятов) активен был только один ген гидрогеназы, в то время как другие три гена не экспрессировались. В этих случаях можно прогнозировать снижение ферментативной активности гидрогеносом простейшего и как следствие нарушение активации метронидазола, что характерно для слабочувствительных изолятов *T. vaginalis*. В отношении 20 (28,57%) изолятов полученные результаты свидетельствуют о реализации анаэробного механизма резистентности у простейшего за счет блокирования экспрессии всех анализируемых генов.

Исходя из приведенных данных, определение экспрессии генов пируват ферредоксин оксидоредуктазы, ферредоксина, гидрогеназы и малатдегидрогеназы у изолятов *T. vaginalis* позволяет с помощью ПЦР оперативно установить наличие/отсутствие анаэробного механизма резистентности у простейшего и выбрать рациональную дозу и схему терапии.

Заключение. Осуществлено определение генотипической резистентности 70 изолятов *T. vaginalis* на основании анализа экспрессии генов пируват ферредоксин оксидоредуктазы, ферредоксина, гидрогеназы и малатдегидрогеназы. По результатам исследования 41 (58,57%) изолят определен как чувствительный к метронидазолу, 9 (12,86%) изолятов – слабочувствительные, 20 (28,57%) изолятов отнесены к устойчивым.

Разнородность изолятов простейшего свидетельствует о необходимости определения резистентности *T. vaginalis* к метронидазолу и его производным для выбора препарата, рациональной дозы и схем терапии пациентов с урогенитальным трихомониазом.

Литература

1. Kusdian, G. The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection / G. Kusdian, S.B. Gould // Mol. Biochem. Parasitol. – 2014. – Vol. 198, No. 2. – P. 92-99.
2. Systematic review of the literature on mechanisms of 5-nitroimidazole resistance in *Trichomonas vaginalis* / K.J. Graves [et al.] // Parasitology. – 2020. – Vol. 147, No. 13. – P. 1383-1391.
3. Здравоохранение в Республике Беларусь [Электронное издание]: офиц. стат. сб. за 2019 г. – Минск: ГУ РНПЦ МТ, 2020. – 257 с.

4. High rates of double-stranded RNA viruses and *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* clinical isolates in South Brazil / D. da Luz Becker [et al.] // Infect. Genet. Evol. – 2015. – Vol. 34. – P. 181-187.

5. Seña, A.C. Persistent and recurrent *Trichomonas vaginalis* infections: epidemiology, treatment and management considerations / A.C. Seña, L.H. Bachmann, M.M. Hobbs // Expert Rev. Anti-Infect. Ther. – 2014. – Vol. 12. – P. 673-685.

6. Workowski, K.A. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015 / K.A. Workowski, G.A. Bolan // MMWR Recomm. Rep. – 2015. – Vol. 64, No. RR-03 – P. 1-137.

7. *Trichomonas vaginalis* prevalence, incidence, risk factors and antibiotic-resistance in an adolescent population / J.W. Krashin[et al.] // Sex. Transm. Dis. – 2010. – Vol. 37 – P. 440-444.

8. Utility of antimicrobial susceptibility testing in *Trichomonas vaginalis*-infected women with clinical treatment failure / E.A. Bosserman [et al.] // Sex. Transm. Dis. – 2011. – Vol. 38. – P. 983-987.

9. Mabaso, N. Distribution of genotypes in relation to metronidazole susceptibility patterns in *Trichomonas vaginalis* isolated from South African pregnant women / N. Mabaso, N. Abbai // Parasitol. Res. – 2021. Vol. 120, No. 6. – P. 2233-2241.

10. Proteomic signatures of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* reveal novel proteins associated with drug resistance / H.C. Lin [et al.] // Parasit. Vectors. – 2020. – Vol. 13, No. 1. – P. 274.

KEY HYDROGENOSOME ENZYMES GENE EXPRESSION FOR ANALYSIS OF METRONIDAZOLE-RESISTANT *TRICHOMONAS VAGINALIS* PREVALENCE

Rubanik L.V., Zhukova Yu.S., Poleshchuk N.N.

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

The prevalence of metronidazole-anaerobic resistant *Trichomonas vaginalis* isolates was estimated based on the gene expression of key hydrogenosomal protozoan enzymes – pyruvate ferredoxin oxidoreductase, ferredoxin, hydrogenase, and malate dehydrogenase. Data on the heterogeneity of the Belarusian pathogen population in relation to susceptibility to metronidazole were obtained: 58.57% of isolates were identified as sensitive, 12.86% were weakly sensitive, and 28.57% were classified as resistant. Laboratory testing using PCR is an important tool to improve the effectiveness of antiprotozoal treatment.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, resistance, metronidazole, pyruvate ferredoxin oxidoreductase, ferredoxin, hydrogenase, malate dehydrogenase.

Поступила 26.10.2021

АССОЦИАЦИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ 23S рРНК *HELICOBACTER PYLORI*, СВЯЗАННЫХ С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К КЛАРИТРОМИЦИНУ, С АКТИВНОСТЬЮ ВОСПАЛЕНИЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА

¹Янович О.О., ¹Титов Л.П., ²Дорошко М.В.

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

²Медицинский центр «Нордин», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Было проведено обследование 1279 человек с заболеваниями желудочно-кишечного тракта включающее фиброгастроуденоскопию, гистологические исследования состояния слизистой оболочки желудка, тестирование на наличие *Helicobacter pylori*, детекция точечных мутаций в гене 23S рРНК *H. pylori*. Установлена высокая частота выявления *H. pylori* у пациентов с воспалительными заболеваниями верхнего отдела желудочно-кишечного тракта – 78,2%. Достоверно показано, что наличие *H. pylori* с мутациями в гене 23S рРНК, связанными с резистентностью к кларитромицину, приводит к более выраженному воспалительному процессу в слизистой оболочке желудка.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, мутации в гене 23S рРНК.

Введение. *Helicobacter pylori* (*HP*) является грамотрицательной спиралевидной микроаэрофильной бактерий. Ее способность размножаться и жить в агрессивной среде желудка обусловлена такими факторами патогенности, как секреция уреазы, подвижность и способность прикрепляться к эпителиальным клеткам желудка.

В настоящее время считается, что 50-80% населения заражено *HP*. Генетический анализ показывает, что заражение людей *HP* произошло около 58 000 лет назад при первой миграции из Африки [1].

Хроническое воспаление, вызванное *HP*, может привести к нарушению строения слизистой оболочки желудка и функции желудочных желез, возникновению фиброзов и трансформации эпителия в кишечный тип. Считается, что *HP* является первоначальным триггером в каскаде Корреа, приводящим к развитию атрофического гастрита и, конечном итоге, к раку желудка [2].

Кларитромицин является основным препаратом лечения *HP* из-за его низкой минимальной ингибирующей концентрации, хорошей диффузии через слизистые оболочки и слабого влияния на кислотность желудочного сока. В настоящее время наблюдается снижение эффективности эрадикации бактерии в основном из-за устойчивости *HP* к кларитромицину.

Механизм резистентности к кларитромицину обусловлен мутациями в регионе, кодирующим пептидилотрансферазу в гене 23S рибосомальной РНК, которая влияет на связывание макролида с бактериальной рибосомой. Наиболее частые мутации – замена А→G в позиции 2142, на долю которой приходится около 70% и А→G в позиции 2143 на долю которой приходится 11,7% [3].

Цель работы: определение 1) частоты выявления *HP* в образцах слизистой оболочки желудка (антрального отдела), ее связи с возрастом и полом; 2) частоты выявления мутаций в гене 23S рРНК связанных с резистентностью к кларитромицину и ее связь с морфологическими изменениями слизистой оболочки желудка.

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. Окончательная группа, соответствующая всем критериям, составила 1279 человек.

Материалом для исследования служили биоптаты слизистой оболочки желудка антрального отдела, полученные во время фиброгастроуденоскопии.

При эндоскопическом исследовании определялось место поражения желудка (кардия, тело и антральный отдел), выявляли недостаточность замыкательного аппарата кардии.

На основании гистологического исследования описывались выраженность и активность воспалительного процесса в желудке, наличие *HP*, фовеолярная гиперплазия, фолликулярная гиперплазия.

Наличие *HP* в биопсийном материале подтверждали методом ПЦР в режиме реального времени. Экстракцию ДНК *HP* из биопсийного материала проводили с использованием набора «Нуклеосорб-С» (Праймтех, РБ), в соответствии с инструкцией производителя. С целью определения резистентности *HP* к кларитромицину использовали FRET-метод для выявления точечной мутации 23S рРНК [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 обсуждение. В таблице 1 представлена общая характеристика обследованной группы.

Таблица 1. – Характеристика группы пациентов

Характеристика	n	%
Пол		
Женщины	842	65,8
Мужчины	437	34,2
Пангастрит	347	27,1
Возраст		
<18 лет	13	1,0
18-24	70	5,5
25-44	558	43,6
45-59	409	32,0
60-74	206	16,1
> 75	23	1,8
Инфицированность <i>H. pylori</i>		
<i>H. pylori</i> +	1000	78,2
<i>H. pylori</i> -	279	21,8

Исследуемая группа включала 437 мужчин и 842 женщины, средний возраст – 45,0±0,4 лет.

Литературные данные показывают, что распространенность инфекции варьирует от возраста, этнической принадлежности и особенно социально-экономического статуса. В развивающихся странах, где большинство детей инфицированы *HP* до 10 лет, распространенность инфицирования среди взрослых к 50 годам достигает 80% [5].

В нашей работе по данным гистологического исследования и ПЦР-анализа *HP* выявлен у 78,2% пациентов (1000 человек).

Согласно классификации ВОЗ возрастные группы составили: до 18 лет – 13 пациентов (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 (1,8%) пациентов.

Отмечено постепенное увеличение распространенности *HP* с возрастом: от 69,2% в возрастной группе менее 18 лет до 82,6% инфицированных в группе старше 75 лет (рисунок 1).

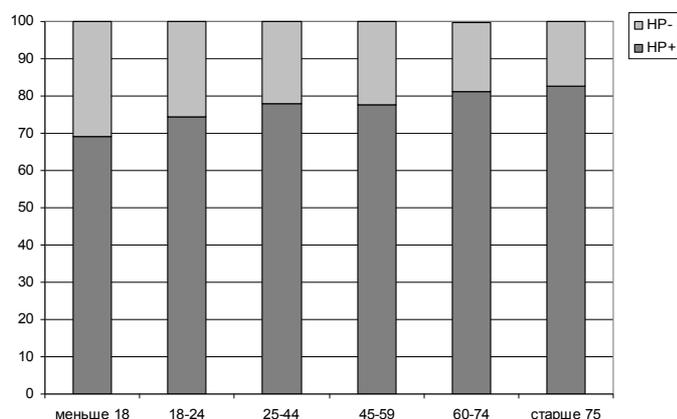


Рисунок 1. – Частота инфицированности *HP* в зависимости от возраста

На рисунке 2 представлены данные возрастных различий в частоте инфицированности *HP* у обследованных пациентов в зависимости от пола.

Метаанализ, проведенный Ferrg A. с соавт. показал, что вероятность инфицирования у мужчин выше чем у женщин [6]. Наш анализ распределения по полу в возрастных группах пациентов с *HP* также выявил более высокую распространенность среди мужчин во всех возрастных группах, за исключением пациентов в возрасте 18-24 лет. Доля инфицированных *HP* лиц среди мужчин и женщин в возрасте от 18 до 24 лет была практически одинаковой – 72,4,0 и 75% соответственно. Однако статистически значимой разницы между исследуемыми группами не выявлено.

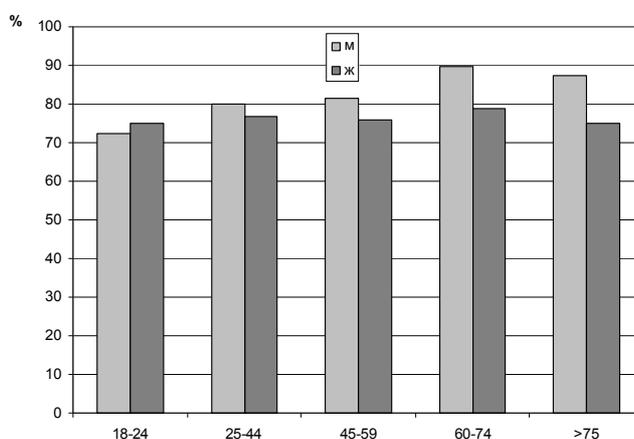


Рисунок 2. – Частота инфицированности *HP* в зависимости от пола в различных возрастных категориях

Слизистая желудка является основным биотопом обитания хеликобактера. Благодаря своему строению и продукции специфичных ферментов и токсинов *HP* способен преодолевать защитные барьеры желудка, прикрепляться к клеткам желудочного эпителия, колонизировать его слизистую оболочку, повреждать ее и вызывать развитие хронического воспалительного процесса.

Стандартный режим тройной терапии для эрадикации *HP*, состоящий из ингибитора протонной помпы, амоксициллина и кларитромицина, используется в качестве терапии первой линии в течение десятилетий; однако частота неудач эрадикации может достигать 20% [7].

На макроуровне развитию устойчивости к антибиотикам способствует не соблюдение рекомендаций по эрадикации [8]. На микроуровне могут вносить вклад мутации в гене 23pPHK *HP*, связанные с резистентностью к кларитромицину. Исследования показали, что мутации, придающие устойчивость к кларитромицину, влияют на значения минимальной ингибирующей концентрации *in vitro* [9].

При этом устойчивость к кларитромицину значительно варьирует в различных регионах Европы. По данным проведенного метаанализа первичная резистентность к кларитромицину составила более 13% в странах Европы (Германия – 13%, Хорватия – 14%, Австрия – 32%, Болгария – 23%) [7]. В нашем исследовании по данным молекулярно-генетического анализа уровень первичной резистентности к кларитромицину составил 17,8%.

Исследования показали, что среди пациентов, инфицированных *HP* с мутациями в гене 23S pPHK, выраженность и активность воспалительного процесса достоверно выше при сравнении с группой с диким типом *HP* (15,2% против 5,5% и 15,8% против 8,5%, $p < 0,05$ соответственно). Также среди пациентов с *HP* с мутациями в гене 23S pPHK наблюдается достоверное увеличение частоты фолликулярной гиперплазии (20,4%).

Выявлено достоверное увеличение частоты пангастрита у пациентов с *HP* с мутациями в гене 23S pPHK (15,5%).

Таблица 2. – Сравнительная характеристика групп пациентов в зависимости от наличия мутаций в гене 23S pPHK *HP*

Параметры	Мутантный тип, %	Дикий тип, %
Выраженность воспал. процесса		
+	94,5	5,5
++/+++	84,8	15,2*
Активность воспал. процесса		
+	91,5	8,5
++/+++	84,2	15,8*
Гиперплазия		
нет	87,4	12,6
фовеолярная	91,3	8,7
фолликулярная	79,6	20,4*
Локализация поражения		
антральный	95,2	4,8
пангастрит	84,5	15,5*

Примечание: * – достоверно при сравнении с группой с диким типом, $p < 0,05$

Влияния наличия мутаций в гене 23S pPHK на частоту выявления атрофии и метаплазии не наблюдалось.

Таким образом, наличие мутаций в гене 23S pPHK *HP* может влиять на активность и выраженность воспалительного процесса в желудке.

Выводы.

1. Наблюдается высокая частота выявления *HP* у пациентов с воспалительными заболеваниями верхнего отдела желудочно-кишечного тракта – 78,2%.

2. Инфицированность *HP* увеличивается с возрастом, причем у мужчин бактерия выявляется несколько чаще чем у женщин.

3. Полученные данные указывают, что инфильтрация мононуклеарами и полиморфоядерными лейкоцитами более выражена у пациентов, инфицированных *HP* с мутациями в гене 23S pPHK, связанными с резистентностью к кларитромицину.

Литература

1. Mégraud, F. The history of *Helicobacter pylori*: from phylogeography to paleomicrobiology / F. Mégraud, P. Lehours, F.F. Vale // Clin. Microbiol. Infect. – 2016. – Vol. 22, No. 11. – P. 922-927.
2. Current perspectives in atrophic gastritis / E. Lahner [et al.] // Curr. Gastroenterol. Rep. – 2020. – Vol. 22, No. 8. – P. 38.
3. Trends in *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin: from phenotypic to genomic approaches / A.T. Marques [et al.] // Microb. Genom. – 2020. – Vol. 6, No. 3. – e000344.
4. Быстрый метод оценки резистентности *H. pylori* к кларитромицину методом ПЦР в режиме реального времени (FRET) у больных хеликобактериозом / О.О. Янович [и др.] // Здоровоохранение. – 2011. – № 12. – С. 9-13.
5. Eusebi, L.H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection / L.H. Eusebi, R.M. Zagari, F. Bazzoli // Helicobacter. – 2014. – Vol. 19. – P. 1-5.
6. Sex differences in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection: an individual participant data pooled analysis (StoP Project) / A. Ferro [et al.] // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. – 2019. – Vol. 31, No. 5. – P. 593-598.
7. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a systematic review and meta-analysis in World Health Organization regions / A. Savoldi [et al.] // Gastroenterology. – 2018. – Vol. 155, No. 5. – P. 1372-1382.
8. Multidrug resistance in *Helicobacter pylori*: current state and future directions / L. Boyanova [et al.] // Expert. Rev. Clin. Pharmacol. – 2019. – Vol. 12, No. 9. – P. 909-915.
9. Minimal inhibitory concentration (MIC) values and different point mutations in the 23S rRNA gene for clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* / V. De Francesco [et al.] // Dig. Liver. Dis. – 2009. – Vol. 41, No. 8. – P. 610-611.

ASSOCIATION OF POINT MUTATIONS IN *HELICOBACTER PYLORI* 23S rRNA GENE, RELATED WITH CLARITHROMYCIN RESISTANCE, INFLAMMATION ACTIVITY, AND GASTRIC MUCOSA MORPHOLOGICAL CHANGES

¹Yanovich O.O., ¹Titov L.P., ²Doroshko M.V.

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

²Medical Center «Nordin», Minsk, Republic of Belarus

Endoscopic and histological examination of stomach antral part was performed in 1279 patients with different gastroduodenal pathologies. Point mutations in *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene was diagnosed by real-time PCR methods (FRET). Among patients with different gastroduodenal pathologies, the frequency of *H. pylori* infection was 78.2%. It has been shown that the presence of point mutations in *HP* 23S rRNA gene associated with clarithromycin resistance enhances the inflammatory process in the gastric mucosa.

Keywords: *Helicobacter pylori*, point mutations in 23S rRNA gene.

Поступила 04.11.2021

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* И ИХ СПОСОБНОСТЬ К ФОРМИРОВАНИЮ БИОПЛЕНКИ

Ярец Ю.И.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь

Резюме. Проведена оценка гено- и фенотипических маркеров вирулентности 56 клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*. Анализировали изоляты, выделенные из отделяемого локальных ран пациентов ожогового отделения; раневого отделяемого и отделяемого дыхательных путей, крови, мочи пациентов с ожоговой болезнью реанимационного отделения. У изолятов *K. pneumoniae* определяли ген регулятор гипермукоидного фенотипа – *grmA*; ген *fimH*, кодирующий адгезивную субъединицу фимбрии; ген *mrkD*, кодирующий адгезин фимбрии типа 3; гены специфичные для K1 и K2 серотипов – *magA* и *K2A* соответственно. Фенотипическую способность к формированию биопленки оценивали с помощью спектрофотометрической детекции. Гипермукоидный фенотип дополнительно оценивали визуально при помощи «стринг-теста». Полученные результаты показывали различные варианты сочетаний генетических детерминант вирулентности у клинических изолятов *K. pneumoniae*, вариабельность реализации фенотипической способности к гиперпродукции капсульных полисахаридов и образованию биопленки. Практическое значение заключается в расширении диагностических возможностей микробиологического анализа, оптимизации интерпретации результатов посева, оценки этиологической значимости.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, гены вирулентности, этиологическая значимость, гипермукоидный фенотип, биопленка.

Введение. Медицинское значение *Klebsiella pneumoniae* обусловлено ее свойствами оппортунистического патогена, способного вызывать инфекции мягких тканей, раневые процессы, пневмонию. *K. pneumoniae* является одной из наиболее частых причин инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в связи с чем она включена в группу шести наиболее значимых и опасных госпитальных патогенов, объединенных термином ESKAPE, под буквой «К» [1].

K. pneumoniae обладает немногочисленными, но эффективными факторами вирулентности, обеспечивающими развитие всех стадий инфекционного процесса, включая адгезию и колонизацию, инвазию и защиту от иммунных факторов [2]. Для адгезии клебсиеллы используют пили (фимбрии) 1 и 3 типов. Фимбрии обеспечивают наибольший вклад в адгезию бактерий как к тканям человека, так и к абиотическим поверхностям, а также способствуют образованию биопленок. Согласно литературным данным, фимбрии 1 типа, обеспечивающие адгезию, экспрессируют до 90% изолятов *K. pneumoniae*. Этот тип фимбрий состоит из субъединиц, генетическими детерминантами которых являются гены *fimA* (большая субъединица), *fimH* (адгезивная субъединица), *fimF* и *fimG* (минорные структурные субъединицы) и др. (*fimC*, *fimD*, *fimI*, *fimK*). Фимбрии типа 3, участвующие в формировании биопленки, представляют собой спиралевидные структуры, которые у *K. pneumoniae* кодируются кластером генов *mrkABCD*. Основная часть фимбрии *mrkA* имеет на конце адгезин *mrkD*. Субъединицы *mrkB*, *mrkC* и *mrkE* участвуют в сборке и регуляции экспрессии фимбрий типа 3, а субъединица *mrkF* участвует в стабилизации их поверхностной структуры [3].

Важное клиническое значение имеют штаммы *K. pneumoniae*, обладающие гипермукоидным фенотипом. Гиперпродукция капсульных полисахаридов возникает под действием положительных регуляторов экспрессии локуса *cps*, который кодирует синтез капсулы и занимает особое место в геноме *K. pneumoniae*. К таким регуляторам относится ген *grmA*, который, как правило, входит в состав большой плазмиды *K. pneumoniae*, ассоциированной с вирулентностью [4]. Гипермукоидный фенотип у *K. pneumoniae* зачастую ассоциирован с принадлежностью штаммов к определенным серотипам. При этом, в разных исследованиях 47-81% гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* имели серотипы K1 (ген *magA*) или K2 (ген *K2A*) [5].

На основании вышесказанного, актуальным является оценка вирулентного потенциала клинических изолятов *K. pneumoniae* путем детекции соответствующих генов, выявления гипермукоидного фенотипа, определения способности формировать биопленку.

Цель: оценить генотипические и фенотипические микробиологические маркеры клинических изолятов *K. pneumoniae*, отражающие их вирулентный потенциал.

Материал и методы исследования. В работе использованы 56 изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из отделяемого локальных ран пациентов ожогового отделения; раневого отделяемого и отделяемого дыхательных путей, крови, мочи пациентов с ожоговой болезнью реанимационного отделения ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница № 1».

Видовую идентификацию изолятов проводили на автоматическом анализаторе Vitek2-Compact (BioMérieux, Франция). У изолятов *K. pneumoniae* определяли ген регулятор гипермукоидного фенотипа – *grmA*; ген *fimH*, кодирующий адгезивную субъединицу фимбрии; ген *mrkD*, кодирующий адгезин фимбрии типа 3; гены специфичные для K1 и K2 серотипов – *magA* и *K2A*, соответственно.

Препараты суммарной клеточной ДНК выделяли из свежей чистой культуры *K. pneumoniae* на 1-2 сутки роста с применением комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ» (АмплиСенс, Российская Федерация). При проведении ПЦР использовали реагенты из набора HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Нидерланды). Реакционную смесь формировали в объеме 25 мкл из входящих в комплект 5х ПЦР-буфера (1,5 ммоль $MgCl_2$), 25 ммоль раствора $MgCl_2$ до конечной концентрации 3,5 ммоль, 1 ед. ДНК-полимеразы, по 10 пмоль прямого и обратного праймеров (Праймтех, Республика Беларусь, таблица) и 10 нг ДНК-матрицы *K. pneumoniae*.

Таблица. – Характеристики праймеров для проведения ПЦР

Название	Последовательность	Температура отжига	Источник литературы
<i>fimH</i> -F	TGTTCCACCACCCTGCTGCTG	61°C	[6]
<i>fimH</i> -R	CACCACGTCGTTCTTGCGCT		
<i>mrkD</i> _F	CCACCAACTATTCCCTCGAA	61°C	[6]
<i>mrkD</i> _R	ATGGAACCCACATCGACATT		
<i>rmpA</i> _F	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	56°C	[7]
<i>rmpA</i> _R	CTTGCATGAGCCATCTTTCA		
K2A_F	CAACCATGGTGGTTCGATTAG	56°C	[7]
K2A_R	TGGTAGCCATATCCCTTTGG		
<i>magA</i> _F	TCTGTCATGGCTTAGACCGAT	56°C	[7]
<i>magA</i> _R	GCAATCGAAGTGAAGAGTGC		

При проведении ПЦР использовали следующие параметры амплификации: 1 стадия – предварительная денатурация при 95°C 15 мин (1 цикл); 2 стадия – денатурация при 95°C 40 с, отжиг при 53-61°C 30 с; элонгация при 72°C 30 с (32 цикла); 3 стадия – финальная элонгация при 72°C 10 мин (1 цикл) (амплификатор Veriti Thermal Cycler,

Thermo Fisher Scientific, США). Электрофоретическое фракционирование продуктов ПЦР осуществляли в 1,7 % агарозном геле в камере SE-2 (Helicon). Маркерами молекулярного веса являлись фрагменты ДНК («DNA Size Marker», Oletup SSP AB), с массой 50-1000 пар нуклеотидов. Визуализация результатов осуществлялась в приборе для геледокументирования Molecular Imager ChemiDoc XRS (Bio-Rad, США).

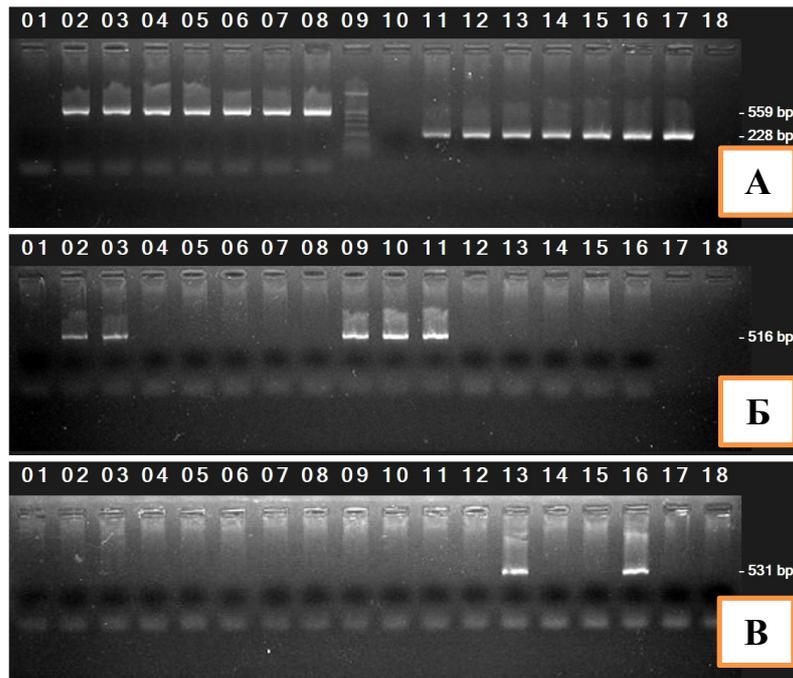
Оценку фенотипической способности формировать биопленку определяли по разработанному и внедренному в работу лаборатории методу (Патент Республики Беларусь № 20326). Для окраски основного вещества биопленки использовали Конго красный, для окраски биомассы – генцианвиолет. Результат выражали в единицах оптической плотности (OD). Контролем (ODк) служили лунки, в которые добавляли только жидкую питательную среду без бактерий. Отсутствию способности к образованию соответствовали значения $OD \leq 0,115$ ед. для экстрактов Конго красный/этанол и генцианвиолет/этанол соответственно. Низкая способность определялась пределами OD от 0,115 до 0,230 ед., умеренная – 0,230 до 0,460 ед., выраженная – $>0,460$ ед [8, стр. 4-7]. Гипермукоидный фенотип дополнительно оценивали визуально при помощи «стринг-теста», т.е. способности слизи, зацепленной бактериальной петлей из колонии на агаре, формировать «нить» длиной не менее чем высота бортика чашки Петри [2].

Исследования выполняли в лаборатории клеточных технологий, лаборатории молекулярной генетики и клинико-диагностической лаборатории ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». При статистическом описании результатов встречаемость анализируемых признаков выражали в относительных частотах (%).

Результаты исследования и обсуждение. У большинства изолятов *K. pneumoniae* присутствовали гены, кодирующие адгезивные свойства – в 91% (51) случаев был выявлен ген *fimH* (кодирует адгезивную субъединицу фимбрии 1), в 89,3% (50) – ген *mrkD* (кодирует адгезин фимбрии 3). Ген регулятор гипермукоидного фенотипа *gmpA* выявлялся в 60,7% (34) случаев. Ген *magA* выявлялся у 42,8% (24) изолятов, что соответствовало K1 фенотипу, ген *K2A* – у 25% (14) изолятов, что определяло K2 фенотип. Отсутствие генов *magA* и *K2A* у 18 изолятов *K. pneumoniae* (32,2%) определяло принадлежность к не-K1/K2-фенотипам. Результаты электрофореза продуктов амплификации анализируемых генов представлены на рисунке 1.

Выявлены комбинации гено- и фенотипических признаков, определяющих вирулентные свойства клинических изолятов *K. pneumoniae*. Наиболее частыми сочетаниями генов являлись *fimH+/mrkD+/gmpA+/magA+*, которые выявлялись в 41,0% (23) случаев; *fimH+/mrkD+/gmpA-/magA-/K2A-*, определяемые в 19,6% (11) случаев и *fimH+/mrkD+/gmpA-/K2A-* в 10,7% (6) случаев. Изоляты с первой комбинацией генов преимущественно выделялись из биологических образцов пациентов с ожоговой болезнью, имели гипермукоидный фенотип и характеризовались умеренной и выраженной способностью формировать биопленку. Изоляты, имеющие вторую комбинацию генов, обнаруживались как в локальных, так и обширных ранах, а также из мочи и крови пациентов с ожоговой болезнью. Данные изоляты *K. pneumoniae* не имели гипермукоидного фенотипа, при этом продукция биопленки могла быть низкой или выраженной. Третий вариант комбинации соответствовал K2 фенотипу (по гену *K2A*). Такие изоляты *K. pneumoniae* были обнаружены в отделяемом дыхательных путей и мочи пациентов с ожоговой болезнью, а также в локальных ранах и не проявляли гипермукоидного фенотипа, характеризовались различной способностью формировать биопленку. Частота обнаружения других вариантов сочетаний генов составляла от 1,8 до 7,1% (1-4 изолятов) (рисунок 2).

Повышенная вирулентность гипермукоидных изолятов доказана на инфекционных моделях. Напротив, изоляты со сниженной продукцией капсульных полисахаридов (например, изоляты, не несущие ген *gmpA*), обладали слабой вирулентностью, что указы-



А – детекция *fimH* и *mrkD* генов: дорожка 1 – негативный результат, дорожки 2-18 – позитивный результат определения гена *fimH*; дорожка 10 – негативный результат, дорожки 11-17 – позитивный результат определения гена *mrkD*; дорожка 9 – маркер молекулярного веса; Б – детекция *gmpA* гена: дорожки 1, 4-8, 12-16 – негативный результат, дорожки 2, 3, 9-11 – позитивный результат; В – детекция *K2A* гена: дорожки 1-12, 14, 15, 17, 18 – негативный результат, дорожки 13, 16 – позитивный результат

Рисунок 1. – Результаты детекции генов вирулентности у изолятов *K. pneumoniae*

n	Гены					Пациенты с ОБ				ЛР	Биопленка		ГМФ+	ГМФ-
	<i>fimH</i>	<i>mrkD</i>	<i>gmpA</i>	<i>magA</i>	<i>K2A</i>	Рана	ОДП	Моча	Кровь		0,1	2,3		
23 (41,0%)	■	■	■	■	■	14 (25%)	2 (3,5%)	2 (3,6%)	1 (1,8%)	4 (7,1%)	3 (5,3%)	20 (35,7%)	20 (35,7%)	3 (5,3%)
4 (7,1%)	■	■	■	■	■	1 (1,8%)	0	0	0	3 (5,3%)	1 (1,8%)	3 (5,3%)	4 (7,1%)	0
1 (1,8%)	■	■	■	■	■	1 (1,8%)	0	0	0	0	0	1 (1,8%)	1 (1,8%)	0
6 (10,7%)	■	■	■	■	■	0	3 (5,4%)	1 (1,8%)	0	2 (3,6%)	2 (3,6%)	4 (7,1%)	0	6 (10,7%)
11 (19,6%)	■	■	■	■	■	2 (3,6%)	1 (1,8%)	3 (5,4%)	1 (1,8%)	4 (7,1%)	6 (10,7%)	5 (8,9%)	0	11 (19,6%)
3 (5,4%)	■	■	■	■	■	0	0	2 (3,6%)	0	1 (1,8%)	3 (5,4%)	0	0	3 (5,4%)
2 (3,6%)	■	■	■	■	■	2 (3,6%)	0	0	0	0	2 (3,6%)	0	0	2 (3,6%)
3 (5,4%)	■	■	■	■	■	0	1 (1,8%)	1 (1,8%)	0	1 (1,8%)	0	3 (5,4%)	3 (5,4%)	0
1 (1,8%)	■	■	■	■	■	0	1 (1,8%)	0	0	0	0	1 (1,8%)	1 (1,8%)	0
1 (1,8%)	■	■	■	■	■	1 (1,8%)	0	0	0	0	0	1 (1,8%)	1 (1,8%)	0
1 (1,8%)	■	■	■	■	■	0	0	0	1 (1,8%)	0	0	1 (1,8%)	1 (1,8%)	0

Черная заливка – наличие гена; нет заливки – отсутствие; ОДП – отделяемое дыхательных путей; ЛР – локальные раны; ОБ – ожоговая болезнь; 0,1 – отсутствие или низкая способность формировать биопленку; 2,3 – умеренная или выраженная способность формировать биопленку; ГМФ – гипермукоидный фенотип; «+» или «-» – наличие или отсутствие признака

Рисунок 2. – Биопрофили изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из различных видов биологического материала пациентов с локальными и обширными ранами

ваает на особое значение капсулы в развитии инфекционного процесса [4]. Наличие капсулы обеспечивает способность *K. pneumoniae* ускользать от иммунного ответа макроорганизма, включая защиту от фагоцитоза, системы комплемента [2]. В представленном исследовании изоляты *K. pneumoniae*, которые характеризовались наличием основных генов вирулентности, включая регулятор гиперпродукции капсульных полисахаридов, обнаруживались в обширных ожоговых ранах пациентов отделения реанимации. При визуальной оценке эти изоляты были гипермукоидными и при спектрофотометрической оценке обладали способностью формировать биопленку. Учитывая состояние пациентов и наличие инфекционного процесса, можно предположить, что указанные гено- и фенотипические признаки могут быть дополнительными критериями, отражающими виру-

лентные свойства клинических изолятов *K. pneumoniae*. Практическое значение заключается в расширении диагностических возможностей микробиологического анализа, оптимизации интерпретации результатов посева, оценки этиологической значимости.

Заключение. Полученные результаты показывают различные варианты сочетаний генетических детерминант вирулентности у клинических изолятов *K. pneumoniae*, варибельность реализации фенотипической способности к гиперпродукции капсульных полисахаридов и образованию биопленки. Это является основой для проведения дальнейших исследований, которые позволят определить взаимосвязь гено- и фенотипических признаков с клиническими особенностями патологического процесса, что позволит повысить информативность микробиологического лабораторного исследования.

Исследование выполнено в рамках задания ГПНИ 4 на 2021–2025 гг. «Трансляционная медицина», по теме «3.20 Изучение патогенного потенциала клинически значимых штаммов бактерий для повышения эффективности системы инфекционного контроля в стационаре».

Литература

1. Rice, L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESCAPE / L.B. Rice // *J. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 197, No. 8. – P. 1079-1081.
2. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном / И.В. Чеботарь [и др.] // *КМАХ.* – 2020. – Т. 22, № 1. – С. 4-19.
3. Struve, C. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence / C. Struve, M. Bojer, K.A. Krogh // *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76, No. 9. – P. 4055-4065.
4. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes / W.L. Yu [et al.] // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 62, No. 1. – P. 1-6.
5. Shon, A.S. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed / A.S. Shon, R.P. Bajwa, T.A. Russo // *Virulence.* – 2013. – Vol. 4, No. 2. – P. 107-118.
6. Mahmood, T.M. The relationship between biofilm formation and presence of fimH and mrkD genes among *E. coli* and *K. pneumoniae* isolated from patients in Mosul / T.M. Mahmood, B.A. Abdullah // *Mosul Nurs. J.* – 2015. – Vol. 3, No. 1. – P. 34-42.
7. Virulence and resistance determinants of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Portuguese tertiary university hospital centre over a 31-year period / C. Caneiras [et al.] // *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. (Engl Ed).* – 2019. – Vol. 37, No. 6. – P. 387-393.
8. Метод микробиологической диагностики посттравматической раневой инфекции: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 30.06.2016, рег. номер: 211-1215 / А.В. Рожко, Ю.И. Ярец, Н.И. Шевченко. – Гомель: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2015. – 9 с.

VIRULENCE GENETIC DETERMINANTS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CLINICAL ISOLATES AND THEIR ABILITY TO FORM BIOFILM

Yarets Y.I.

Republican Research Center for Radiation Medicine & Human Ecology, Gomel, Republic of Belarus

The assessment of geno- and phenotypic markers of virulence of 56 *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates was carried out. The isolates from the wound swabs of local wounds of patients of the burn department; wound swabs and discharge of the respiratory tract, blood, urine of patients with burn disease of the intensive care unit were analyzed. In *K. pneumoniae* isolates the following genes were determined: rpmA gene regulator of the hypermucoid phenotype; fimH gene encoding the fimbria adhesive subunit; mrkD gene encoding fimbria type 3 adhesin; magA and K2A genes specific for K1 and K2 serotypes, respectively. The phenotypic ability to form biofilm was assessed by spectrophotometric detection. The hypermucoid phenotype was additionally assessed visually using a string test. The results obtained showed different combination variants of genetic virulence determinants, variability in phenotypic ability to overproduction of capsular polysaccharides and biofilm formation in *K. pneumoniae* clinical isolates. The practical value lies in expanding the diagnostic capabilities of microbiological analysis, optimizing the interpretation of inoculation results, and assessing the etiological significance.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, virulence genes, etiological significance, hypermucoid phenotype, biofilm.

Поступила 21.10.2021

ИНГИБИТОРЫ РЕПРОДУКЦИИ КОРОНАВИРУСОВ: НАСТОЯЩЕЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Бореко Е.И.

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

Резюме. Приводятся литературные сведения о противовирусных и некоторых патогенетических лекарственных средствах, применимых при лечении пациентов с тяжёлыми инфекциями, вызванными коронавирусами, особенно COVID-19. Перечислены находки ингибиторов репродукции SARS-CoV-2 среди медикаментов различного назначения, перспективные для перепрофилирования в анти-COVID-19 препараты. Наиболее результативная этиотропная терапия COVID-19 на сегодняшний день возможна при своевременном использовании ингибиторов вирусов прямого действия и их сочетаний, направленных на подавление функции РНК-зависимой РНК-полимеразы, протеаз, стадии прикрепления/проникновения вируса. Среди многих подходящих медикаментов лактоферрин с учётом высокого уровня его противовирусной активности и безопасности является одним из наиболее перспективных лекарственных средств.

Ключевые слова: COVID-19, ингибиторы РНК-полимераз, протеаз, прикрепления/проникновения SARS-CoV-2, перепрофилирование имеющихся лекарственных средств.

Коронавирусы (семейство *Coronaviridae*) представляют собой группу оболочечных одноцепочечных (+)РНК-вирусов, которые вызывают респираторные, кишечные и неврологические заболевания различной степени тяжести у широкого круга видов животных, включая человека, подразделяются на четыре рода: альфа-, бета-, гамма- и дельта-коронавирусы (α CoV, β CoV, γ CoV, δ CoV) [1]. Инфекции, вызванные штаммами коронавируса человека HCoV-229E и HCoV-NL63 (α CoV), HCoV-OC43 и HCoV-NKU1 (β CoV) обычно относятся к лёгким, самоизлечивающимся заболеваниям верхних дыхательных путей. За последние 15 лет появились новые β CoV, вызывающие тяжёлый острый респираторный синдром (SARS-CoV, а также SARS-CoV-2) и ближневосточный респираторный синдром (MERS-CoV), которые могут вызывать тяжёлые заболевания человека. Новый SARS-CoV-2 вызывает особое беспокойство и требует внимания в плане изучения в связи с начавшейся в 2019 г. и продолжающейся пандемией COVID-19.

Разработан и применяется ряд вакцин для профилактики COVID-19, однако требуемый уровень коллективного иммунитета не достигнут, а эпидемический процесс характеризуется изменчивостью возбудителя и появлением новых штаммов, вызывающих очаги инфекции в разных странах поочерёдно с последующим глобальным распространением. Отсутствие эффективного лечения и высокие показатели заболеваемости и смертности подчёркивают необходимость разработки новых лекарств для лечения коронавирусных инфекций. В настоящей работе рассматриваются уже доступные и разрабатываемые противовирусные средства, применимые при COVID.

В прежние годы мировая общественность была более обеспокоена пандемиями гриппа, возобновляющимися ежегодно и дополняющимися сезонной заболеваемостью в виде аденовирусной, парагриппозной, респираторно-синцитиальной, бокавирусной и прочих инфекций. Заболеваемость гриппом осложнялась дрейфом антигенной структуры возбудителя, что требовало наличия налаженной системы практически ежегодной разработки новых гриппозных вакцин. Промежутки между более существенной сменой антигенов (шифт) и глобальными пандемиями составляли 10–20 лет. После последней такой смены в 2009 г. прошло уже почти 12 лет. Профилактической мерой, позволяющей снизить заболеваемость гриппом, является вакцинация. Дополняет её так называемая химиотерапия с использованием противовирусных средств, которая может использоваться как с лечебной, так и профилактической целью. Среди противогриппозных средств прямого действия высокой эффективности известны и доступны ингибиторы М2 белка (амантадин и ремантадин), ингибиторы нейраминидазы (тамифлю, занамивир, перамивир) и ингибиторы кэп-зависимой эндонуклеазы (балоксавир; пролекарство балоксавир марбоксил в лекарственной форме «Ксофлюза») вирусов гриппа. В отношении другой распространённой группы инфекций, вызываемых вирусами герпеса (семейство *Herpesviridae*), широко используется аномальный нуклеозид, блокирующий синтез вирусной ДНК, ацикловир, его провещества (валацикловир, пенцикловир) и производные (ганцикловир). Создан целый ряд противовирусных средств для лечения ВИЧ: ингибиторы обратной транскриптазы (зидовудин, невирапин), протеазы (лопинавир/ритонавир), интегразы (раптегравир) вируса, а также блокаторы рецепторов (маравирик) и процесса слияния (энфувиртид).

В отношении коронавирусов таких узко целенаправленных и высокоэффективных противовирусных средств нет. В связи с этим могут быть использованы медикаменты с широким спектром прямого противовирусного действия; средства, предназначенные для применения при других вирусных инфекциях, совпадающие по целевому назначению исходя из механизма их действия; а также различные лекарственные препараты, которые могут оказать влияние на патогенетические звенья инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Прежде всего, это ингибиторы РНК-полимераз вирусов. Наиболее всего известен и повсеместно доступен из таких средств рибавирин (1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) с противовирусным действием в отношении различных оболочечных ДНК- и РНК-вирусов. Имеется опыт применения рибавирина при SARS, при этом эффективность средства признана недостаточной. Причина заключается в запоздалом начале применения препарата, что во многом связано с медленным нарастанием количества возбудителя в организме после момента инфицирования до диагностируемого уровня даже в ПЦР [2]. Вместе с тем, противовирусные свойства рибавирина могут быть увеличены комбинированным применением с другими средствами. В частности, индекс его селективности на культуре клеток (отношение максимальной нетоксичной концентрации к 95 % эффективной) при совместном использовании с метронидазолом возрастает более чем в 20 раз [3, с. 50–52].

Важная особенность рибавирина, широкий спектр противовирусного действия, продолжала привлекать внимание, и была синтезирована линейка его аналогов, в которых 1,2,4-триазол-3-карбоксамид замещён 3-гидрокси-2-пиразинкарбоксамидом. Наиболее известным из них является фавипиравир (6-фтор-3-гидрокси-2-пиразинкарбоксамид, Т-705). Как и в случае рибавирина, фавипиравир, проявляющий наиболее высокую ингибирующую активность в отношении репродукции вирусов гриппа, вызывает интерес также в связи с его противовирусными свойствами в отношении многих РНК-вирусов: флави-, бунья-, арена-, фило-, коронавирусов, входит в список потенци-

альных средств при лихорадке Эбола [3, с. 109–121]. В отношении ДНК-вирусов он неактивен.

Ремдесивир представляет собой фосфорамидатное пролекарство цианозамещённого аналога нуклеотида. Его трифосфатная форма напоминает АТФ и используется в качестве субстрата для нескольких ферментов или комплексов вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы. Препарат обладает широким спектром противовирусной активности в отношении различных РНК-вирусов, включая филовирусы и коронавирусы. Исследования на мышах и макаках-резус помогли оценить терапевтический потенциал этого препарата против вируса Эбола, SARS-CoV и MERS-CoV. Противовирусная активность ремдесивира была продемонстрирована также в отношении SARS-CoV-2 на культуре клеток. Не установлено профилактическое действие (при предобработке культуры клеток до инфицирования SARS-CoV-2). При обработке после инфицирования концентрация 50 % противовирусного эффекта (EC₅₀) на культуре клеток составляет 0,137 мкМ, по другим данным 0,77 мкМ, концентрация 90 % эффекта (EC₉₀) — 1,76 мкМ [4, 5]. Эти данные свидетельствуют о гораздо более высокой активности ремдесивира в отношении репродукции SARS-CoV-2 в сравнении с другими противовирусными средствами широкого спектра действия, рибавирином и фавипиравиром (EC₅₀ = 61,88 и 109,50 мкМ соответственно [6]).

Молнупиравир, пролекарство ещё одного ингибитора РНК-зависимой РНК-полимеразы вирусов, производного N4-гидроксицитидина, представляет собой противовирусный нуклеозидный препарат, который разрабатывался первоначально как противогриппозное средство. Активен также в отношении SARS, MERS и SARS-CoV-2, EC₅₀ ингибитора в отношении репродукции SARS-CoV-2 на культуре клеток Vero E6 составляет 0,3 мкМ [7]. Применение одобрено в Великобритании (производство Merck) [8].

Из рассмотренных средств наибольший опыт применения при тяжёлых коронавирусных инфекциях имеется для рибавирина (таблица 1). Использование рассмотренных выше медикаментов в качестве монопрепаратов мало- либо неэффективно. Исключением может быть только ремдесивир, однако в данном случае опубликованные данные о результатах правильно организованных контролируемых испытаниях ещё малочисленны. Во многом малую эффективность противовирусных средств при коронавирусных инфекциях можно объяснить поздним началом их применения. Как известно, при респираторных инфекциях, например, при гриппе, даже в случае использования имеющих целевых высокоспецифичных противовирусных препаратов, положительный результат достигается только при условии начала их применения в первые двое суток заболевания.

Таблица 1. – Лекарственные средства и их сочетания, применявшиеся у пациентов с SARS, MERS и COVID-19

Препарат	Инфекция	Результат	Ссылки
1	2	3	4
Рибавирин	SARS	Не оказывает значительного влияния на клинический результат.	1
Рибавирин, лопинавир / ритонавир (калетра) + кортикостероиды	SARS	Более низкие 21-дневные показатели ОРДС и смертности в сравнении с пациентами, получавшими рибавирин + кортикостероиды.	
Рибавирин + αИФН-2а или αИФН-2b	MERS	Не оказывает значительного влияния на клинический результат; улучшение выживаемости на 14 день, но не на 28 день.	

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
Рибавирин + βИФН-1а	MERS	Не оказывает значительного влияния на клинический результат.	
Рибавирин, лопинавир / ритонавир (калетра) + αИФН-2а	MERS	Вирусия исчезла через 2 дня после начала лечения у пациента с тяжёлой формой.	1
Ремдесивир	COVID-19	Выздоровление, в том числе у тяжелобольных в 68 % случаев. Субъективно улучшение в группе ремдесивира в сравнении с плацебо, не влияет на вирусную нагрузку в связи с поздним назначением. Незначительное улучшение.	4 5
Лопинавир / ритонавир (калетра)	MERS	Снижение температуры тела, выведение вируса из сыворотки и мокроты и выживаемость.	9
αИФН-1 + кортикостероид	SARS	Улучшение насыщения кислородом и более быстрое разрешение изменений в лёгких на рентгенограммах, чем при применении только системных кортикостероидов.	1
Кортикостероиды	SARS	Увеличение уровня РНК SARS-CoV в плазме крови на 2–3 неделях заболевания. Раннее использование кортикостероидов может продлить вирусную выживаемость. Увеличение 30-дневной смертности. Диссеминированная грибковая инфекция и аваскулярный остеонекроз после продолжительной системной терапии.	
	MERS	Пациенты с тяжёлым MERS, которые лечились системными кортикостероидами с противовирусными препаратами и интерферонами или без них, не имели положительного ответа.	
Плазматерапия в фазе выздоровления	SARS	Снижение смертности, но успех лечения определяется доступностью и своевременным введением. Выздоровление на 22 день выше среди пациентов, получавших лечение в первые 14 дней заболевания в сравнении с теми, кого лечили позже.	
Моноклональные антитела: бамланивимаб + этесевимаб казиривимаб и им-девимаб (REGN-COV2)	COVID-19	Снижается риск госпитализации COVID-19 и смертность на 87% у людей с лёгкими и умеренными симптомами при высоком риске тяжёлого заболевания. Снижается риск госпитализации и смертности от COVID-19 на 70% у людей с симптомами лёгкой и умеренной степени тяжести.	10

При использовании комбинаций лекарственных средств видно, что определённо положительный результат вносит присутствие ингибитора протеазы ВИЧ лопинавир/ритонавир (калетра, алувиа). Применение препарата эффективно и в индивидуальном режиме. Использование кортикостероидов оценивается неоднозначно, во всяком случае, в качестве монотерапии при отсутствии острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) не рекомендуется. Плазматерапия и лечение моноклональными ан-

тителами несут опасность реакций гиперчувствительности и антителозависимого усиления [10].

Ошибочным является использование целевых узконаправленных противовирусных средств (в частности, ингибиторы нейраминидазы осельтамивир, занамивир [11]), так как коронавирус не имеет подобных структурных белков и не использует их в процессе репродукции. Исключением, пожалуй, могут быть только ингибиторы М2 белка вируса гриппа А (амантадин, ремантадин) как возможные блокаторы функционирования ионных каналов. В наших исследованиях в повышенных концентрациях на культуре клеток они обладали некоторым противовирусным действием в отношении различных оболочечных вирусов [12]. Это наблюдение подтверждено Fink K. с соавторами [13] в экспериментах с SARS-CoV-2 на клетках Vero E6. EC₅₀ амантадина по их данным составила 83–119 мкМ. Авторы предположили, что такой уровень активности достаточен для аэрозольного применения препарата. В настоящее время выполняются зарегистрированные клинические испытания [14].

Использование других лекарственных средств, которые могут быть применены в лечении COVID-19, основано на строении, особенностях репродукционного цикла возбудителя, патогенеза инфекционного процесса.

Геном SARS-CoV-2 состоит из 29 811 нуклеотидов (самый крупный среди РНК-вирусов) и кодирует 29 различных белков, которые разделены на три основные группы: структурные белки (шип (S), оболочка (E), мембрана (M) и нуклеокапсид (N)), неструктурные белки (NSP) и вспомогательные белки. Неструктурные белки (NSP1–NSP16) играют важную роль, поскольку контролируют сборку вирусной частицы, а также её уход от системы защиты хозяина. Вспомогательные белки (ORF, всего 8 белков) не требуются для репликации РНК вируса, но могут быть структурными компонентами вириона (ORF7b), а также важны для взаимодействия возбудителя с хозяином. В частности, они участвуют в формировании ионных каналов, чем способствуют обеспечению вирулентности, инфекционности и высвобождения вирусов (ORF3a), являются антагонистом интерферона (ORF3b), усиливают активность РНК-полимеразы (ORF6), подавляют активность стромального антигена костного мозга (ORF7a), важны для адаптации после межвидовой передачи и репликационной эффективности вируса (ORF8) [15]. SARS-CoV-2 использует в своем репродукционном цикле эндосомальный путь проникновения, характерный и для других оболочечных вирусов: прикрепление, протеазозависимое расщепление прикрепительного белка, рН-опосредованное слияние, внутриклеточная репликация новых копий РНК, трансляция и синтез вирусных полипептидов, сборка вирионов и почкование.

Важным структурным белком коронавируса является S-протеин, ответственный за прикрепительную функцию и опосредующий проникновение и вирулентность вируса. Расщепление S-протеина на стыке его субъединиц S1–S2 необходимо для активации слияния мембран и проникновения вируса. Связывание субъединицы S1 с рецептором хозяина запускает конформационные изменения в субъединице S2 (стеблевая область S), чтобы сблизить вирусные и клеточные мембраны и сделать возможным слияние. Коронавирусы человека используют различные рецепторы для прикрепления к клетке: О-ацетилированные сиаловые кислоты (β CoV HCoV-OC43 и HCoV-HKU1), APN (α CoV HCoV-229E), ACE2 (α CoV HCoV-NL63 и β CoV SARS-CoV), DPP4 (MERS-CoV) [1].

О-ацетилированные сиаловые кислоты входят в состав различных углеводсодержащих веществ (гликопротеины, гликолипиды), широко распространены в природе, содержатся в слизистых оболочках и тканях внутренних органов, секретах слюнных желез, спинномозговой жидкости, плазме крови. Обеспечивают защиту слизистых оболочек от механических и химических повреждений, являются компонентом клеточных

рецепторов, играют значительную роль в патологических процессах воспаления, иммунного ответа, канцерогенеза. APN (аминопептидаза N, аланинаминопептидаза) локализована в тонком кишечнике и на мембране почечных микроворсинок, а также на других плазматических мембранах. В тонком кишечнике аланинаминопептидаза участвует в конечном разложении пептидов, образованных при гидролизе белков пищи под действием желудочных и панкреатических протеаз. DPP4 (дипептидилпептидаза-4) является поверхностным антигеном и экспрессирована на поверхности большинства клеток организма. Участвует в иммунной регуляции, переносе сигнала и апоптозе.

Наиболее актуальны сведения об ACE2 (ангиотензин-превращающий фермент). ACE2 — цинксодержащий металлофермент, мембранный белок, задействованный в регуляции артериального давления. ACE2 контролирует проницаемость сосудов и участвует в транспорте некоторых аминокислот. Белок задействован в патогенезе сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, гипертонии, заболеваний лёгких, сахарного диабета и дисбактериоза кишечника, экспрессируется в большинстве тканей. Главным образом находится на мембранах пневмоцитов II типа, энтероцитов тонкого кишечника, эндотелиальных клеток артерий и вен, а также гладкомышечных клеток большинства органов. Кроме этого мРНК для ACE2 обнаружена в клетках коры, полосатого тела, гипоталамуса и ствола головного мозга. Наличие ACE2 на нейронах головного мозга и глии делает эти клетки чувствительными к инфицированию SARS-CoV-2, что может приводить к потере обоняния и развитию неврологического дефицита, наблюдаемых при COVID-19. Особенности ACE2 как рецептора для S-протеина определяются патогенез и эпидемиология вызываемого заболевания.

В связи с вышеизложенным определённый интерес представляет использование в качестве мишени для терапевтического вмешательства S-белка SARS-CoV-2 или рецепторов клетки-хозяина ACE2. В доступной литературе предлагается несколько препаратов для препятствования связыванию субъединицы S1 с ACE2: OC43-HR2P (пептид, полученный из HCoV-OC43) ингибирует стадию слияния коронавирусов, хлорохин, гидроксихлорохин (противомаларийное средство, повышает эндосомную pH и модифицирует сайт связывания ACE2, ингибируя прикрепление вируса), шифрованные препараты SSAA09E2, SSAA09E3, SSAA09E1, SSAA09E3, блокирующие связывание S-протеина с ACE2, проникновение вируса, слияние мембран клеток и вируса, антитела S230, m396, 80R и CR301. Камостат мезилат (ингибитор сериновой протеазы, противовоспалительное, антифиброзное средство), способствующий связыванию ACE2, останавливает проникновение SARS-CoV-2 в клетки хозяина и может быть перспективным препаратом при этой инфекции [15]. Фенофибрат — препарат для снижения уровня холестерина у пациентов с рисками сердечно-сосудистых заболеваний, связываясь с рецепторами клеток ACE2 способен снизить вирусную нагрузку SARS-CoV-2 до 70 % [16]. Несмотря на ряд проблем и разногласий по поводу нацеливания на рецепторы хозяина, несколько профессиональных сообществ рекомендовали использовать эту стратегию для лечения пациентов с COVID-19.

Цистеин-подобная протеаза (CLpro, NSP5) представляет собой гомодимерную протеазу с активным сайтом, состоящим из диады Cis-His, ответственной за протеазную активность [15]. Она высвобождает ряд зрелых NSP протеинов, расщепляя белок-предшественник NSP5, и способствует продуцированию белка, опосредующего комплекс репликации/транскрипции. Папаин-подобная протеаза (PLpro) функционирует, разрезая N-конец полибелка репликазы и продуцируя три NSP (NSP1, NSP2 и NSP3), которые имеют решающее значение для репликации вируса. Обе протеазы успешно ингибируются комбинацией лопинавир/ритонавир (калетра) для лечения ВИЧ-инфекции, которая также используется для лечения COVID-19. Завершена вторая фаза испытаний

капсулированного препарата «Паксловид» (Paxlovid, PF-07321332/ритонавир, производство Pfizer) [8, 17, 18].

Исследования *in silico* показали, что антибактериальные препараты (окситетрацилин, демеклоциклин, доксициклин и лимециклин), кониваптан (используемый при гипонатриемии), гипотензивные препараты (никардипин и телмисартан), а также другие доступные в настоящее время препараты (апрепитант, икатибант, колистин, бепотастин, перфеназин, валрубицин, эпирубицин и каспофунгин) могут быть ингибиторами СLpго. Установлено, что исследованные фтальгидразид-замещённые аналоги кетоглутамина, арилбороновые кислоты, производные тиофенкарбоксилата и хинолинкарбоксилата являются ингибиторами СLpго. Различные природные продукты и их производные демонстрируют высокую аффинность связывания с СLpго [15]. Цинк и его конъюгаты в высоких дозах ингибируют РLpго. В исследованиях *in silico* бензодиоксол и новое соединение 6577871 были идентифицированы как сильные ингибиторы РLpго.

РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp, NSP12). Это важный фермент комплекса репликации/транскрипции у коронавирусов. Домен RdRp РНК-полимеразы состоит из консервативного мотива (Ser-Asp-Asp), присутствующего на С-конце. В предыдущих эпидемиях бета-коронавируса RdRp считалась важной мишенью, поскольку ингибирование этого фермента значительно снижает токсичность и побочные эффекты в клетках хозяина. Ремдесивир, фавипиравир и рибавирин потенциально являются средствами, которые могут блокировать этот фермент. Некоторые другие существующие лекарственные средства также представлены в качестве возможных ингибиторов этого фермента, а именно итраконазол, новобиоцин, ксенодезоксихолеваая кислота, кортизон, идарубицин, силибин и бромид панкурония [15].

Геликаза/НТР-аза. Геликаза (NSP13) является жизненно важным белком для репликации вируса благодаря способности расплетать двухцепочечные ДНК и РНК НТР-зависимым образом. В связи с этим NSP13 признана потенциальной мишенью противовирусных средств. На основании исследований *in silico* предполагалось, что препараты, а именно лимециклин, цефсулодин, ролитетрациклин, итраконазол и сахинавир могут быть ингибиторами НТР-азы. Однако токсичность из-за неспецифичности ингибиторов является большим препятствием.

Помимо вышеупомянутых мишеней некоторые NSP, которые являются критическими участниками синтеза и репликации вирусной РНК, а именно NSP3b, NSP3e, NSP6, NSP7-8 комплекс, NSP9, NSP10, NSP12 и NSP14-16, могут быть исследованы как точки приложения ингибиторов SARS-CoV-2. Факторами вирулентности SARS-CoV, которые помогают вирусу избежать влияния иммунной системы хозяина, а также вмешиваться в его врождённый иммунитет, являются NSP1, NSP3c и ORF7. NSP1 ингибирует продукцию интерферона типа I, а также отвечает за деградацию мРНК хозяина. NSP3c поддерживает сопротивляемость вируса врождённому иммунитету хозяина за счёт связывания с его АДФ-рибозой. ORF7a связывает и ингибирует активность антигена 2 матрикса костного мозга (BST-2), блокируя его гликозилирование. Эти эффекты свидетельствуют об их потенциале для создания новых противовирусных средств.

На сегодняшний день не одобрено никаких специальных лекарственных средств для лечения COVID-19. В этой ситуации лучшим подходом является перепрофилирование уже имеющихся медикаментов различного назначения. Учитывая информацию, полученную из геномной последовательности вместе с моделированием протеинов *in silico*, проведена определённая работа в этом направлении.

Установлено взаимодействие белков SARS CoV-2 с 332 белками человека. Из этих белок-белковых взаимодействий 66 являлись мишенями для различных противовирусных соединений. Все эти соединения были дополнительно проверены вирусологически, что привело к идентификации двух классов веществ: 1) ингибиторы трансля-

ции белков (например, зотифин, тернатин-4 и PS3061) и 2) регуляторы рецепторов S1 и S2 (клемастин, клоперастин, прогестерон и PB28) [19]. Сообщается, что некоторые из этих препаратов более эффективны, чем гидроксихлорохин. В другом исследовании на клетках Vero-E6 в отношении SARS CoV-2 проверили около 12 000 лекарственных средств, одобренных FDA по результатам клинических испытаний. Апилимод (ингибитор киназы PIKfyve), ингибиторы цистеиновых протеаз (MDL-28170, ZLVG CHN2, VBY-825 и ONO 5334) и антагонист хемокинового рецептора CCR1 (MLN-3897) определены в качестве потенциальных кандидатов в лекарственные препараты при COVID-19 [20].

В работе Mirabelly C. и соавторов [21] исследована противовирусная активность 1 425 соединений из библиотеки рекомендованных к применению FDA лекарственных средств и их кандидатов в отношении репродукции SARS-CoV-2. Соединения были выбраны среди коммерчески доступных средств с предварительно известной информацией о наличии противовирусной активности. Противовирусные свойства в отношении SARS, MERS и SARS-CoV-2 подтверждены у 132 веществ, в том числе у 17 из них со значениями EC₅₀ менее 1 мкМ. Среди них модуляторы ионных каналов (амиодарон, верапамил, клофазимин, S1RA), нуклеозиды (ремдесивир, энтекавир, никлозамид, тиогуанин), ингибиторы киназ (босутиниб, федратиниб, гилтериниб) и другие. Лактоферрин ингибировал репродукцию SARS-CoV-2 в концентрациях наномолярного диапазона с многовекторным механизмом действия, включая блокирование прикрепления вируса к гепарансульфату клеток и увеличение индукции интерферона, в комбинации с ремдесивиром проявлял аддитивность противовирусного действия. С учётом высокого уровня безопасности, лактоферрин является наиболее удобным лекарственным средством для перепрофилирования в анти-COVID-19 препараты.

Тяжёлая форма COVID-19 чаще встречается у пожилых людей, что может быть связано со слабым иммунным ответом. Следовательно, важна адаптация способов повышения врождённого иммунитета. Показана многообещающая роль макрофагов и естественных киллеров (NK-клеток) в клиренсе SARS-CoV после их миграции в лёгкие и, таким образом, в повышении уровня хемокинов и цитокинов. Есть несколько транснациональных компаний, которые используют этот подход и стремятся использовать свои продукты на основе естественных киллеров для борьбы с инфекцией COVID-19. Наиболее многообещающий шаг был сделан компанией Cellularity (США) разработкой CYNK-001. Кроме того, интерфероны типа I, используемые по отдельности или в комбинации, обеспечивают защиту широкого спектра против вирусных инфекций, включая MERS-CoV и SARS-CoV [15].

Вирусная инфекция SARS в значительной степени связана с сильным воспалительным ответом в дыхательных путях. Поэтому различными исследователями было предложено использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК), поскольку эти клетки обеспечивают противовоспалительные реакции и запускают механизм восстановления тканей. Значение МСК в лечении пневмонии COVID-19 всё ещё исследуется. Точно так же привлекает внимание использование для лечения внутривенного иммуноглобулина. Более конкретным подходом к лечению могло бы быть создание нейтрализующих антител, нацеленных на поверхностно-специфические эпитопы. К сожалению, это трудоёмкий процесс, требующий больших усилий. Моноклональные антитела против C5a(IFX-1) могут уменьшить степень повреждения лёгких, вызванного SARS-CoV-2, за счёт снижения притока нейтрофилов и утечки из сосудов в альвеолярное пространство. Высокий уровень ИЛ-6 в крови быстро снижает эластичность лёгких, что приводит к острому бронхоальвеолярному воспалению. Таким образом, специфическое блокирование сигнального каскада, регулируемого ИЛ-6, можно рассматривать как ценный подход к лечению. В связи с этим тоцилизумаб, использующий этот механизм

как антиревматоидное средство по основному назначению, является важным препаратом для предотвращения развития ОРДС при COVID-19. Средство талидомид, обладающее противовоспалительным и антифиброзным действием, также может уменьшить повреждение лёгких у таких пациентов. Продолжается клиническая оценка метилпреднизолона (синтетический глюкокортикоид) и финголимода (иммуносуппрессор) для подавления нежелательных иммунных ответов, вызванных SARS-CoV-2. Исследователи также прилагают усилия для оценки эффективности искусственных генетически модифицированных антигенпрезентирующих клеток (аAPC), специфически представляющих структурные белки SARS-CoV-2 (консервативные домены) и, вероятно, помогающих клеткам препятствовать проникновению SARS-CoV-2.

Существуют лекарственные средства, которые проходят клинические испытания с целью оценки их потенциальной способности противостоять инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (таблица 2).

Таблица 2. – Перепрофилирование лекарств для лечения COVID-19 (зарегистрированные клинические испытания) [15]

Возможные мишени воздействия	Название и показания к применению по основному назначению
1	2
Ориентация на РНК-зависимую РНК-полимеразу	Ремдесивир (GS-5734), противовирусный препарат широкого спектра действия в отношении SARS-CoV, MERS-CoV и других РНК-вирусов.
	Фавипиравир (Т-705); противовирусный препарат в отношении широкого спектра РНК-вирусов.
	Галидесивир (BCX4430); противовирусный препарат широкого спектра действия.
	γ-D-N4-гидроксицитидин/NHC/EIDD-1931; сильный ингибирующий эффект в отношении MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2.
	Рибавирин; противовирусный препарат широкого спектра действия, используемый в основном для лечения гепатита С.
Ивермектин (крем стромектол/соолантра); препарат, применяемый для лечения паразитарных инфекций.	
Ингибирование вирусной протеазы	Лопинавир/ритонавир (калетра); используется для лечения и профилактики ВИЧ/СПИД.
	Дарунавир и кобицистат; антиретровирусный препарат при ВИЧ/СПИД.
Блокирование проникновения вируса в клетку	Рекомбинантный человеческий ангиотензин-превращающий фермент 2 (RhACE2 APN01). Используется для лечения рака и связанных с ним проблем.
	*Арбидол (умифеновир). Используется для лечения гриппа и гепатита С.
Укрепление врожденной иммунной системы	Естественные киллерные клетки (НК-клетки); играют важную роль в иммунотерапии рака.
	Рекомбинантный интерферон; используется как противовирусный или противоопухолевый препарат.
	Мезенхимальные стволовые клетки (МСК); признаны эффективными при ОРДС, вызванном как инфекционными, так и неинфекционными заболеваниями.

1	2
Ослабление воспалительной реакции	Внутривенный иммуноглобулин; используется для лечения ряда заболеваний.
	Нейтрализующие антитела (nAbs); используется для антиретровирусного лечения.
	Моноклональные антитела против C5a; используются для лечения пароксизмальной ночной гемоглобинурии и атипичного гемолитико-уремического синдрома.
	Тоцилизумаб, левилимаб, олокизумаб. Блокирование сигнального пути интерлейкина (ИЛ)-6. Ингибиторы ИЛ-6 одобрены для лечения ревматоидного артрита.
	Талидомид; используется для лечения или профилактики болезни Хансена (проказы). Также используется при лечении рака.
	Метилпреднизолон (медрол); снимает воспаление, используется для лечения артрита и рака. Финголимод (гиленья); в основном используется для лечения рассеянного склероза.
Симптоматический контроль	Бевацизумаб (авастин); используется в онкологии и офтальмологии.
Патоген-специфические искусственные антиген-презентирующие клетки	Клинические испытания оценивают безопасность и иммуногенность искусственных антигенпрезентирующих клеток (aAPC) отдельно и в сочетании с антиген-специфическими цитотоксическими Т-клетками.

Примечание: *Вставлен в данную строку таблицы авторами [15] как ингибитор проникновения SARS-CoV-2. На самом деле является иммуномодулятором, его действие опосредовано. В экспериментах на культуре клеток предварительная обработка за 24 ч перед инфицированием разными вирусами приводит к многократному усилению противовирусного действия, что свидетельствует об интерферониндуцирующих свойствах (результаты собственных наблюдений).

При использовании лекарственных средств, этиопатогенетически воздействующих при COVID-19, подавляется репродукция возбудителя и воспалительная реакция организма, снижается прогрессирование заболевания. Как следствие, уменьшается риск развития тяжёлой формы инфекции и необходимость пребывания в стационаре. В частности, в случае применения молнупиравира риск госпитализации снизился на 50%, а паксловид снизил риск тяжелой формы COVID-19 на 89% [22]. Необходимость госпитализации может быть также снижена при медикаментозном ослаблении воспалительной реакции, например, при использовании флувоксамина (феварин, антидепрессант, воздействует на сигма-1 рецепторы головного мозга, регулирующие генерацию цитокинов как маркеров воспаления) [23, 24].

Характерной особенностью зарубежных обзоров, посвященных результатам использования лекарственных средств, а также поиску и разработке новых возможностей медикаментозного воздействия при острых тяжёлых коронавирусных инфекциях, является отсутствие среди применяемых, рекомендуемых и изучающихся средств так называемых противовирусных препаратов иммуномодулирующего действия (исключение — арбидол, испытания в Китае). Это может быть связано с непредсказуемыми побочными эффектами, в частности опасностью возникновения цитокинового шторма и развития на этой основе ОРДС [25]. В то же время российские источники их рекомендуют: кагоцел, амиксин, арбидол, ингавирин, циклоферон, неовир, амизон, гроприносин, ридостин [26]. Использование этих средств имеет место в амбулаторной практике лечения COVID-19 и критикуется российскими же практикующими врачами [27].

Заключение. Анализ мировых научных данных свидетельствует о том, что в вопросе поиска и разработки средств ингибирования репродукции коронавирусов, в частности SARS-CoV-2, имеется достаточно большое количество потенциальных мишеней на уровне взаимодействия возбудителя с клеткой хозяина, особенностей патогенеза инфекции, возможностей стимуляции защитных сил организма, и они активно прорабатываются. Наиболее результативная этиотропная терапия COVID-19 на сегодняшний день возможна при своевременном использовании ингибиторов вирусов прямого действия и их сочетаний, направленных на подавление функции РНК-зависимой РНК-полимеразы (ремдесивир, молнупиравир, фавипиравир) и протеаз (калетра, паксловид) вируса. Эффективны средства исходно различного назначения, блокирующие начальные стадии проникновения SARS-CoV-2 в клетки хозяина. Среди многих подходящих медикаментов лактоферрин с учётом высокого уровня его противовирусной активности с многовекторным механизмом действия и безопасности является наиболее перспективным лекарственным средством для перепрофилирования в анти-COVID-19 препараты.

Литература

1. Coronaviruses — drug discovery and therapeutic options / A. Zumla [et al.] // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2016. – Vol. 15. – P. 327–347.
2. Противокоронавирусная активность рибавирина и метронидазола при индивидуальном и совместном применении / Е.И. Бореко [и др.] // *Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, клиника, вирусология, микробиология и иммунология): материалы НИИЭМ по итогам выполнения ГНТП «Инфекции и медицинские биотехнологии» 2001–2005 гг.* – Минск, 2005. – С. 451–459.
3. Бореко, Е.И. Противовирусные свойства синтетических соединений, лекарственных средств и продуктов природного происхождения (избранные статьи к 75-летию автора) [Электронный ресурс] / Е.И. Бореко // Минск: Медисонт, 2020. – 144 с. – Режим доступа: https://belriem.by/upload/pdf/Boreko_EI_2020.pdf. – Дата доступа: 14.09.2021.
4. Rapid review for the anti-coronavirus effect of remdesivir / Z. Li [et al.] // *Drug Discov. Ther.* – 2020. – Vol. 14, No. 2. – P. 73–76.
5. Jorgensen, S.C.J. Remdesivir: Review of pharmacology, pre-clinical data and emerging clinical experience for COVID-19 / S.C.J. Jorgensen, R. Kebriaei, L.D. Dresser // *Pharmacotherapy.* – 2020. – Vol. 40, No. 7. – P. 659–671.
6. Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency / C.J. Gordon [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2020. – Vol. 295, No. 20. – P. 6785–6797.
7. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice / T.P. Sheahan [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2020. – Vol. 12, No. 541. – eabb5883.
8. Pfizer создаёт лекарство от коронавируса в капсуле / Медиа-Полесье, 06.11.2021 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://media-polesye.by/news/pfizer-sozdayot-lekarstvo-ot-koronavirusa-v-kapsule>. – Дата доступа: 06.11.2021.
9. Totura, A.L. Broad-spectrum coronavirus antiviral drug discovery / A.L. Totura, S. Bavari // *Expert. Opin. Drug Discov.* – 2019. – Vol. 14, No. 4. – P. 397–412.
10. Хусаинов, Р.Х. Моноклональные тела для лечения COVID-19 29.04.2021 / Р. Х. Хусаинов [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://medicalinsider.ru/news/monoklonalnye-antitela-dlya-lecheniya-covid-19>. – Дата доступа: 18.09.2021.
11. Фармакотерапия коронавирусной инфекции 2019 (COVID-19): обзор / J.M. Sanders [et al.] // *JAMA.* – 2020 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://kkbsme.ru/Covid/jama_sanders_2020_rv_200005_rus.pdf. – Дата доступа: 14.09.2021.
12. Первичное изучение антивирусных свойств синтетических и природных соединений: метод. рекомендации / В.И. Вотяков [и др.]. – Минск, 1986. – 26 с.
13. Amantadine inhibits SARS-CoV-2 in vitro / K. Fink [et al.] // *Viruses.* – 2021. – Vol. 13, No. 4. – P. 539.
14. Amantadine for COVID-19 (ACT) / COVID-19 Information [Electronic resource]. – Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04894617>. – Date of access: 23.09.2021.
15. Srivastava, V. New perspective towards therapeutic regimen against SARS-CoV-2 infection / V. Srivastava, A. Ahmad // *J. Inf. Publ. Health.* – 2021. – Vol. 14. – P. 852–862.

16. Калинина, В. Учёные обнаружили препарат против коронавируса COVID-19 с эффективностью 70 % [Электронный ресурс] / В. Калинина. – Режим доступа: https://newsbel.by/08/09/uchenye-obnaruzhili-preparat-protiv-koronavirusa-covid-19-effektivnostyu-70/?utm_source=uxnews&utm_medium=desktop. – Дата доступа: 14.09.2021.
17. PF-07321332 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/PF-07321332>. – Дата доступа: 06.11.2021.
18. Паксловид: описание нового препарата Пфайзер от коронавируса. Код здоровья. 06.11.2021 [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://onff.ru/pakslovid-novoie-liekarstvo-ot-koronavirusa>. – Дата доступа: 06.11.2021.
19. A SARS-CoV-2-Human protein-protein interaction map reveals drug targets and potential drug-repurposing / D.E. Gordon [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 583. – P. 459–468.
20. A large-scale drug repositioning survey for SARS-CoV-2 antivirals / L. Riva [et al.] // Preprint bioRxiv. – 2020. – 2020.04.16.044016. doi: 10.1101/2020.04.16.044016
21. Morphological cell profiling of SARS-CoV-2 infection identifies drug repurposing candidates for COVID-19 / C. Mirabelli [et al.] // PNAS. – 2021. – Vol. 118, No. 36. – e2105815118.
22. Начинается эпоха таблеток от COVID-19. От коронавируса можно будет лечиться дома [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.autoparus.by/publication/46656>. – Дата доступа: 09.11.2021.
23. Fluvoxamine vs placebo and clinical deterioration in outpatients with symptomatic COVID-19: A randomized clinical trial / E.J. Lenze [et al.] // JAMA. – 2020. – Vol. 324, No. 22. – P. 2292-2300.
24. Может ли недорогой антидепрессант снижать риск госпитализации и смерти от коронавируса? [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://daily.afisha.ru/beauty/21559-nedorogoy-antidepressant-snizhaet-risk-gospitalizacii-i-smerti-ot-koronavirusa/>. – Дата доступа: 09.11.2021.
25. Мирошниченко, Е. Друзья или враги? Почему при коронавирусе нельзя принимать иммуномодуляторы / Е. Мирошниченко [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.belpressa.ru/society/zdravoohranenie/34261.html>. – Дата доступа: 14.09.2021.
26. Новый коронавирус SARS-CoV-2: все лекарства и вакцины против инфекции COVID-19. Самый полный и подробный обзор в мире [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://mosmedpreparaty.ru/articles/19949>. – Дата доступа: 14.09.2021.
27. Соколов, Ю. Опыт практикующего врача: как и чем лечат ковид 19 [Электронный ресурс] / Ю. Соколов // Режим доступа: <https://newizv.ru/article/general/28-10-2020/opyt-praktikuyuschego-vracha-kak-i-chem-lechat-kovid-19>. – Дата доступа: 14.09.2021.

Подготовлено при финансовой поддержке БРФФИ (проект № X21КОВИД-004/2 от 22.02.2021).

CORONAVIRUS REPRODUCTION INHIBITORS: PRESENT AND PROSPECTS

Boreko E.I.

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

The literature provides information on antiviral and some pathogenetic drugs useful in the treatment of patients with severe infections caused by coronaviruses, especially COVID-19. Finds of inhibitors of reproduction of SARS-CoV-2 among medicines for various purposes, promising for repurposing in anti-COVID-19 drugs are listed. The most effective etiotropic therapy for COVID-19 today is possible with the timely use of inhibitors of direct-acting viruses and their combinations aimed at suppressing the function of RNA-dependent RNA polymerase (remdesivir) and proteases (kaletra) of the virus. Among the many suitable drugs, lactoferrin is the most promising drug due to its high level of antiviral activity and safety.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2 inhibitors, remdesivir, kaletra, repurposing of existing drugs.

Поступила 09.11.2021

Оригинальные исследования

ВЛИЯНИЕ ЛЕЧЕНИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ SARS-COV-2, НА ТЕЧЕНИЕ СОПУТСТВУЮЩЕЙ ПАТОЛОГИИ

Антонович М.Н., Пожарицкий А.М., Головацкий А.П.

Учреждение здравоохранения «4-я городская клиническая больница им. Н.Е. Савченко», Минск, Республика Беларусь

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

Резюме. Был проведен ретроспективный анализ 483 медицинских карт стационарного пациента одной возрастной группы ($49 \pm 3,5$ лет) с сопутствующей патологией и 30 медицинских карт стационарного пациента без сопутствующей патологии, перенесших коронавирусную инфекцию в период с 01.06.2020 по 31.12.2020. Сравнение проводилось по полу, сопутствующей патологии, а также по длительности пребывания пациента в стационаре. Лечение гидроксихлорохином и макролидными антибиотиками приводит к удлинению интервала QT, что в ряде случаев было жизнеугрожающим состоянием для пациента. Также значительно ухудшалась инотропная функция сердца при сопутствующем ожирении, сахарном диабете, сердечно-сосудистой патологии (ИБС+АГ) и гипотиреозе по данным ЭхоКГ. Самое большое количество койко-дней – при патологии сердца (в среднем 17,25 дней, $p < 0,05$).

Ключевые слова: COVID-19, гидроксихлорохин, инотропная функция, сопутствующая патология, койко-день.

Введение. В конце 2019 г. в китайском городе Ухань провинции Хубэй произошла вспышка новой коронавирусной инфекции. 11 февраля 2020 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) было определено официальное название инфекции, вызываемой данным коронавирусом, – COVID-19 («COronaVIrus Disease 2019»). В тот же день Международный комитет по таксономии вирусов присвоил официальное название и возбудителю инфекции – SARS-CoV-2.

Пандемия COVID-19 повлияла на здоровье и судьбы миллионов людей, создала новые, ранее не предполагаемые условия работы современной системы здравоохранения во всех странах [1]. Высокая клиническая и социальная значимость этого заболевания стала причиной незамедлительного роста количества публикаций о COVID-19 и методах его фармакологической терапии во многих ведущих научных медицинских изданиях. В них приводились данные об особенностях течения заболевания у пациентов с сопутствующей патологией, сложностях диагностики и лечения, выборе алгоритмов помощи таким пациентам. Однако публикации носили характер описания особенностей ведения отдельных пациентов, изучения небольших наблюдательных исследований. На протяжении длительного времени не существовало диагностических параметров, описывающих течение коронавирусной инфекции у пациентов в зависимости от их сопутствующей патологии и применяемой терапии.

Тем не менее, даже первые публикации и отчеты китайских врачей и экспертов ВОЗ демонстрировали самые высокие показатели заболеваемости и смертности среди лиц более старшего возраста с диагностированными сердечно-сосудистыми, онкологическими заболеваниями и диабетом. Тяжелое поражение респираторной системы и, в частности, легких у пациентов с COVID-19 инициирует развитие вторичной дисфункции миокарда и, как следствие, недостаточность кровообращения. Более того, взаимодей-

ствие коронавируса с рецепторами ангиотензин-превращающего фермента 2 (АПФ 2) активирует провоспалительные факторы, увеличивает проницаемость капилляров, что приводит к формированию очагов воспаления и некроза в миокарде, при этом одновременно повышается уровень тропонина, традиционно используемого для диагностики некроза миокарда при остром коронарном синдроме (ОКС) [2].

Даже при отсутствии достоверной информации, подтверждающей эффективность какой-либо конкретной терапии, было предложено несколько вариантов фармакологического лечения COVID-19 инфекции в надежде снизить заболеваемость и смертность, вызванные данным вирусом [3]. Одним из таких вариантов во время первой волны заболеваемости стало использование хлорохина или гидроксихлорохина. Хлорохин – это лекарственный препарат, используемый для лечения малярии. Рядом ученых было установлено [4], что он способен подавлять развитие вирусной инфекции через изменение рН эндосомы, без которой невозможно слияние вируса с клеточной мембраной, а также вмешиваться в процесс гликозилирования клеточных рецепторов, взаимодействующих с вирусом SARS-CoV-2. В сравнении с хлорохином, гидроксихлорохин, как было обнаружено в исследованиях *in vitro* [5], имеет более выраженную способность к ингибированию слияния вируса с клеточной мембраной [6]. Хотя эти исследования и имели ограниченную выборку и слабую доказательную базу, пациентам, нуждающимся в стационарном лечении по поводу COVID-19 инфекции все равно назначался гидроксихлорохин [7]. В то же время широко известным был факт того, что данный препарат в значительной степени удлиняет интервал QT и зачастую является причиной желудочковой тахикардии типа “пируэт” как при индивидуальном назначении [8], так и при совместном применении с макролидными антибиотиками, в частности азитромицином [9, 10].

Цель: определить инотропную и дромотропную функции сердечной мышцы у пациентов, перенёвших коронавирусную инфекцию с различной сопутствующей патологией до и после лечения гидроксихлорохином и макролидами.

Материалы и методы исследования. На базе 2 терапевтических отделений (кардиологического и реабилитационного) УЗ «4 ГКБ им. Н.Е. Савченко» методом случайной выборки был проведён ретроспективный анализ 483 медицинских карт стационарного пациента одной возрастной группы ($49 \pm 3,5$ лет) с сопутствующей патологией и 30 медицинских карт стационарного пациента без сопутствующей патологии, перенесших коронавирусную инфекцию в период с 01.06.2020 по 31.12.2020. Сравнение проводилось по полу, сопутствующей патологии, а также по длительности пребывания пациента в стационаре. Проведён анализ субъективных и объективных методов исследования, полученных результатов лабораторно-инструментальных исследований (обязательных – ОАК, ОАМ, ЭКГ, КТ ОГК и специальных – БХ анализа крови, коагулограммы, иммунологических исследований (интерлейкин 6), кардиомаркеров, анализа КЩС, уровня прокальцитонина, а также ЭхоКГ). Статистическая значимость различий полученных результатов оценивалась непараметрическим методом Хи-квадрат Пирсона. Корреляция сопутствующей патологии и значений анализов оценивалась коэффициентом корреляции рангов Спирмена. Статистически значимыми считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. Сравнивая пациентов с коронавирусной инфекцией и различной сопутствующей патологией, мы разделили их на 7 групп:

1. Нарушение жирового обмена (ожирение)
2. Сахарный диабет
3. ИБС + АГ
4. Онкологические заболевания
5. Заболевания печени (цирроз, стеатоз, вирусные гепатиты В и С)
6. Нефроангиосклероз с хронической болезнью почек
7. Гипотиреоз.

Группа № 1 – нарушение жирового обмена (ожирение). Пациентов в группе: 40 женщин, 40 мужчин, средний возраст $48 \pm 7,1$ лет. Анализ клинико-лабораторных показателей: применение гидроксихлорохина и макролидов при лечении COVID-19, осложненного ожирением, приводит к снижению инотропной и дромотропной функции сердца.

Группа № 2 – сахарный диабет. Пациентов в группе: 36 женщин, 38 мужчин, средний возраст $51 \pm 6,2$ года. Анализ клинико-лабораторных показателей: применение гидроксихлорохина и макролидов при лечении COVID-19, осложненного сахарным диабетом, приводит к снижению инотропной и дромотропной функции сердца.

Группа № 3 – ИБС + АГ. Пациентов в группе: 40 женщин, 40 мужчин, средний возраст $49 \pm 5,7$ лет. Анализ клинико-лабораторных показателей: применение гидроксихлорохина и макролидов при лечении COVID-19, осложненного ИБС + АГ, приводит к снижению инотропной и дромотропной функции сердца.

Группа № 4 – онкологические заболевания. Пациентов в группе: 40 женщин, 36 мужчин, средний возраст $53 \pm 6,7$ лет. Анализ клинико-лабораторных показателей: применение гидроксихлорохина и макролидов при лечении COVID-19, осложненного онкологическим заболеванием, не влияет на инотропную и дромотропную функции сердца.

Группа № 5 – заболевания печени. Пациентов в группе: 30 женщин, 37 мужчин, средний возраст $46 \pm 8,3$ лет. Анализ клинико-лабораторных показателей: применение гидроксихлорохина и макролидов при лечении COVID-19, осложненного патологией печени, не влияет на инотропную и дромотропную функции сердца.

Группа № 6 – нефроангиосклероз с хронической болезнью почек. Пациентов в группе: 34 женщины, 36 мужчин, средний возраст $53 \pm 4,4$ года. Анализ клинико-лабораторных показателей: применение гидроксихлорохина и макролидов при лечении COVID-19, осложненного ХБП, приводит к снижению только дромотропной функции сердца.

Группа № 7 – гипотиреоз. Пациентов в группе: 20 женщин, 16 мужчин, средний возраст $45 \pm 5,9$ лет. Анализ клинико-лабораторных показателей: применение гидроксихлорохина и макролидов при лечении COVID-19, осложненного гипотиреозом, приводит к снижению только инотропной функции сердца.

Частота желудочковой тахикардии типа «пируэт» после терапии гидроксихлорохином в сочетании с азитромицином в группе с ожирением составила 17,5% ($p < 0,05$), в группе с сахарным диабетом – 12,6% ($p < 0,05$), в группе с ИБС+АГ – 21,25% ($p < 0,05$).

Частота желудочковой фибрилляции после назначения гидроксихлорохина в сочетании с азитромицином в группе с ожирением составила 8,7%, ($p < 0,05$), в группе с сахарным диабетом – 10,25% ($p < 0,05$), в группе с ИБС+АГ – 11,7% ($p < 0,05$).

С другой стороны гидроксихлорохин и макролиды не оказывают влияния на инотропную и дромотропную функции сердца при сопутствующей патологии печени и онкопатологии ($p < 0,05$).

В ходе работы также удалось прояснить ряд механизмов развития патологии, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Исходя из общего анализа крови, установлена тенденция к развитию анемий при сопутствующей ХБП и болезнях печени ($p < 0,05$). Установлена прямая корреляция степени поражения легких по данным КТ ОГК и биохимических показателей крови. Чем сильнее выражен симптом «матового стекла», тем больше концентрация СРБ, ферритина, ЛДГ, IL-6 в крови ($p < 0,05$). Также COVID-19 приводит к срыву механизмов компенсации, что видно на примере сопутствующей болезни печени (нарушение обмена билирубина) и почек (значительное снижение скорости клубочковой фильтрации). Анализ на кардиомаркеры показал значительное превышение концентрации миоглобина в крови в группе с сопутствующей сердечно-сосудистой патологией (в 3,68 раза превышает норму, $p < 0,05$), что может свидетельствовать о повреждении мио-

карда, т.к. происходит усугубление циркуляторной гипоксии при ИБС гемической гипоксией от COVID-19. В других группах показатели кардиомаркеров не выходили за границы нормы. При оценке кислотно-щелочного состояния отмечен метаболический ацидоз в группах с сопутствующей патологией печени, почек, гипотиреозом ($p < 0,05$). Также во всех группах выявлено значительное снижение парциального давления кислорода и сатурации ($p < 0,05$). Уровень углекислого газа никогда не выходил за границы нормы, что является особенностью пневмонии при коронавирусной инфекции, для которой не характерно обструктивное поражение воздухопроводящих путей.

Изучено количество койко-дней, проведенных пациентами с различной сопутствующей патологией в стационаре (рисунок).

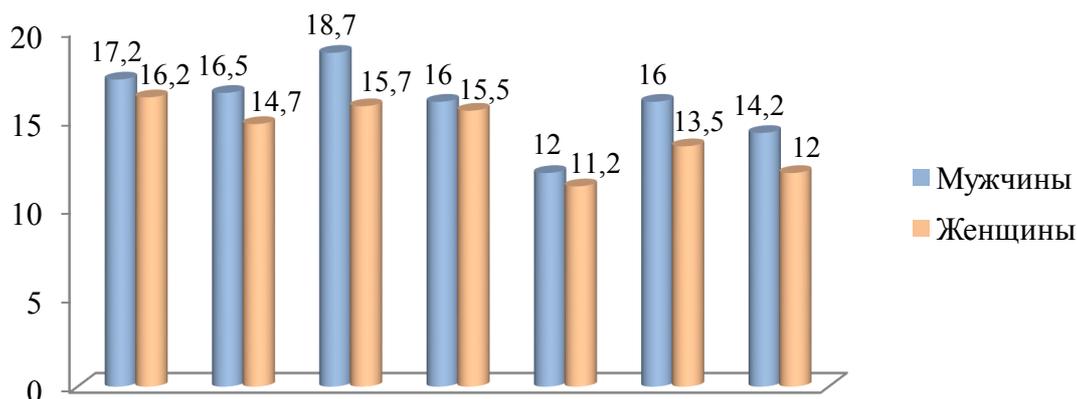


Рисунок. – Количество койко-дней в зависимости от сопутствующей патологии (слева направо: ожирение, сахарный диабет, ИБС + АГ, онкопатология, болезни печени, болезнь почек, гипотиреоз)

Выводы:

1. Лечение гидроксихлорохином и макролидными антибиотиками провоцирует нарушение дромotropной функции сердца по данным ЭКГ при сопутствующей патологии, а именно: ИБС + АГ (удлинение интервала QT на 13%, $p < 0,05$), ожирении (удлинение интервала QT на 10,6%, $p < 0,05$), сахарном диабете (удлинение интервала QT на 3%, $p < 0,05$) и хронической болезни почек (удлинение интервала QT на 1,5%, $p < 0,05$), что в 26 случаях привело к желудочковой тахикардии типа “пируэт”, и в 15 случаях – к фибрилляции желудочков. 16 пациентам потребовалась преждевременная отмена гидроксихлорохина и азитромицин.

2. При лечении гидроксихлорохином и азитромицином ухудшается инотропная функция сердца при сопутствующей патологии, а именно: ожирении (снижение ФВ ЛЖ на 34,5%, $p < 0,05$), ИБС + АГ (снижение ФВ ЛЖ на 20%, $p < 0,05$), гипотиреозе (снижение ФВ ЛЖ на 11%, $p < 0,05$) и сахарном диабете (снижение ФВ ЛЖ на 10%, $p < 0,05$) по данным ЭхоКГ.

3. COVID-19 инфекция значительно утяжеляет течение сопутствующей патологии, что проявлялось развитием анемии при заболеваниях почек и печени, увеличением уровня билирубина в крови при патологии печени, снижением СКФ при заболеваниях почек, повышением уровня миоглобина в крови при патологии сердца.

4. Сочетание нарушений дромotropной и инотропной функций сердца влияло на количество койко-дней, проведенных пациентом в стационаре. Наибольшее количество койко-дней отмечено при сопутствующей патологии сердца, характеризующейся выраженным нарушением дромotropной и инотропной функции (м/ж = 18,7/15,7 дней; $p < 0,05$), а наименьшее – при сопутствующем заболевании печени (м/ж = 12/11,2 дней; $p < 0,05$), где не выявлено нарушение дромotropной и инотропной функции сердца после

лечения гидроксихлорохином и азитромицином.

Литература

1. Convalescent plasma antibody levels and the risk of death from Covid-19 / M.J. Joyner [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2021. – Vol. 384, No. 11. – P. 1015-1027.
2. Ichai, C. Lactate and Acute Heart Failure Syndrome / C. Ichai, X. Leverve, J.C. Orban // *In: Acute Heart Failure / Eds.: A. Mebazaa [et al.] – London: Springer, 2008. – P. 780.*
3. Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19 / P. Colson [et al.] // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2020. – Vol. 55, No. 4. – 105932.
4. Al-Bari, M.A.A. Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases / M.A.A. Al-Bari // *Pharmacol. Res. Perspect.* – 2017. – Vol. 5, No. 1. – e00293.
5. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? / A. Savarino [et al.] // *Lancet Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 3, No. 11. – P. 722-727.
6. In vitro antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) / X. Yao [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2020. – Vol. 71, No. 15. – P. 732-739.
7. Zhou, D. COVID-19: a recommendation to examine the effect of hydroxychloroquine in preventing infection and progression / D. Zhou, S.M. Dai, Q. Tong // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2020. – Vol. 75, No. 7. – P. 1667-1670.
8. QT interval prolongation and torsade de pointes in patients with COVID-19 treated with hydroxychloroquine/azithromycin / E. Chorin [et al.] // *Heart Rhythm.* – 2020. – Vol. 17, No. 9. – P. 1425-1433.
9. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial / P. Gautret [et al.] // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2020. – Vol. 56, No. 1. – 105949.
10. Рекомендации (временные) об организации оказания медицинской помощи пациентам с инфекцией COVID-19: приказ М-ва здравоохранения Республики Беларусь 21 июля 2021 г., №900 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://minzdrav.gov.by/ru/dlya-spetsialistov/normativno-pravovaya-baza/baza-npa.php?ELEMENT_ID=330831. – Дата доступа: 28.10.2021.

INFLUENCE OF TREATMENT FOR COVID-19 INFECTION ON THE COMORBIDITY COURSE

Antonovich M.N., Pozharytski A.M., Golovatsky A.P.

*4th City Clinical Hospital named after M.J. Saŭčanka, Minsk, Republic of Belarus
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

A retrospective analysis was carried out of 483 medical records of an inpatient of one age group (49±3.5 years) with concomitant pathology and 30 medical records of an inpatient without concomitant pathology who underwent coronavirus infection in the period from 01.06.2020 to 31.12.2020. Comparisons were made by gender, comorbidity, and length of hospital stay. Treatment with hydroxychloroquine and macrolide antibiotics leads to prolongation of the QT interval. In some cases, it could be a life-threatening condition for the patient. The inotropic function of the heart significantly worsened with such comorbidities as obesity, diabetes mellitus, cardiovascular pathology (IHD + AH) and hypothyroidism according to echocardiography. Patients with cardiac pathology have the largest number of bed-days (17.25 days, $p < 0.05$).

Keywords: COVID-19, hydroxychloroquine, inotropic function, comorbidity, bed-day.

Поступила 28.10.2021

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО» ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ N501Y В ГЕНОМЕ ВИРУСА SARS-COV-2

Булда К.Ю., Гасич Е.Л., Дрозд А.М., Кабанькова А.Н.

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

Резюме. За время развития пандемии произошла эволюция вируса SARS-CoV-2, результатом которой явилось появление новых генетических вариантов. Часть из них, характеризовались быстрым распространением, более тяжелым течением заболевания у инфицированных, случаями повторного заражения, которые были отнесены по классификации ВОЗ к вариантам, вызывающим беспокойство в связи с увеличением трансмиссивности вируса, тяжести протекания заболевания, повторным инфицированием. В частности, вызывающие озабоченность варианты: В.1.1.7 из Великобритании, В.1.351 из Южной Африки, Р.1 из Бразилии, и В.1.427/В.1.429 из Калифорнии, В.1.617 вариант из Индии. Три мутации, а именно N501Y, ΔH69/V70 и P681H находятся в S-белке. Одна из гипотез о повышенной трансмиссивности В.1.1.7 относится к мутации N501Y, которая может обеспечить селективное преимущество для вируса за счет увеличения аффинности связывания с рецептором ACE2. Анализ кривых плавления высокого разрешения (HRM-анализ) позволяет генерировать профили кривых плавления фрагментов ДНК, полученных с использованием ПЦР в режиме реального времени. Для этого температура в пробах постепенно увеличивается, что приводит к высвобождению флуорофора из денатурированной двухцепочечной ДНК. Скорость изменения флуоресценции позволяет выявить пик, который соответствует температуре плавления комплексов двухцепочечной ДНК. Из исследуемой выборки, состоящей из 67 образцов, полученных от пациентов с COVID-19, находящихся с 25.03.2021 по 30.03.2021 в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница» 23 (34,33%±5,8) образца имели значение Ct больше 32, поэтому они не учитывались в данном исследовании. Оставшиеся образцы учитывались по полученным кривым плавления, анализ которых показал, что 26 (38,81%±5,95) образцов имели мутацию 501Y, у 18 (26,87%±5,42) образцов мутация в области 501N отсутствовала.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, RT-qPCR, HRM-анализ, N501Y, В.1.1.7.

Введение. За время развития пандемии произошла эволюция вируса SARS-CoV-2, результатом которой явилось появление новых генетических вариантов. Часть из них, характеризовались быстрым распространением, более тяжелым течением заболевания у инфицированных, случаями повторного заражения, которые были отнесены по классификации Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) к вариантам, вызывающим беспокойство (COVID-19 Variants of Concern – VOCs).

Например, в сентябре 2020 г. впервые было отмечено быстрое распространение на территории Юго-Восточной Англии нового варианта вируса 20I/501Y.V1, в дальнейшем получившего название «британский», который стал доминировать в Англии в ноябре-декабре 2020 г. и в более чем 150 странах мира, в том числе и в Республике Беларусь. Именно с этим вариантом связывают начало третьей эпидемии COVID-19 в мире.

На сегодняшний день известно 4 генетических варианта, включенных ВОЗ в группу VOC: Альфа («британский» В.1.1.7, Бета («южноафриканский» В.1.351), Гамма («бразильский» Р.1) и Дельта («индийский» В.1.617.2) [1].

В геноме варианта Альфа (В.1.1.7) имеются 17 мутаций, среди которых восемь расположены в S белке: 6 замен и 2 делеции, 4 мутации в ORF1ab, 3 мутации белка ORF8 и 2 мутации в белке N. Три мутации, а именно N501Y, ΔH69/V70 и P681H находятся в S-белке. Одна из гипотез о повышенной трансмиссивности В.1.1.7 относится к мутации N501Y, которая может обеспечить селективное преимущество для вируса за счет увеличения аффинности связывания с ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент) – рецептором, служащим точкой входа вируса в клетку [2]. Мутация N501Y была обнаружена в другом варианте VOC – Гамма (В.1.351), впервые обнаруженном в странах Южной Африки [3].

Результаты геномных исследований позволили расшифровать геном и установить принадлежность нового возбудителя к группе коронавирусов. Надо отметить, что секвенирование вирусного генома имеет решающее значение для отслеживания появления мутаций, которые необходимы для поиска и идентификации новых вариантов. Полная информация о последовательности, полученная этим методом, дает прямое представление об эволюции и распространении вариантов вируса SARS-CoV-2.

Однако секвенирование относится к дорогостоящим и трудоёмким методам исследования, а также требует наличия не только специального оборудования, но и подготовленных специалистов, которые имеют знания в области биоинформационных технологий.

В связи с необходимостью проведения мониторинга появления генетических вариантов в регионах, не имеющих возможности проведения массовых геномных исследований, можно использовать альтернативные варианты, позволяющие выявлять однонуклеотидные полиморфизмы в значимых участках генома вируса SARS-CoV-2 с использованием оборудования для проведения ПЦР-анализа в режиме «реального» времени [4].

Анализ кривых плавления высокого разрешения (HRM-анализ) позволяет генерировать профили кривых плавления фрагментов ДНК, полученных с использованием ПЦР в режиме «реального» времени. Для этого температура в пробах постепенно увеличивается, что приводит к высвобождению флуорофора из денатурированной двухцепочечной ДНК. Скорость изменения флуоресценции позволяет выявить пик, который соответствует температуре плавления комплексов двухцепочечной ДНК. Метод HRM-анализа достаточно специфичен и чувствителен для разделения фрагментов ДНК на основании незначительных различий в них, что делает возможным сканирование мутаций, анализ метилирования и генотипирование. HRM-анализ может использоваться для характеристики образцов на основании их GC-состава и комплементарности последовательностей ДНК. Например, HRM-анализ может быть использован для детекции однонуклеотидных замен. Однако точность методики зависит от соответствующего оборудования, красителей, которые могут связываться с двухцепочечной ДНК и программного обеспечения для анализа.

Таким образом, метод HRM-анализа, выполненный в режиме «реального» времени является быстрым и может быть широко использоваться в лабораторной практике для мониторинга мутаций, характерных для отдельных генетических вариантов вируса SARS-CoV-2 [5].

Цель исследования: апробация метода лабораторной диагностики выявления мутации N501Y вируса SARS-CoV-2 с помощью RT-qPCR с анализом кривых плавления в сравнении с классическим методом секвенирования по Сэнгеру.

Материалы и методы исследования. В качестве исследуемого материала на наличие мутации N501Y вируса SARS-CoV-2, использовали назофорингиальные мазки. Экстракция РНК SARS-CoV-2 проводилась с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «АртРНК» (ООО АртБиоТех, Беларусь). Для проведения реакции RT-qPCR использовался комплект реагентов «VirSniP SARS-CoV-2 Spike

N501Y» (TIB MOLBIOL, Германия). Для получения данных для анализа кривых плавления высокого разрешения после RT-qPCR использовался амплификатор «CFX96™» (BioRad, США). Анализ кривых плавления осуществлялся с использованием программного обеспечения CFX Manager Software. Для секвенирования участка генома использовались следующие праймеры: F – CCTTCACTGTAGAAAAAGGAATC, R – CATATGAGTTGTTGACATGTTTCAG. Электрофорез очищенных фрагментов после секвенирующей ПЦР проводили на генетическом анализаторе «3500 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программных продуктов Sequencing Analysis Software v.6, BioEdit v7.0.9.0, SeqScape v.3.

Результаты исследования и обсуждение. Исследуемая выборка состояла из 67 образцов, полученных от пациентов с COVID-19, находящихся с 25.03.2021 по 30.03.2021 в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница», среди которых: 39 мужчин (58,21%±6) и 28 женщин (41,79%±6). Средний возраст пациентов составил 42 года, из них 7 в возрасте меньше 18 лет (10,45%±3,7), 6 – в диапазоне от 18 до 25 лет (8,96%±3,5), 9 – в диапазоне от 26 до 35 лет (13,43%±4,2), 12 – в диапазоне от 36 до 45 лет (17,91%±4,7), и оставшиеся 33 – больше 45 лет (49,25%±6,1).

Для амплификации выделенной РНК вируса SARS-CoV-2 из образцов в представленной выборке использовалась следующая программа температурного и временного режима: 55°C 5 мин (стадия обратной транскрипции), 95°C 5 мин (денатурация), 45 циклов: 95°C 5 с, 60°C 15 с с детекцией флуоресценции по каналу FAM, 72°C 15 с (ПЦР в режиме реального времени).

Получение данных кривых плавления высокого разрешения производилось согласно следующему температурному и временному режиму: 95°C 5 с, далее 40°C 30 с, затем детекция флуоресценции в диапазоне от 45°C до 73,7°C 5 с с шагом 0,7°C.

Интерпретация данных производилась в соответствии с инструкцией производителя: если значение C_t на графике кривой флуоресценции больше 32 это означает, что количество вируса в исследуемой пробе менее 25 копий/мл, тогда образец не учитывается. Образцы со значением C_t меньше 32 интерпретируются по значению температуры, на котором вышел пик при стадии плавления. Значение температуры ~60,3°C – спайк 501N и не является вариантом Альфа (B.1.1.7), ~66,3°C – спайк 501Y может быть вариантом B.1.1.7 или B.1.351.

Как показали результаты амплификации 67 образцов, полученных от пациентов с COVID-19, находящихся с 25.03.2021 по 30.03.2021 в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница», 23 (34,33%±5,8) образца имели значение C_t больше 32, поэтому они не учитывались в данном исследовании (рисунок 1). Оставшиеся образцы учитывались по полученным кривым плавления (рисунок 2). Исходя из показателей значений пиков, полученных при анализе кривых плавления было установлено, что в 26 (38,81%±5,95) образцах имелась мутация N501Y. В 18 случаях (26,87%±5,42) мутация в области N501Y выявлена не была, что указывает на выявление других генетических вариантов, в геноме которых отсутствует аминокислотная замена в 501 позиции аспарагина на тирозин в S участке генома вируса.

Параллельно было проведено частичное секвенирование 44 образцов по Сэнгеру. Как показали результаты анализа, 18 последовательностей имели замену N501Y, что полностью соответствует результатам, полученным при поставке ПЦР в режиме «реального» времени.

Следовательно, в случае необходимости быстрого скрининга с целью выявления отдельных мутаций, характерных для искомым генетических вариантов и отсутствием возможности секвенирования геномов вируса, может быть применен метод RT-qPCR с анализом кривых плавления, что позволит быстрое получение результатов с минимальными экономическими затратами на проведение исследований.

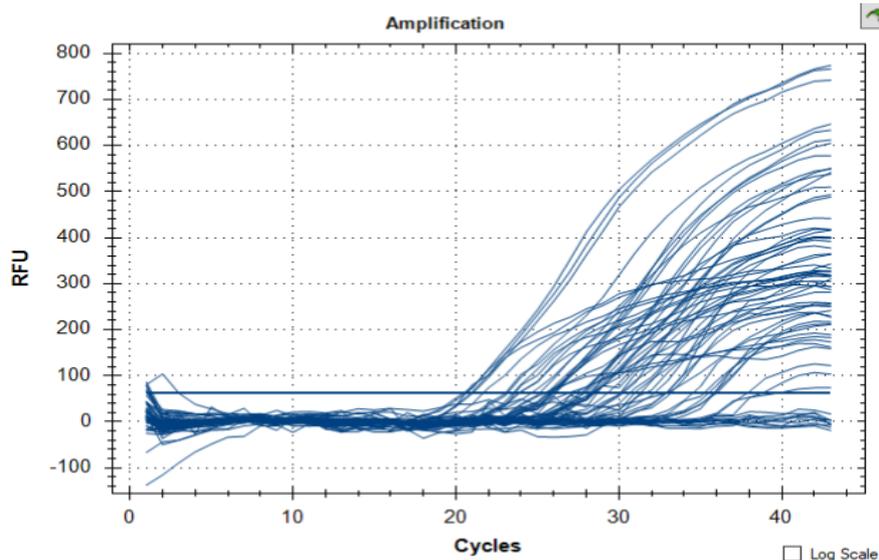
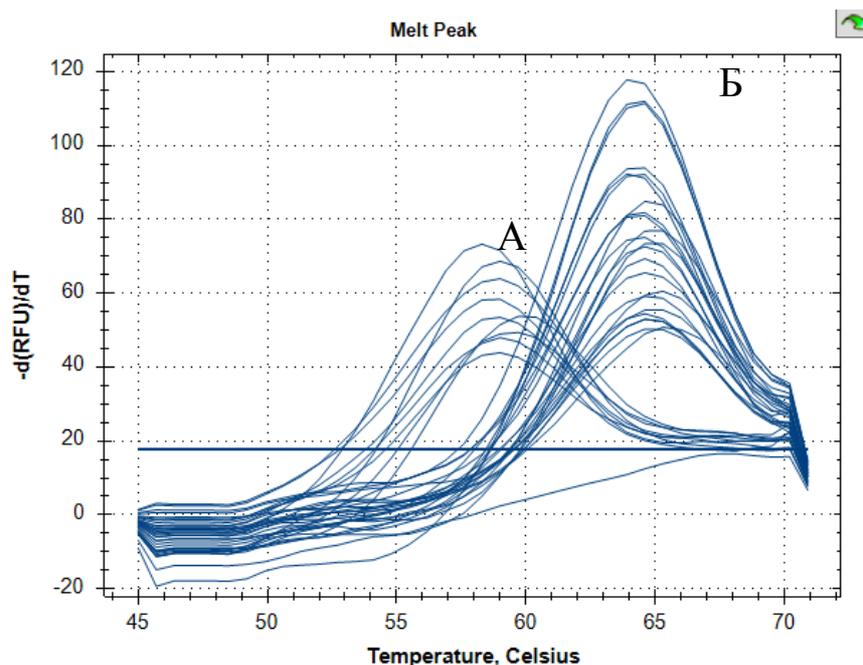


Рисунок 1. – График кривой флуоресценции образцов с SARS-CoV-2



А – белок спайк 501N – не является вариантом B.1.1.7;

Б – белок спайк 501Y – вариант B.1.1.7 или B.1.351.

Рисунок 2. – График кривых плавления для интерпретации мутации N501Y вируса SARS-CoV-2

Заключение. Впервые в стране использован метод RT-qPCR с анализом кривых плавления в сравнении с классическим секвенированием S участка генома, в котором расположена аминокислотная замена в 501 позиции аспарагина на тирозин, показана сопоставимость полученных результатов. Предлагаемый метод анализа кривой плавления является

быстрым, доступным и легким во внедрении в лабораторную диагностику. Учитывая динамичное изменение циркулирующих генетических вариантов нового коронавируса, имеющих пандемическое распространение, дополнительные методы диагностики на основе RT-qPCR с анализом кривых плавлений позволят получить реальную и актуальную информацию о распространении отдельных генетических вариантов, имеющих уникальные мутации в отдельных участках генома вируса.

Тем не менее, вариант ПЦР на основе RT-qPCR с анализом кривых плавлений не может заменить результаты анализа нуклеотидных последовательностей, полученных методом полногеномного или частичного секвенирования 1, 2 или 3 поколения. Метод RT-qPCR с анализом кривых плавления следует использовать в качестве дополнительного инструмента для возможности существенно повысить степень отслеживания циркулирующих вариантов SARS-CoV-2.

Литература

1. Tracking SARS-CoV-2 variants [Electronic resource] – Mode of access: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>. – Date of access: 20.10.2021).
2. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 / J. Shang [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 581, No. 7807. – P. 221-224.
3. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 transmission / Y. Liu [et al.] // BioRxiv [Preprint]. – 2021 – 2021.03.08.434499.
4. Local emergence and decline of a SARS-CoV-2 variant with mutations L452R and N501Y in the spike protein / J.-P. Mallm [et al.] // medRxiv [Preprint]. – 2021. – 2021.04.27.21254849.
5. Rapid screening method for the detection of SARS-CoV-2 variants of concern / D.S.Y. Ong [et al.] // J. Clin. Virol. – 2021. – Vol. 141 – 104903.

REAL-TIME PCR TO DETECT N501Y MUTATION IN SARS-COV-2 GENOME

Bulda K.Y., Gasich E.L., Drozd A.M., Kabankova A.N.

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

For the first time in the country, the RT-qPCR method was used with the analysis of melting curves in comparison with the classical sequencing of the S region of the genome, in which the amino acid substitution at position 501 of asparagine for tyrosine is located; the comparability of the results was shown. The proposed method of melting curve analysis is fast, affordable and easy to implement in laboratory diagnostics. Given the dynamic change in circulating genetic variants of the new coronavirus that have a pandemic spread, additional diagnostic methods based on RT-qPCR with analysis of melting curves will provide real and up-to-date information on the distribution of individual genetic variants with unique mutations in certain regions of the virus genome. However, the RT-qPCR method with melting curve analysis cannot replace the results of the analysis of nucleotide sequences obtained by whole or partial genome sequencing of the 1st, 2nd or 3rd generation. The RT-qPCR method with melting curve analysis should be used as an additional tool to significantly improve the tracking of circulating SARS-CoV-2 variants.

Keywords: SARS-CoV-2, RT-qPCR, HRM-analysis, N501Y, B.1.1.7.

Поступила 29.10.2021

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕДКИХ КОДОНОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ВИРУСНЫХ НУКЛЕОКАПСИДНЫХ БЕЛКОВ И ИХ ФРАГМЕНТОВ

Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е., Зверко В.В., Русина В.В.

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

Резюме. В статье представлены результаты анализа частоты встречаемости «редких» для *Escherchia coli* кодонов в составе фрагментов нуклеокапсидных белков 10 вирусов: Ласса (137R-568V а.о.), ЛХМ (42L-361S а.о.), Пуумала (1M-117A а.о.), Хантаан (1M-117T а.о.), Добрава/Белград (1A-117A а.о.), ККГЛ (201C-307A а.о.), Эбола (434N-739Q а.о.), Марбург (442I-695L а.о.), гепатита С (1M-190S а.о.), Западного Нила (1M-103K а.о.), синтезированных в прокариотической системе экспрессии. В качестве объекта сравнения использовались их полноразмерные аналоги. Развернутый, детальный анализ частоты встречаемости редких кодонов позволяет сделать вывод о том, что эта величина не коррелирует с уровнем экспрессии десяти выбранных для исследования нуклеокапсидных белков. Условия получения каждого рекомбинантного белка необходимо обрабатывать экспериментальным путём в индивидуальном порядке.

Ключевые слова: система экспрессии, кодон, нуклеокапсидные белки.

Введение. Лабораторная диагностика инфекций вирусной этиологии основана на выявлении вируса и/или его структурных компонентов, а также вирусспецифических антител. В связи с этим актуальным направлением исследований является получение высокоспецифичных рекомбинантных аналогов вирусных антигенов либо их фрагментов для последующего включения в качестве антигенных компонентов в состав иммунодиагностических препаратов. Существует ряд систем экспрессии вектор-хозяин: *Escherchia coli* [1]; *Saccharomyces cerevisiae* [2, 3]; *Pichia pastoris* [4]; бакуловирус / клетки насекомых [5, 6]; линии клеток млекопитающих [7]; и бесклеточных / *in vitro* белковых систем [8]. Наиболее экономически целесообразным считается использование в качестве системы экспрессии *E. coli*, в случае если для функциональной активности белка не требуются посттрансляционные модификации (например, гликозилирование). Достоинствами этой системы являются: потенциально высокие уровни экспрессии, быстрый рост культуры, невысокая стоимость сред и простые условия культивирования.

Тем не менее, несмотря на накопленные знания в области генетики и молекулярной биологии *E. coli*, существует ряд причин неэффективной экспрессии клонированных генов: структурные особенности кодирующей последовательности; стабильность и эффективность трансляции мРНК; некорректный фолдинг молекул полипептида и вследствие этого дегградация его протеазами клетки-хозяина; существенные различия в используемых кодонах между «привнесённым» геном и «нативными» генами *E. coli*; потенциальная токсичность белка для клетки-хозяина. Оценить влияние этих факторов можно только экспериментально при получении заданного рекомбинантного белка [9-11]. Тем не менее, непрерывно продолжается поиск подходов, позволяющих предсказать уровень экспрессии чужеродного белка в используемой системе. Одним из параметров, используемых для этих целей, является частота встречаемости редких кодонов. Известно, что в клетках *E. coli* существует дефицит некоторых транспортных РНК для переноса ряда аминокислот, кодируемых «нетипичными» для этой бактерии триплетами. К таким аминокислотам относятся: AGG/AGA/CGA триплеты, кодирующие аргинин (частота встречаемости 1,1; 2,0; 3,5 на

1000); триплетные коды СТА лейцина (3,8 на 1000); АТА изолейцина (4,2 на 1000); ССС пролина (5,0 на 1000); GGA глутамина (8,7 на 1000).

Материалы и методы исследования. Анализ состава кодонов и их распределения внутри клонированных последовательностей проводили с использованием «online» ресурса Biologics Corp's Bioinformatics Center (<https://www.biologicscorp.com/>).

Результаты исследования и обсуждение. Ранее мы описали биосинтез в клетках *E. coli* как полноразмерных, так и отдельных фрагментов рекомбинантных нуклеокапсидных белков 10 вирусов (Ласса, Марбург, Эбола, ККГЛ, Пуумала, Добрава/Белград, Хантаан, Западного Нила и гепатита С) [12]. Интересно отметить, что не прослеживалось четкой корреляции между выходом рекомбинантных белков и общей частотой встречаемости в их последовательностях редких кодонов. Анализ частоты встречаемости редких кодонов показал, что в клонированных последовательностях большинства вирусных белков (Ласса, ЛХМ, Марбург, Эбола, Пуумала, Добрава/Белград, Хантаан) она колеблется в пределах от 7,5 до 9,5 %. Наименьшее значение этой величины характерно для полипептида вируса ККГЛ (6,6%), наибольшее – для триплетов вируса гепатита С и Западного Нила (12,1 и 14,6 %, соответственно). Исходя из этого анализа предполагалось, что максимальный уровень экспрессии должен наблюдаться для белка вируса ККГЛ, а минимальный – для белков вирусов гепатита С и Западного Нила.

Однако данные, полученные нами с использованием экспрессирующей плазмиды рЈС 40 и бактериального штамма BL21 (DE3) и оптимизированными условиями экспрессии для каждого полипептида, свидетельствуют, что максимальный выход белков наблюдался для аминокислотных последовательностей вирусов Ласса и ЛХМ (примерно 35-40 мг на 1 литр культуры), а минимальный – для вируса ККГЛ (5 мг/л), (рисунок 1).

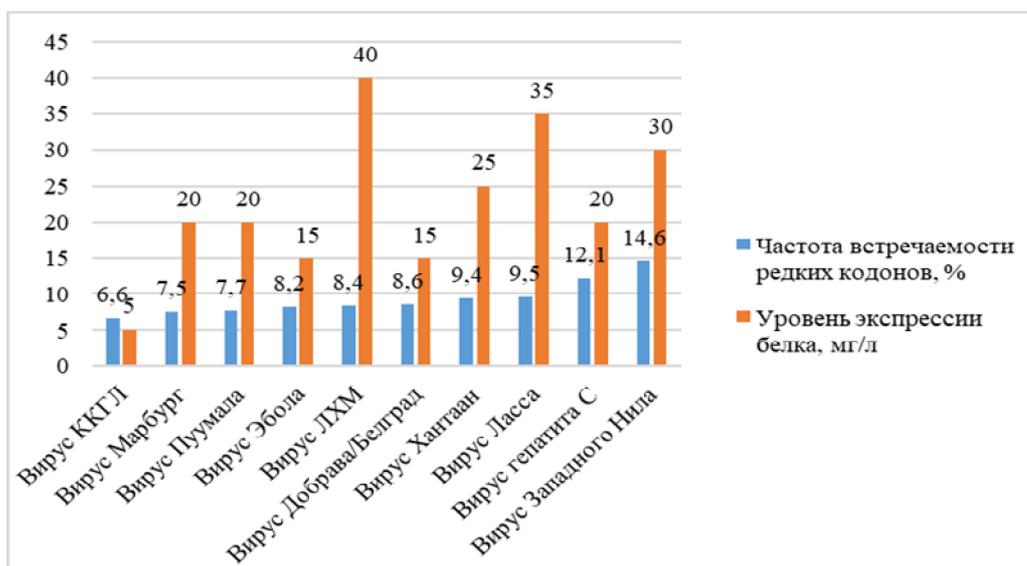
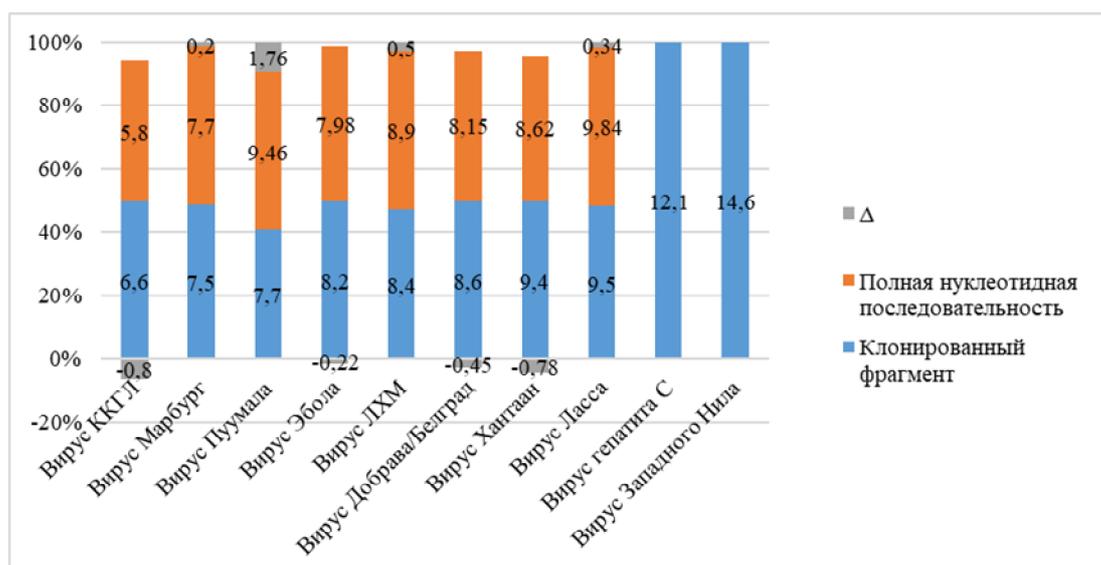


Рисунок 1. – Анализ частоты встречаемости редких кодонов в клонированных последовательностях и уровня экспрессии рекомбинантных белков

Полученный результат был неожиданным. При данных обстоятельствах интересно было проанализировать насколько частота встречаемости редких кодонов в выбранных для клонирования последовательностях находится в диссонансе с аналогичной величиной для полных вирусных нуклеотидных последовательностей. Несмотря на то, что этот анализ не может объяснить невысокий уровень экспрессии белка вируса ККГЛ и высокий –

Западного Нила, тем не менее, следует обратить внимание, что для клонирования использовались фрагменты нуклеокапсидных белков, содержащие максимальное количество потенциальных антигенных сайтов, и непреднамеренно эти фрагменты могли содержать большее/меньшее количество редких кодонов по сравнению с полной нуклеотидной последовательностью. Другими словами, мог ли выбор антигензначимых участков привести к получению белков, содержащих преимущественно «редкие кодоны»? Для оценки такой возможности был проведён анализ полной нуклеотидной последовательности, кодирующей капсидные белки исследуемых вирусов, в сравнительном аспекте с их клонированными фрагментами. Результаты представлены на рисунке 2.



Примечание: Δ – разница между частотой встречаемости редких кодонов в клонированном фрагменте и этой величиной в полной нуклеотидной последовательности

Рисунок 2. – Сравнительный анализ общей частоты встречаемости редких кодонов в фрагментах вирусных белков и их полной нуклеотидной последовательности

Для четырех нуклеокапсидных белков (вирусов Ласса, ЛХМ, Марбург и Пуумала) частота встречаемости редких кодонов в полной последовательности была незначительно выше, чем в клонированных фрагментах, максимальная величина этой разницы (1,76%) наблюдалась для вируса Пуумала. Для белков вирусов Эбола, Добрава/Белград, Хантаан и ККГЛ, наоборот, клонированные фрагменты включали большее количество редких кодонов. Интересно, что для вируса ККГЛ эта разница оказалась максимальной, т.е. непреднамеренно выбранный фрагмент содержал в себе больше редких кодонов, чем полноразмерный нуклеокапсид.

Неожиданные результаты показал анализ частоты встречаемости одиночных триплетов (рисунок 3-9).

Наиболее редко встречающийся кодон AGG, кодирующий аргинин, встречался чаще во фрагменте вируса Хантаан (4,27%), и полноразмерной последовательности вируса гепатита С (3,68%). Он не встречается в анализируемом фрагменте вируса Пуумала, и минорное его содержание отмечено в капсиде вируса Эбола (0,68%) (рисунок 3).

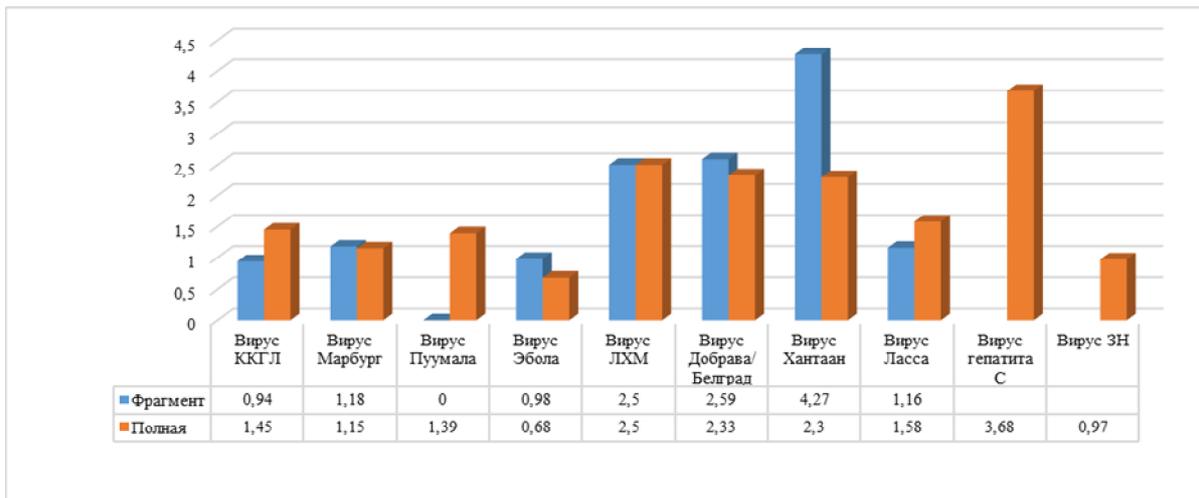


Рисунок 3. – Частота встречаемости AGG кодона в фрагментах вирусных белков

Второй по частоте встречаемости «аргининовый» кодон AGA с максимальной частотой выявлен во фрагменте вируса Пуумала (5,98%) и не обнаруживался во фрагменте вируса ККГЛ (рисунок 4).

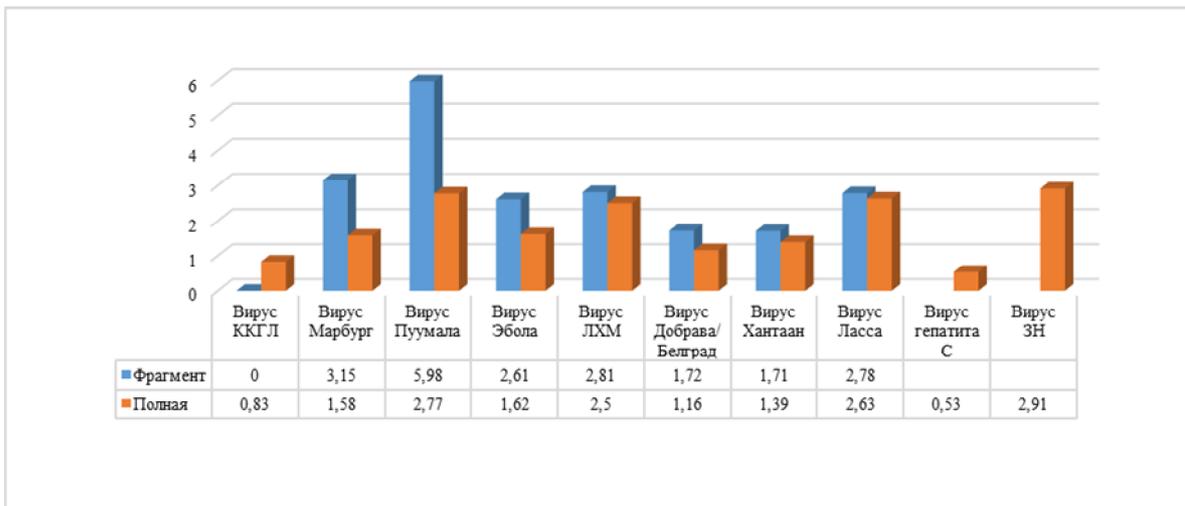


Рисунок 4. – Частота встречаемости AGA кодона в фрагментах вирусных белков

Триплет CGA наибольший вклад вносил в экспрессию фрагмента вируса ККГЛ (0,94%). Интересно отметить, что он не представлен в большинстве клонированных фрагментов (Ласса, ЛХМ, Марбург, Пуумала, Добрава/Белград и Хантаан) (рисунок 5).

Наряду с CGA триплетом, СТА кодон также не выявлен у ряда вирусов: Марбург, Пуумала, Хантаан, ККГЛ. Наиболее часто встречался в полном капсиде вируса Западного Нила (2,91%) (рисунок 6).

Частота встречаемости АТА кодона также максимальная у экспрессируемого белка вируса ККГЛ (2,83%). Интересно отметить, что этот кодон не присутствует в полном капсиде вируса гепатита С (рисунок 7).

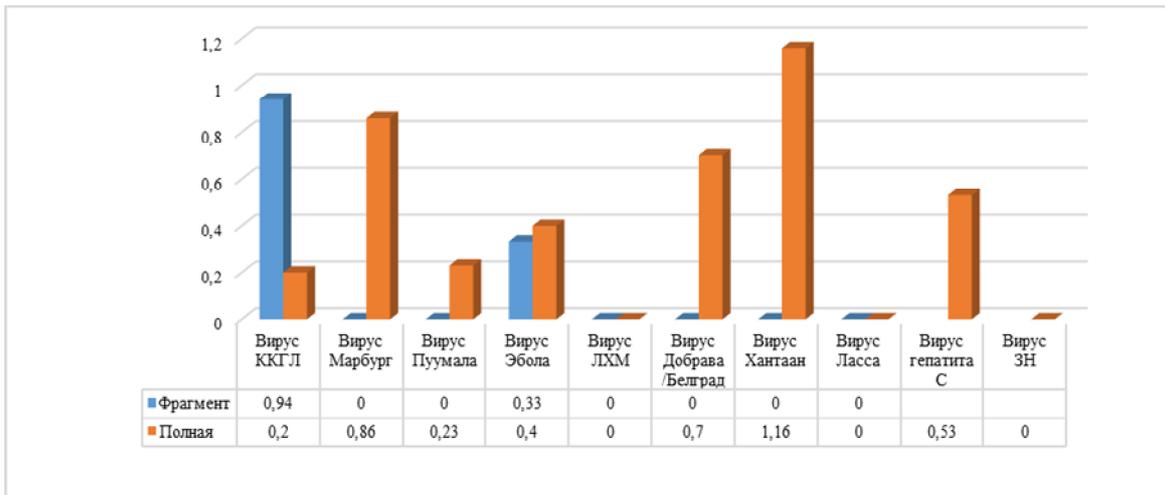


Рисунок 5. – Частота встречаемости CGA кодона в фрагментах вирусных белков

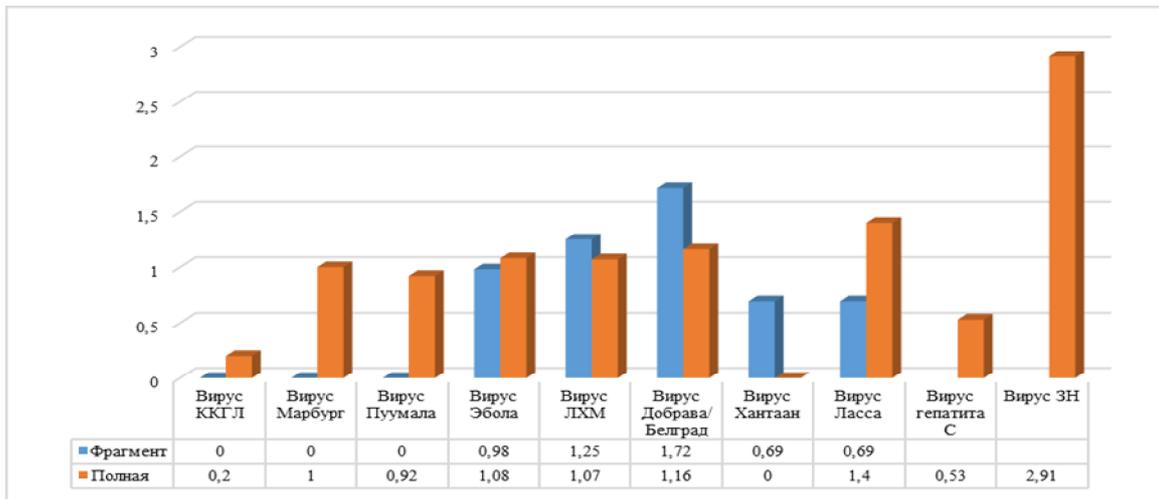


Рисунок 6. – Частота встречаемости STA кодона в фрагментах вирусных белков

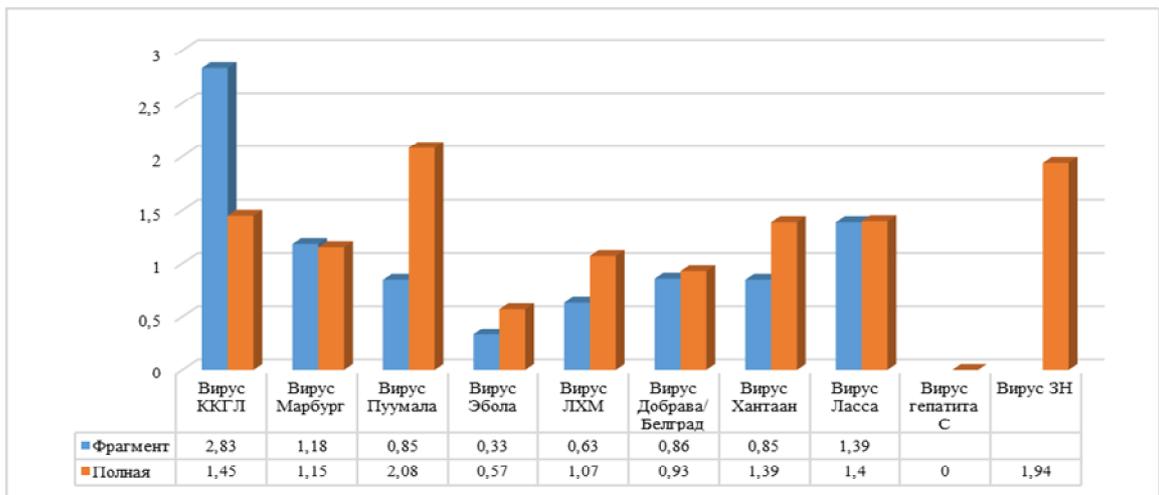


Рисунок 7. – Частота встречаемости ATA кодона в фрагментах вирусных белков

Триплет ССС не встречался в фрагментах трёх вирусов (Пуумала, Добрава/Белград, ККГЛ), максимально представлен у вируса Эбола. Полноразмерный сеге вируса гепатита С содержит максимальное количество ССС триплета (рисунок 8).

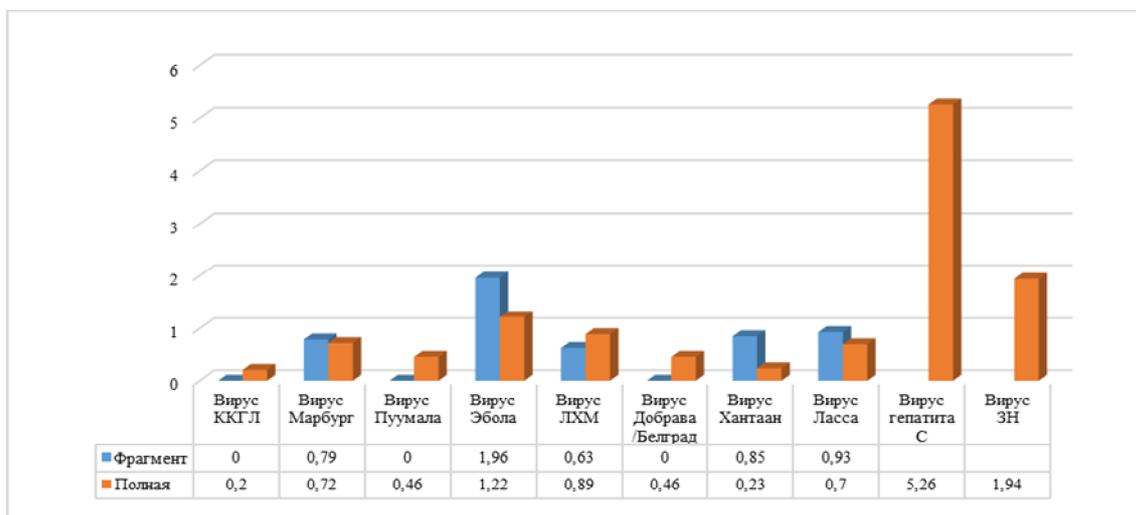


Рисунок 8. – Частота встречаемости ССС кодона в фрагментах вирусных белков

Максимальный вклад триплетного кода GGA обнаруживался во фрагменте вируса Ласса (2,55%) и полноразмерном нуклеокапсиде вируса Западного Нила (3,88%). Для клонированного участка вируса ККГЛ частота встречаемости этого кодона оказалась также достаточно высокой (1,89%) (рисунок 9).

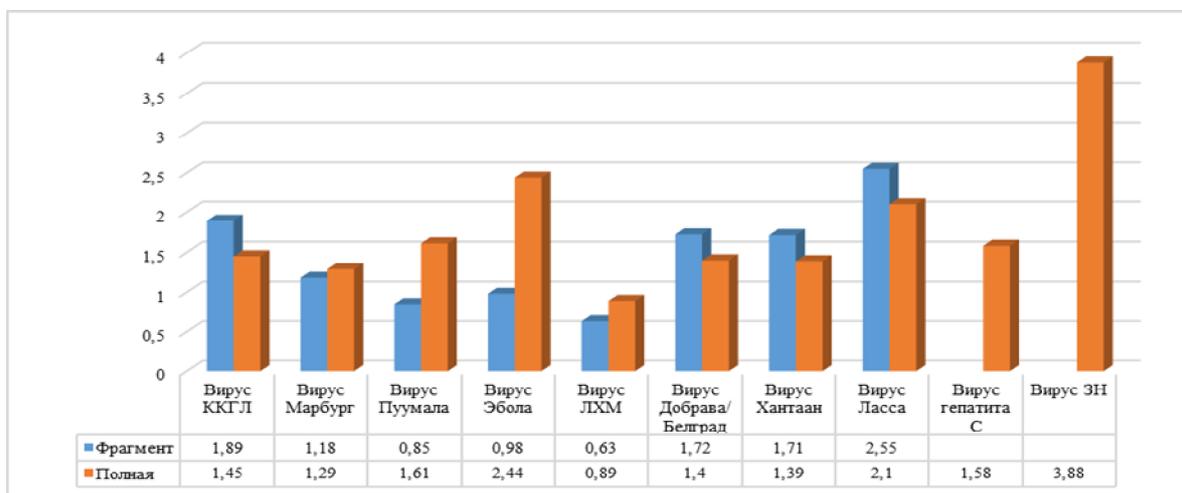


Рисунок 9. – Частота встречаемости GGA кодона в фрагментах вирусных белков

Интересным представлялось также оценить в сравнительном аспекте вирусные последовательности, кодирующие как полноразмерные нуклеокапсидные белки, так и их фрагменты, по содержанию редких кодонов и вкладу их в экспрессию (рисунок 10-11).

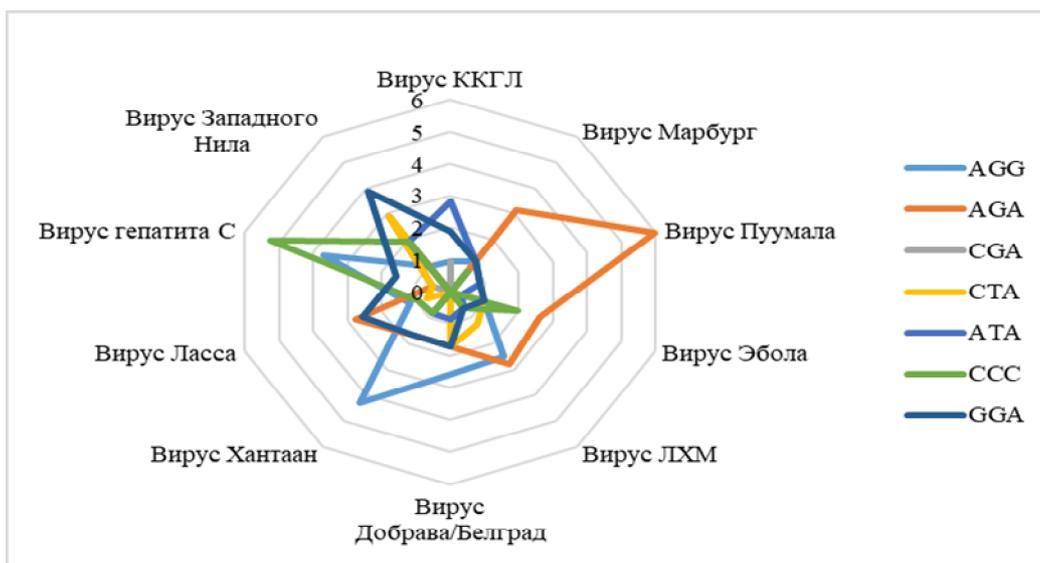


Рисунок 10. – Частота встречаемости редких кодонов в фрагментах нуклеотидной последовательности нуклеокапсидных вирусных белков

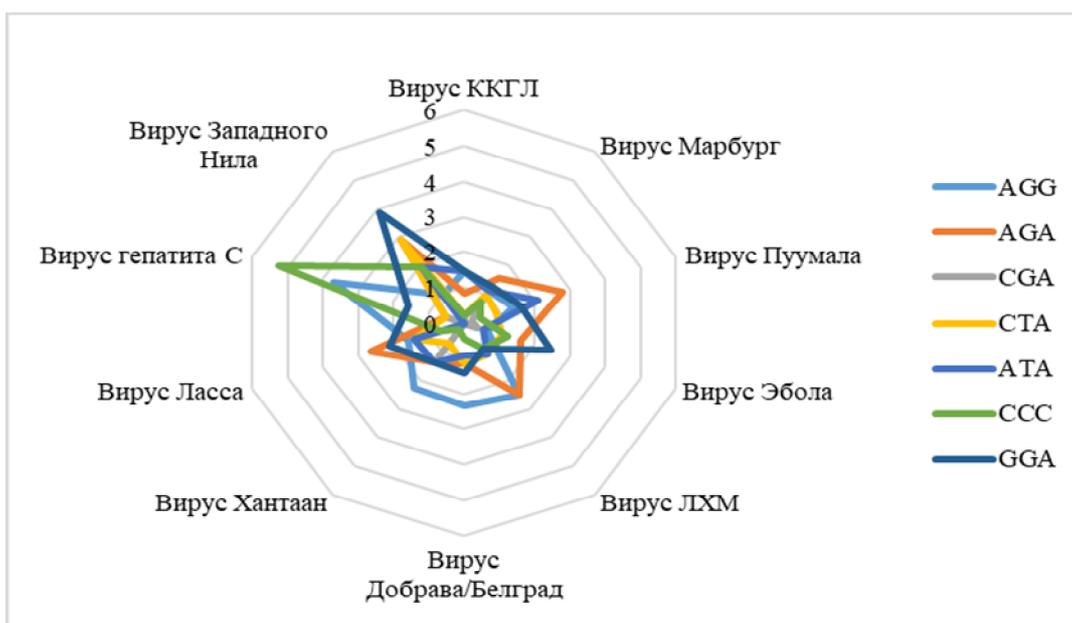


Рисунок 11. – Частота встречаемости редких кодонов в полноразмерных вирусных нуклеокапсидных белках

Этот анализ выявил неравнозначность вклада отдельных кодонов в частоту встречаемости редких кодонов в клонированных фрагментах по сравнению с полноразмерными белками.

Для последовательностей вирусов Пуумала и Хантаан в клонированном участке максимальный вклад вносят AGA и AGG триплеты, соответственно. Для полной нуклеотидной последовательности основная роль принадлежит триплетам CCC и GGC у нуклеокапсидов вирусов гепатита С и Западного Нила, соответственно.

Таким образом, детальный анализ как общей, так и отдельной «покодоновой» частоты встречаемости редких кодонов не выявил существенных различий в оценке общего вклада триплетов в полноразмерные и клонированные участки вирусных белков, хотя по вкладу отдельных триплетов анализируемые последовательности существенно отличаются.

В ходе этого анализа выявились некоторые детали, которые отчасти могут влиять на уровень экспрессии фрагмента нуклеокапсидного белка вируса ККГЛ. Во-первых, эта последовательность по крайней мере по частоте встречаемости двух кодонов (CGA и ATA) занимает лидирующее положение, и по триплету GGA также находится в лидерах. С другой стороны, в ней полностью отсутствуют 3 редких кодона AGA, CTA, CCC, а частота встречаемости самого редкого триплетного кода AGG минимальна в сравнительном аспекте с другими последовательностями. Во-вторых, интересным является тот факт, что триплет CGA превалирует по частоте именно у вируса ККГЛ, и не встречается у большинства, по крайней мере у 6 из 8 проанализированных фрагментов. Концентрирование именно этого кодона в клонированной последовательности с частотой встречаемости 2,83% практически в два раза превышающим эту частоту в полноразмерном нуклеокапсиде (1,45%) может вносить существенный вклад в угнетение экспрессии этого фрагмента.

Необъяснимым остаётся высокий уровень экспрессии полноразмерного нуклеокапсидного белка вируса Западного Нила: эта последовательность включает максимальное количество трёх (GGA AGA CTA) и лидирует ещё по двум триплетам (ATA и CCC) из семи проанализированных.

Развернутый, детальный анализ частоты встречаемости редких кодонов подтверждает сделанный нами ранее вывод, что эта величина не коррелирует с уровнем экспрессии нуклеокапсидных белков по крайней мере десяти выбранных для исследования вирусов. Математический подсчет не позволяет предсказать выход рекомбинантного белка, и его получение необходимо отрабатывать экспериментальным путём в индивидуальном порядке.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам лаборатории биотехнологии и иммунодиагностики особо опасных вирусных инфекций РНПЦ эпидемиологии (лично Семижону П.А. и Счеслёнок Е.П.) за помощь в оценке уровня экспрессии белков.

Литература

1. Tripathi, N.K. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development / N.K. Tripathi, A. Shrivastava // Front. Bioeng. Biotechnol. – 2019. – Vol. 7. – P. 420.
2. Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production / A.M. Vieira Gomes [et al.] // Microorganisms. – 2018. – Vol. 6, No. 2. – P. 38.
3. Engineering the protein secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* enables improved protein production / M. Huang [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2018. – Vol. 115, No. 47. – e11025-e11032.
4. *Pichia pastoris* versus *Saccharomyces cerevisiae*: a case study on the recombinant production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / A.M. Tran [et al.] // BMC Res. Notes. – 2017. – Vol. 10, No. 1. – P. 148.
5. Gómez-Sebastián, S. Significant productivity improvement of the baculovirus expression vector system by engineering a novel expression cassette / S. Gómez-Sebastián, J. López-Vidal, J.M. Escribano // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, No. 5. – e96562.

6. Geisler, C. Adventitious viruses in insect cell lines used for recombinant protein expression / C. Geisler, D.L. Jarvis // *Protein Expr. Purif.* – 2018. – Vol. 144. – P. 25-32.
7. Trends in recombinant protein use in animal production / L. Gifre [et al.] // *Microb. Cell Fact.* – 2017. – Vol. 16, No. 1. – P. 40.
8. Yeast expression systems: overview and recent advances / R. Baghban [et al.] // *Mol. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 61, No. 5. – P. 365-384.
9. Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli* / J.G. Sklar [et al.] // *Genes Dev.* – 2007. – Vol. 21. – P. 2473-2484.
10. Schlapschy, M. Periplasmic chaperones used to enhance functional secretion of proteins in *E. coli* / M. Schlapschy, A. Skerra // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 705. – P. 211-224.
11. DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli* / J. Wild [et al.] // *Genes Dev.* – 1992. – Vol. 6. – P. 1165-1172.
12. Expression of nucleocapsid viral proteins in the bacterial system of *Escherichia coli*: the influence of the codon composition and the uniformity of its distribution within gene / E. G. Fomina [et al.] // *Biotechnologia Acta.* – 2020. – Vol. 13, No. 6. – P. 30-40.

THE INFLUENCE OF RARE CODONS ON THE EXPRESSION OF VIRAL NUCLEOCAPSID PROTEINS AND THEIR FRAGMENTS

Fomina E.G., Grigorieva E.E., Zverko V.V., Rusina V.V.

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

The article presents the results of the analysis of the frequency of occurrence of "rare" for *E. coli* codons, in fragments of nucleocapsid proteins of 10 viruses: Lassa (137R-568V a.a.b.), LCMV (42L-361S a.a.b.), Puumala (1M-117A a.a.b.), Hantaan (1M-117T a.a.b.), Dobrava / Belgrade (1A-117A a.a.b.), CCHF (201C-307A a.a.b.), Ebola (434N-739Q a.a.b.), Marburg (442I-695L a.a.b.), hepatitis C (1M-190S a.a.b.), West Nile (1M-103K a.a.b.), synthesized in the prokaryotic expression system. Their full-size counterparts were used as an object of comparison. A detailed analysis of the frequency of occurrence of rare codons allows us to conclude that this value does not correlate with the expression level of ten nucleocapsid proteins selected for the study. The conditions for obtaining each recombinant protein should be worked out experimentally on an individual basis.

Keywords: expression system, codon, nucleocapsid proteins.

Поступила 29.10.2021

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ПАРВОВИРУСА В19

¹Хрусталёв В.В., ¹Хрусталёва Т.А., ¹Побойнев В.В., ¹Стожаров А.Н., ¹Шалыго Н.В.,
²Самойлович Е.О., ²Ермолович М.А., ²Семейко Г.В.

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

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

Резюме. Статья посвящена предсказанию вторичной структуры рецептор-связывающего домена минорного капсидного белка парвовируса В19 и оценке её стабильности с помощью оригинальных вероятностных алгоритмов PentaFOLD 3.0 и PentUnFOLD. В результате анализа полученных данных сделан вывод о возможности существования рассматриваемого домена как в альфа-спиральной, так и в бета-структурной конформации, предложены последовательности двух синтетических пептидов для дальнейшего спектрального этапа исследования.

Ключевые слова: парвовирус В19, синтетический пептид, рецептор-связывающий домен, вторичная структура, глобозид.

Введение. Клеточным рецептором для парвовируса В19 считается глобозид Gb4Cer, также известный как антиген Р [1]. Описаны и два ко-рецептора: белок Ku80 и $\alpha\beta 1$ -интегрин [2]. Однако последние экспериментальные данные [2] указывают на то, что связывание вириона с клеткой происходит не за счёт глобозида, который, тем не менее, необходим для успешного проникновения вируса в цитоплазму из эндолизосом. Другими словами, клетки, на мембране которых глобозид отсутствует, связываются с парвовирусом В19 и фагоцитируют его, но проникновение вируса в цитоплазму не происходит [2]. Логично предположить, что в рецептор-связывающем домене происходят некоторые структурные перестройки при закислении среды, в результате которых он становится способным к связыванию с глобозидом, что в свою очередь позволяет фосфолипидному домену капсида выполнить свою функцию – подвергнуть гидролизу липиды в мембране эндолизосомы.

Участок капсида, ответственный за связывание с глобозидом, был определён методом направленного мутагенеза [3]. Некоторые аминокислотные замены в N-концевом фрагменте минорного капсидного белка приводят к полной потере способности вируса к проникновению в цитоплазму клетки. Этот же участок известен и в качестве эпитопа, антитела к которому обладают нейтрализующей активностью [4]. Такие антитела должны предотвращать образование комплекса рецептор-связывающего домена с сахарами (остатком N-ацетил-галактозамина и тремя остатками галактозы) глобозида Gb4Cer (гликосфинголипида). Согласно результатам компьютерного моделирования [3] как с помощью методов, основанных на гомологии, так и с помощью методов квантовой химии, на N-конце минорного капсидного белка предсказываются три альфа-спирали. Однако белки, образующие комплексы с гликанами, как правило, имеют бета-структурное строение [5], в связи с чем возникают закономерные сомнения в справедливости альфа-спиральной модели рецептор-связывающего домена парвовируса В19.

Цель исследования – оценить стабильность альфа-спирального и бета-структурного вариантов рецептор-связывающего домена парвовируса В19 с помощью оригинальных методов.

Оценка стабильности элементов вторичной структуры на модели белка с помощью алгоритмов PentaFOLD 3.0 [6] и PentUnFOLD осуществляется на основании вероятност-

ных шкал. Зная границы альфа-спиралей на модели можно оценить, насколько их формирование детерминировано специфическими комбинациями аминокислотных остатков. Сложнее дело обстоит с оценкой стабильности возможной бета-структурной конформации того же фрагмента белка, так как трёхмерная модель её отсутствует. Алгоритм PentUnFOLD позволяет проводить такую оценку, так как пользователь может абсолютно произвольно изменять вторичную структуру исследуемой полипептидной цепи. Новая трёхмерная модель при этом не создаётся, но оценка стабильности элементов вторичной структуры по вероятностным шкалам происходит.

Как ни странно, бета-тяжи становятся способными к переходу в абсолютно неструктурированное состояние (анг. disorder) при аминокислотном составе, отличающемся от такового для альфа-спиралей, обладающих такой же способностью. Получается, что «дверь» в состояние с множеством энергетически близких структурных состояний для альфа-спиралей, бета-тяжей и петель открывается при определённых особенностях аминокислотного состава, которые для них различны. Так один и тот же фрагмент полипептидной цепи может переходить в абсолютно неструктурированное состояние из бета-структурной конформации, но не может – из альфа-спиральной. Поддержание той или иной вторичной структуры осуществляется не только и не всегда за счёт особенностей принимающего её фрагмента белка, но и за счёт влияния контактов с другими фрагментами того же белка. Оценку влияния таких контактов на формирование вторичной структуры белка способен осуществить алгоритм PentUnFOLD 3D.

Материалы и методы исследования. В качестве материала для работы послужила модель N-концевого домена капсидного белка парвовируса B19, которая была получена с помощью сервера SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Для моделирования была использована аминокислотная последовательность минорного капсидного белка (VP1) парвовируса B19, относящегося к субгенотипу 1a1 (код доступа в NCBI: NC_000883).

С помощью оригинальных алгоритмов PentaFOLD 3.0 и PentUnFOLD (<http://chemres.bsmu.by/>), а также метода определения вторичной структуры DSSP [7] и метода PIC [8] для поиска контактов между аминокислотными остатками по трёхмерной структуре белка была проведена оценка стабильности альфа-спиральной конформации рецептор-связывающего домена. Оценка стабильности его бета-структурной конформации осуществлена с помощью алгоритма PentUnFOLD в режиме работы 1D, а также с помощью принудительного перевода первой альфа-спирали в бета-структурное состояние.

Оценка влияния известных аминокислотных замен, снижающих способность вируса к проникновению в цитоплазму [3], на вторичную структуру и на способность перехода белка в абсолютно неструктурированное состояние проведена с помощью алгоритма PentUnFOLD.

Константы кислотности для каждой функциональной группы N-концевого домена капсидного белка парвовируса B19 рассчитаны с помощью метода H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/>), использующего в качестве исходных данных модель трёхмерного строения белка. Описанная выше трёхмерная модель была предварительно подвергнута оптимизации с помощью метода ModRefiner (<https://zhanggroup.org/ModRefiner/>).

Результаты исследования. Согласно алгоритму PentaFOLD 3.0 первая альфа-спираль (Lys144 – Thr131) является метастабильной на протяжении 11 из 18 своих остатков, и только 3 остатка в первом витке являются стабильными (рисунок). Вторая альфа-спираль (Leu135 – Tyr145) имеет стабилизированную поверхность, обращённую в сторону первой и третьей альфа-спиралей. Другая поверхность той же второй альфа-спирали представлена метастабильными остатками (рисунок). Третья альфа-спираль (Pro56 –

Asn69) имеет метастабильное ядро и нестабильные концевые витки (рисунок). Судя по результатам PentaFOLD 3.0, конформация первой и третьей альфа-спиралей поддерживается исключительно за счёт контактов со второй. Вполне вероятно, что исчезновение этих контактов приводит к структурному переходу.

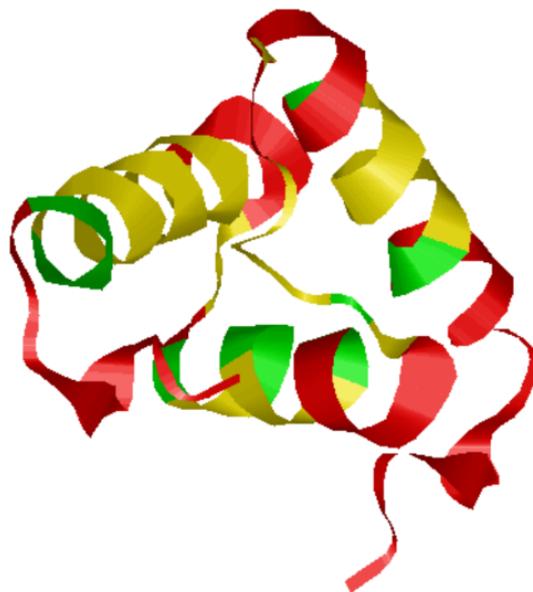


Рисунок. – Модель рецептор-связывающего домена минорного капсидного белка парвовируса B19 (спирали 1 и 3 расположены сверху, слева – направо; спираль 2 – снизу) с обозначенными стабильными (зелёным цветом), метастабильными (жёлтым цветом) и нестабильными (красным цветом) фрагментами согласно PentaFOLD 3.0

Алгоритм PentUnFOLD в своём обычном режиме работы (2D) описал первую и вторую альфа-спирали как стабильные (15 из 18 и 9 из 11 остатков, соответственно), а третью как преимущественно нестабильную (9 из 14 остатков). Единственная последовательность, имеющая склонность к переходу в абсолютно неструктурированное состояние, была найдена в районе N-конца первой альфа-спирали (остатки Ser11 – Lys14). В режиме 3D тот же алгоритм посчитал первую и вторую альфа-спирали структурированными, а склонными к переходу в абсолютно неструктурированное состояние обозначил N-концевую петлю и весь C-концевой фрагмент модели начиная с петли между второй и третьей альфа-спиралями (таблица).

В режиме предсказания вторичной структуры по аминокислотной последовательности алгоритм PentUnFOLD «сделал» рецептор-связывающий домен минорного капсидного белка парвовируса B19 бета-структурным. Два бета-тяжа предсказаны в районе первой альфа-спирали, ещё два – в районе второй. На месте третьей альфа-спирали предсказывается петля. Два спиральных фрагмента имеют длину в три остатка (таблица). Такой длиной может обладать спираль 3/10, но не альфа-спираль. Нельзя не отметить, что все четыре предсказанных бета-тяжа являются стабильными (первый и четвёртый – полностью, второй и третий – преимущественно). При этом многие остатки в этих бета-тяжах обладают способностью переходить в абсолютно неструктурированное состояние (таблица).

Таблица. – Результаты оценки стабильности элементов вторичной структуры на модели рецептор-связывающего домена минорного капсидного белка парвовируса В19.

№	AK	DSS P	2D	2D	1D	1D	3D	№	AK	DSS P	2D	2D	1D	1D	3D
6	G	C					D	43	D	H	HN				D
7	K	C					D	44	H	H	HS				
8	W	C		CE		CE	D	45	Y	H	HS		ES	D	
9	W	C					D	47	I	C		CE	ES		D
10	E	C					D	48	S	C					D
11	S	C		D		D	D	49	L	C					D
12	D	C		D		D	D	50	D	C					D
13	D	C		D		D	D	51	N	C					D
14	K	H	HN	D		D	D	52	P	C					D
15	F	H	HS			CH		53	L	C					D
16	A	H	HS					54	E	C					D
17	K	H	HS					55	N	C					D
18	A	H	HS		HN			56	P	H	HS	D			D
19	V	H	HS		HS			57	S	H	HS				D
20	Y	H	HS		HS			58	S	H	HN				D
21	Q	H	HS					59	L	H	HN				
22	Q	H	HS					60	F	H	HS				
23	F	H	HS					61	D	H	HS			CE	D
24	V	H	HS		ES			62	L	H	HN			CH	D
25	E	H	HS		ES			63	V	H	HS				D
26	F	H	HS		ES	D		64	A	H	HN				D
27	Y	H	HS			CH		65	R	H	HN			CE	D
28	E	H	HN					66	I	H	HN				D
29	K	H	HN					67	K	H	HN				D
30	V	H	HS	D	ES	D		68	N	H	HN		HN		D
31	T	H	HS		ES	D		69	N	H	HN		HN		D
32	G	C		CE	EN	D		70	L	C		CH	HN		D
33	T	C						71	K	C					D
34	D	C						72	N	C					D
35	L	H	HS					73	S	C					D
36	E	H	HS					74	P	C					D
37	L	H	HS					75	D	C					D
38	I	H	HS		ES			76	L	C					
39	Q	H	HS		ES			77	Y	C					
40	I	H	HS		ES			78	S	C		CE		CE	D
41	L	H	HS		EN	D		79	H	C					D
42	K	H	HN		EN	D	D	80	H	C					D

Примечание: Границы элементов вторичной структуры (H – альфа-спираль, E – бета-тяж, C – петля) приведены по DSSP; стабильные остатки в альфа-спиралях (HS), бета-тяжах (ES) и петлях (C), остатки в петлях, склонные к переходу в альфа-спираль (CH) и бета-тяж (CE), остатки в альфа-спиралях (HN) и бета-тяжах (EN), склонные к переходу в петлю, а также остатки, склонные к переходу в абсолютно неструктурированное состояние (D) приведены по PentUnFOLD.

Последствия 15 аминокислотных замен, приводящих к полной или частичной потере способности к проникновению вируса в цитоплазму [3], были оценены как для альфа-спиральной конформации фрагмента Lys14 – Thr31, так и при условии, что он находится в бета-структурном состоянии (в последнем случае 11 остатков из 18 способны переходить в абсолютно неструктурированное состояние).

Для альфа-спиральной конформации 9 из 15 замен приводили к появлению нестабильных остатков (склонных к переходу в петлю), а 6 из 15 – к появлению новых остатков, склонных к переходу в абсолютно неструктурированное состояние. К стабилизации альфа-спирали приводит только одна замена (Tyr27Trp), к уменьшению числа остатков, склонных к переходу в disorder – только замена Phe15Trp. Две замены (Phe15Cys и Tyr20Trp) не имели никаких структурных последствий.

Для бета-структурной конформации 5 из 15 замен дестабилизировали бета-тяжи, а 2 – стабилизировали; только одна замена увеличивала количество остатков, способных к переходу в абсолютно неструктурированное состояние, а 11 из 15 – наоборот – снижали. Получается, что снижение способности к образованию устойчивого комплекса с глобозидом часто связано с повышением вероятности перехода альфа-спиральной конформации рецептор-связывающего домена в петлю или абсолютно неструктурированное состояние. В то же время, бета-структурная конформация в результате таких замен часто становится менее склонной к переходу в абсолютно неструктурированное состояние. Способность к «подстройке» рецептора под лиганд приписывается именно тем фрагментам белка, которые способны переходить в абсолютно неструктурированное состояние. В нашем случае замены снижают конформационную лабильность именно бета-структурного варианта рецептор-связывающего домена, повышая её для конформации альфа-спиральной. Полученные результаты являются косвенным свидетельством того, что при закислении среды рассматриваемый домен должен существовать в бета-структурной форме.

«Сенсором» рН в белках при закислении среды от 7,4 до 5,0 выступают функциональные группы аминокислотных остатков, рКа которых находится в районе 6. В таком случае при рН=7,4 эти функциональные группы преимущественно депротонированы, а при рН=5,0 – преимущественно протонированы. Согласно методу Н⁺⁺ на оптимизированной альфа-спиральной структуре рецептор-связывающего домена таким сенсором может выступать His43 (рКа = 6,675). Этот остаток гистидина расположен во второй альфа-спирали, где его боковая цепь сближена с атомом кислорода из пептидной связи Leu36 и с карбоксильной группой Asp39. Протонирование атома азота из боковой цепи His43 при закислении среды теоретически может приводить к изменению паттерна водородных связей, и, следовательно, к понижению стабильности второй альфа-спирали, а значит, и альфа-спиральной конформации всего домена.

Обсуждение. Интересна гипотеза о том, как первичное связывание с глобозидом с помощью мажорного капсидного белка вызывает структурную перестройку в капсиде парвовируса В19, в результате чего вирус от поверхности клетки отсоединяется, а затем связывается с глобозидом вновь, но уже с помощью освобождённого N-конца минорного капсидного белка [9]. Эта гипотеза подтверждается тем, что глобозид связывается с мажорным капсидным белком по результатам криоэлектронной микроскопии [10].

Иммунологические эксперименты [4] свидетельствуют о структурной изменчивости N-конца минорного капсидного белка. Так, антитела, способные к связыванию с полноразмерным белком, могут не связываться с его N-концевым доменом (остатки 1 – 94). При этом нейтрализующей активностью могут обладать как те антитела, которые связываются исключительно с N-концевым доменом (но не с полноразмерным белком), так

и те, которые связываются только с полноразмерным белком. Антитела к пептиду, соответствующему второй альфа-спирали, перекрёстно реагируют с N-концевым доменом, а антитела к пептиду, соответствующему большей части первой альфа-спирали – только с полноразмерным белком. При этом иммунизация кроликов N-концевым доменом привела к выработке нейтрализующих антител в высоком титре [4]. По всей видимости, антитела, обладающие высоким сродством к разным конформациям рецептор-связывающего домена, могут обладать нейтрализующей активностью. Это говорит о том, что определённые структурные переходы происходят в данном домене ещё до попадания вируса в эндолизосому: по-видимому, после первой попытки вируса провзаимодействовать с глобозидом или после связывания с ко-рецептором. Известен конформационный эпитоп для моноклональных антител, обладающих нейтрализующей активностью: Val30 – Lys42 [11]. Интересно отметить, что он полностью включает предсказанные с помощью PentUnFOLD второй и третий бета-тяжи и петлю между ними.

Создание пептидной вакцины против парвовируса В19 на основе фрагмента рецептор-связывающего домена затруднено по причине его конформационной неустойчивости. Однако информация о вторичной структуре пептидов, соответствующих ему, имеет ценность как для изучения механизма проникновения вируса в цитоплазму, так и для разработки низкомолекулярных блокаторов этого процесса. Поскольку с глобозидом непосредственно должна связываться первая альфа-спираль рассматриваемого домена [3], имеет смысл проверить, какую вторичную структуру имеет соответствующий ей пептид (Asp13 – Thr31, сокращённо – DT19). Так как первая альфа-спираль является метастабильной, вполне вероятно, что в отсутствие второй альфа-спирали данный фрагмент полипептидной цепи образует петлю или бета-структуру. Судя по оптимизированной трёхмерной структуре рецептор-связывающего домена, одним из контактов, стабилизирующих первую альфа-спираль, является водородная связь между боковой цепью Lys29 и боковой цепью Glu25. Рассчитанное значение рKa для последней составляет 4,743. Так что протонирование карбоксильной группы Glu25 при низком значении pH может способствовать структурному переходу первой альфа-спирали и соответствующего ей пептида в бета-структурное состояние или в петлю.

Среди 15 аминокислотных замен в районе первой альфа-спирали только 2 приводили к полной потере вирусом способности к интернализации: Ala16Ser и Tyr20Trp [3]. Если первая замена должна приводить к дестабилизации альфа-спирали и стабилизации бета-тяжа, то вторая отличается отсутствием всяких последствий для вторичной структуры. Единственным результатом замены Tyr20Trp является снижение способности бета-тяжа к переходу в абсолютно неструктурированное состояние. Вполне вероятно, что именно тирозин, а не триптофан в данном положении необходим для связывания с углеводной цепью глобозида. С целью проверки этой гипотезы является целесообразным синтез пептида, соответствующего первой альфа-спирали рецептор-связывающего домена с заменой Tyr20Trp (DT19 Y20W).

Заключение. Рецептор-связывающий домен минорного капсидного белка парвовируса В19 обладает особенностями аминокислотной последовательности, позволяющими ему существовать как в альфа-спиральном, так и в бета-структурном состоянии. При этом бета-структурный вариант этого домена в большей степени склонен к переходу в абсолютно неструктурированное состояние, чем альфа-спиральный. Большинство известных аминокислотных замен, нарушающих процесс проникновения вируса в цитоплазму, понижают способность бета-структурного варианта рецептор-связывающего домена к переходу в абсолютно неструктурированное состояние, а, следовательно, к изменению конформации в процессе формирования комплекса с рецептором.

Литература

1. Parvovirus B19 VLP recognizes globoside in supported lipid bilayers / W. Nasir [et al.] // *Virology*. – 2014. – Vol. 456-457. – P. 364-369.
2. Human parvovirus B19 interacts with globoside under acidic conditions as an essential step in endocytic trafficking / J. Bieri [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2021. – Vol. 17. – e1009434.
3. The receptor-binding domain in the VP1u region of parvovirus B19 / R. Leisi [et al.] // *Viruses*. – 2016. – Vol. 8. – P. 61.
4. Peptides derived from the unique region of B19 parvovirus minor capsid protein elicit neutralizing antibodies in rabbits / S. Anderson [et al.] // *Virology*. – 1995. – Vol. 206. – P. 626-632.
5. Chemical biology of the sugar code / H.J. Gabius [et al.] // *Chembiochem*. – 2004. – Vol. 5. – P. 740-764.
6. Khrustalev, V.V. The PentaFOLD 3.0 Algorithm for the selection of stable elements of secondary structure to be included in vaccine peptides / V.V. Khrustalev // *Protein Pept. Lett.* – 2021. – Vol. 28. – P. 573-588.
7. Kabsch, W. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features / W. Kabsch, C. Sander // *Biopolymers*. – 1983. – Vol. 22. – P. 2577-2637.
8. Tina, K.G. PIC: Protein Interactions Calculator / K.G. Tina, R. Bhadra, N. Srinivasan // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35. – P. W473-W476.
9. The globoside receptor triggers structural changes in the B19 virus capsid that facilitate virus internalization / C. Bönsch [et al.] // *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84. – P. 11737-11746.
10. Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor / P.R. Chipman [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1996. – Vol. 93. – P. 7502-7506.
11. The VP1-unique region of parvovirus B19: amino acid variability and antigenic stability / S. Dorsch [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2001. – Vol. 82. – P. 191-199.

SECONDARY STRUCTURE OF THE PARVOVIRUS B19 RECEPTOR-BINDING DOMAIN

¹Khrustalev V.V., ¹Khrustaleva T.A., ¹Poboinev V.V., ¹Stojarov A.N.,
¹Shalygo N.V., ²Samoilovich E.O., ²Yermalovich M.A., ²Semeiko G.V.

¹*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

²*Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology», Minsk, Republic of Belarus*

The article is about the prediction of secondary structure of the receptor-binding domain of Parvovirus B19 minor capsid protein and the evaluation of its stability with the help of original probability-based algorithms PentaFOLD 3.0 and PentUnFOLD. Based on the analysis of obtained results we have come to the conclusion that studied domain can exist in both alpha-helical and beta-structural conformations, amino acid sequences of two synthetic peptides have been proposed for the forthcoming spectroscopic step of the study.

Keywords: parvovirus B19, synthetic peptide, receptor-binding domain, secondary structure, globoside.

Поступила 15.10.2022

ДИЗАЙН СИНТЕТИЧЕСКОГО ВАКЦИННОГО ПЕПТИДА, СООТВЕТСТВУЮЩЕГО ФОСФОЛИПАЗНОМУ ДОМЕНУ КАПСИДНОГО БЕЛКА ПАРВОВИРУСА В19

¹Хрусталёв В.В., ¹Хрусталёва Т.А., ¹Побойнев В.В., ¹Стожаров А.Н., ¹Шалыго Н.В.,
²Самойлович Е.О., ²Ермолович М.А., ²Семейко Г.В.

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

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

Резюме. В статье приведены результаты оценки стабильности элементов вторичной структуры на модели домена минорного капсидного белка парвовируса В19, обладающего активностью фосфолипазы А2, с помощью оригинальных вероятностных алгоритмов PentaFOLD 3.0 и PentUnFOLD. Полученные данные в совокупности со сведениями о строении активного центра этого фермента и о результатах иммунизации кроликов соответствующими пептидами позволили предложить новый синтетический антиген для вакцинопрофилактики парвовирусной инфекции.

Ключевые слова: парвовирус В19, синтетический пептид, фосфолипаза А2, вторичная структура, антифосфолипидный синдром.

Введение. Синтетическая вакцина включает в себя лишь отдельный фрагмент белка патогенного микроорганизма, то есть, пептид [1]. Сокращение размеров антигена должно способствовать выработке антител только к определённой части поверхности полноразмерного белка. Таким образом можно добиться высокой эффективности иммунизации при условии того, что «мишень» для выработки антител играет решающую роль в жизненном цикле возбудителя [1].

Известно, что минорный капсидный белок парвовируса В19 содержит домен, обладающий фосфолипазной активностью. С помощью такой «встроенной» фосфолипазы А2 вирусу удаётся разрушать мембрану эндолизосомы и проникать в цитоплазму [2]. Антитела, образующие высокоаффинный комплекс с фосфолипазным доменом, устойчивый в кислой среде эндолизосом, должны препятствовать проникновению вируса в цитоплазму. Иммунизация полноразмерным фосфолипазным доменом капсидного белка парвовируса В19 могла бы быть эффективным способом вакцинопрофилактики, если бы на комплекс этого домена с кардиолипином не вырабатывались антитела, запускающие аутоиммунное заболевание – антифосфолипидный синдром [3]. Решить эту проблему можно путём исключения из состава вакцинного пептида фрагментов, способных к связыванию с кардиолипином, а также путём лишения этого домена фосфолипазной активности. Несмотря на отсутствие трёхмерной структуры рассматриваемого домена в международном банке данных Protein Data Bank, работы по направленному мутагенезу и по сравнению аминокислотной последовательности домена с гомологичными позволили с высокой долей вероятности определить остатки, образующие активный центр фермента, а также гидрофобный фрагмент, способный к связыванию с клеточной мембраной [4]. Однако помимо этого для дизайна качественного вакцинного пептида необходимы сведения об устойчивости элементов вторичной структуры рассматриваемого белка. Известно, что некоторые элементы вторичной структуры (альфа-спирали и бета-тяжи) выполняют роль «каркаса» в процессе формирования домена: остальные фрагменты полипептидной цепи приобретают свою структуру, образуя многочисленные контакты с теми участками, конформация которых строго детерминирована за счёт особенностей аминокислотной последовательности [5]. То есть, при исключении «активных» фрагментов

аминокислотной последовательности из состава домена его конечная конформация может существенно отличаться от исходной. Если же исключить из состава домена только некоторые «пассивные» элементы вторичной структуры, его поверхность будет близка к таковой для полноразмерного полипептида, и антитела, выработанные к нему, будут распознавать белок патогена.

Для решения вопроса о том, воспроизведётся ли вторичная структура полноразмерного белка в составе пептида, нами были разработаны компьютерные алгоритмы PentaFOLD и PentUnFOLD. Принцип работы алгоритма PentaFOLD заключается в поиске пентапептидов (фрагментов аминокислотной последовательности длиной в пять остатков), полностью соответствующих по своему составу элементу вторичной структуры, в который они включены, частично соответствующих и не соответствующих вообще [5]. Фактически, алгоритм классифицирует аминокислотные остатки, находящиеся в середине пентапептида, на стабильные, мета-стабильные и нестабильные. Вероятностные шкалы для работы алгоритма были получены в результате анализа 1730 трёхмерных структур негомологичных друг другу белков. Алгоритм PentUnFOLD основан на анализе различающихся друг от друга трёхмерных структур одних и тех же белков. Данный алгоритм был написан в результате обработки 2116 3D структур белков различных структурных классов. Именно при таком сравнении и были выявлены особенности аминокислотных последовательностей, действительно способных образовывать разные элементы вторичной структуры. Алгоритм дифференцирует те фрагменты, которые могут существовать в одном из двух структурных состояний (в альфа-спирали или в петле; в бета-тяже или в петле) от фрагментов, которые могут переходить в абсолютно неструктурированное состояние (англ. disorder). Последние фрагменты «исчезают» с трёхмерных структур, так как существуют в разных конформациях у разных молекул белка в одном и том же кристалле (если речь идёт о результатах рентгеноструктурного анализа) или в одном и том же растворе (если речь идёт о результатах установления структуры белка методом ядерно-магнитного резонанса). Алгоритм PentUnFOLD работает в трёх режимах: исключительно по аминокислотной последовательности, с использованием результатов установления вторичной структуры, с использованием результатов поиска взаимодействий между аминокислотными остатками. В первом случае моделируется процесс ренатурации – приобретения белком вторичной структуры после полной её потери. Во втором случае алгоритм использует сведения о границах альфа-спиралей и бета-тяжей на трёхмерной структуре белка, полученные с помощью метода DSSP [6]. В третьем случае используются ещё и результаты поиска водородных связей, ионных и Ван-дер-Ваальсовых контактов между аминокислотными остатками: оценивается взаимное влияние устойчивых и неустойчивых фрагментов полипептидной цепи друг на друга.

Целью работы явился отбор наиболее устойчивых элементов вторичной структуры фосфолипазного домена капсидного белка парвовируса B19 для включения их в состав вакцинного пептида.

Материалы и методы исследования. В качестве материала для работы послужила модель фосфолипазного домена минорного капсидного белка парвовируса B19, которая была получена с помощью сервера SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Для моделирования была использована аминокислотная последовательность минорного капсидного белка (VP1) референсного штамма парвовируса B19 (код доступа в NCBI: NC_000883), принадлежащего к субгенотипу 1a1.

В качестве методов исследования использованы оригинальные алгоритмы PentaFOLD 3.0 и PentUnFOLD (<http://chemres.bsmu.by/>), а также метод определения вторичной структуры DSSP [6] и метод поиска контактов между аминокислотными остатками по трёхмерной структуре белка под названием PIC [7].

Результаты исследования. Модель фрагмента капсидного белка парвовируса В19, обладающего фосфолипазной активностью, включает три коротких альфа-спирали и петли между ними. Такая вторичная структура присуща как аналогичным фрагментам капсида адено-ассоциированных вирусов, так и фосфолипазам А2 прокариот и эукариот. Для ответа на вопрос о том, насколько стабильными являются альфа-спирали и петли рассматриваемого фрагмента капсида парвовируса В19, нами были применены четыре оригинальных подхода.

Согласно алгоритму PentaFOLD 3.0 первая альфа-спираль (Ser144 – Asp154) включает четыре стабильных пентапептида, два метастабильных пентапептида и нестабильные участки – на N- и С-конце, а также во втором витке (рисунок). Вторая альфа-спираль (Ala174 – Lys183) кажется более устойчивой, чем первая, так как её центральный фрагмент (шесть аминокислотных остатков) полностью стабилен, а нестабильными являются только два N-концевых и два С-концевых остатка. Третья альфа-спираль (Val193 – Thr198) является мета-стабильной на всём своём протяжении, так как состоит из аминокислотных остатков, характерных для бета-тяжей, но расположенных друг за другом так, как это обычно происходит в альфа-спиралях: два гидрофобных остатка через два гидрофильных остатка. Длинная петля между первой и второй альфа-спиралями обладает двумя стабильными фрагментами и тремя мета-стабильными, в то время как 13 остатков из 21 признаны нестабильными, так как не соответствуют характерным особенностям петли между двумя альфа-спиралями. Короткая петля между второй и третьей альфа-спиралями обладает мета-стабильным фрагментом с соответствующим петлям между двумя альфа-спиралями чередованием гидрофильных и гидрофобных остатков (рисунок).



Рисунок. – Модель фосфолипазного домена минорного капсидного белка парвовируса В19 (спирали 1–3 расположены последовательно: слева направо) с обозначенными стабильными (зелёным цветом), мета-стабильными (жёлтым цветом) и нестабильными (красным цветом) фрагментами согласно PentaFOLD 3.0

Алгоритм PentUnFOLD проклассифицировал 6 из 11 остатков, включённых в состав первой альфа-спирали, как стабильные. Во второй альфа-спирали 5 остатков из 10 были проклассифицированы таким же образом, но остатки на N- и С-концах этой альфа-спирали были признаны склонными к переходу в полностью неструктурированное состояние (таблица). В третьей альфа-спирали 4 из 6 остатков были признаны нестабиль-

Таблица. – Результаты оценки стабильности элементов вторичной структуры на модели фосфолипазного домена минорного капсидного белка парвовируса В19

№	AK	DSSP	2D	2D	1D	1D	3D	№	AK	DSSP	2D	2D	1D	1D	3D
123	V	C					D	161	A	C					D
124	Q	C					D	162	K	C					D
125	L	C					D	163	L	C		CH		CH	D
126	P	C					D	164	G	C		CE		CE	D
127	G	C					D	165	I	C		C		C	D
128	T	C					D	166	N	C					D
129	N	C						167	P	C		CE		CE	D
130	Y	C						168	Y	C					D
131	V	C						169	T	C					D
132	G	C					D	170	H	C					D
133	P	C					D	171	W	C		CE	EN		D
134	G	C					D	172	T	C		CE	ES		D
135	N	C					D	173	V	C		CE	ES		D
136	E	C		CH		CH	D	174	A	H	HS				D
137	L	C					D	175	D	H	HN	D			D
138	Q	C					D	176	E	H	HN	D	HS	D	D
139	A	C					D	177	E	H	HN		HS		D
140	G	C					D	178	L	H	HS		HS		D
141	P	C					D	179	L	H	HS		HS		D
142	P	C					D	180	K	H	HS		HS		D
143	Q	C					D	181	N	H	HN		HN		D
144	S	H	HN				D	182	I	H	HS	D	HN	D	D
145	A	H	HS				D	183	K	H	HN	D			D
146	V	H	HN				D	184	N	C					D
147	D	H	HS					185	E	C		D		D	D
148	S	H	HS					186	T	C		D		D	D
149	A	H	HS					187	G	C					D
150	A	H	HS					188	F	C					D
151	R	H	HS					189	Q	C					D
152	I	H	HN				D	190	A	C					D
153	H	H	HN				D	191	Q	C		CE	EN		D
154	D	H	HN				D	192	V	C		CE	ES	D	D
155	F	C		CE	ES	D	D	193	V	H	HN				D
156	R	C		CE	EN		D	194	K	H	HN				D
157	Y	C		CE	EN		D	195	D	H	HN				D
158	S	C					D	196	Y	H	HN				D
159	Q	C		CH	HS		D	197	F	H	HS			CE	D
160	L	C		CH	HS		D	198	T	H	HS				D

Примечание: Границы элементов вторичной структуры (H – альфа-спираль, E – бета-тяж, C – петля) приведены по DSSP; стабильные остатки в альфа-спиралях (HS), бета-тяжах (ES) и петлях (C), остатки в петлях, склонные к переходу в альфа-спираль (CH) и бета-тяж (CE), остатки в альфа-спиралях (HN) и бета-тяжах (EN), склонные к переходу в петлю, а также остатки, склонные к переходу в абсолютно неструктурированное состояние (D) приведены по PentUnFOLD.

ными, то есть, склонными к переходу в состояние петли. Интересно отметить, что в длинной N-концевой петле только один остаток был признан склонным к переходу в альфа-спиральное состояние, а в петле между первой и второй спиралью подавляющее большинство остатков склонны к переходу в альфа-спираль или в бета-структуру (таблица), что не характерно для петли между второй и третьей альфа-спиралями.

Алгоритм PentUnFOLD может оценивать возможность формирования вторичной структуры белком в процессе ренатурации. Согласно таким предсказаниям только вторая альфа-спираль может восстановиться после полного перехода рассматриваемого белка в состояние петли. При этом на месте петли между первой и второй альфа-спиралями будет образовываться бета-структура, так же, как и в конце петли между второй и третьей альфа-спиралями (таблица).

Алгоритм PentUnFOLD 3D, учитывающий наличие контактов между аминокислотными остатками на трёхмерной структуре, признал структурно-стабильной только первую альфа-спираль и короткий фрагмент N-концевой петли. Такие результаты обусловлены тем, что фрагмент Asn129 – Val131 этой петли образует контакты со стабильным ядром первой альфа-спирали. Большое количество контактов имеется и между первой и второй альфа-спиралями. Вторая же альфа-спираль, в отличие от первой, взаимодействует ещё и с третьей альфа-спиралью. Так как последняя нестабильна, алгоритм не предсказывает как стабильную и вторую, контактирующую с ней, альфа-спираль, несмотря на наличие в той некоторых стабильных по алгоритму PentUnFOLD 2D остатков.

Полученные данные о стабилизации вторичной структуры фосфолипидного домена минорного капсидного белка парвовируса B19 заставляют исключить из состава вакцинного пептида следующие фрагменты: N-концевую петлю, часть петли между первой и второй альфа-спиралями, третью альфа-спираль вместе с петлёй между ней и второй альфа-спиралью. При таком дизайне антигена вторая альфа-спираль будет контактировать исключительно с первой, что приведёт к их взаимной стабилизации. Если исключить из состава петли между первой и второй альфа-спиралями фрагмент Leu160 – His170, укороченная петля будет в большей степени соответствовать петлям между двумя альфа-спиралями. Вместо удалённого фрагмента при этом необходимо будет ввести остаток глицина, который способствует повороту полипептидной цепи.

Обсуждение. В последних статьях среди возможных антивирусных агентов, которые в будущем могут быть использованы в борьбе с парвовирусной инфекцией, упоминаются гидроксимочевина, аналоги нуклеотидов, производные кумарина и некоторые флавоноиды [8]. Исследования по разработке вакцинных пептидов против парвовируса B19, начавшиеся в 1990-е годы [2], так и не привели к созданию эффективной вакцины. Согласно опубликованным результатам иммунизации кроликов 22-мерными пептидами, соответствующими фосфолипидному домену, перспективы таких разработок имеются. Важно подчеркнуть, что антитела к 22-мерному пептиду, включающему N-концевую петлю домена, обладали очень низкой нейтрализующей активностью как в случае использования чистого пептида, так и в случае использования его конъюгата с носителем [2]. Пептид, включающий первую альфа-спираль и фрагмент следующей за ней петли, наоборот, вызывал выработку нейтрализующих антител не только будучи ковалентно пришитым к носителю, состоящему из разветвлённого полилизина, но и сам по себе [2]. Пептид, содержащий петлю между первой и второй альфа-спиралью и первую половину последней, так же, как и пептид, содержащий всю вторую альфа-спираль, следующую за ней петлю и половину третьей альфа-спирали, вызывали выработку нейтрализующих антител только будучи пришитыми к носителю [2]. Упомянутые выше результаты иммунологических экспериментов согласуются с данными, полученными в настоящей работе. Так, именно первая альфа-спираль не способна к переходу в полностью неструктурированное состояние, согласно PentUnFOLD 3D (таблица), благодаря чему содержащий её

пептид сохранил соответствующую конформацию. Вторая альфа-спираль сохраняла свою конформацию только при конъюгации соответствующего пептида с носителем. Пептид, синтез которого запланирован в нашем проекте, обладает уникальными свойствами по сравнению с ранее протестированными: он одновременно содержит первую и вторую альфа-спирали, соединённые укороченной петлёй, лишённой гидрофобного фрагмента.

Известны данные о том, что сам по себе уникальный фрагмент минорного капсидного белка (VPu) обладает повреждающим эффектом на клетки миокарда мышей [9], а не только антитела к нему [10]. Действительно, рекомбинантный VPu минорного капсидного белка способен проникать в клетки эритроидного ростка, а его N-концевой домен (остатки 5 – 68) делает это в 5 раз эффективней [11]. Способность к интернализации, в первом случае обусловленная фосфолипазной активностью, а во втором случае – связыванием с клеточным рецептором, крайне нежелательна для вакцинных пептидов. В данной разработке особое внимание уделяется лишению фосфолипазного домена каталитической активности. Во-первых, в запланированном к синтезу пептиде отсутствует структурно нестабильный фрагмент петли [4], непосредственно связывающийся с мембраной. Во-вторых, остатки, играющие важную роль в работе активного центра фермента (Tyr130 и Gly132) [4], находящиеся в петле перед первой альфа-спиралью, также не войдут в его состав.

Заключение. Синтетические пептиды, антитела к которым обладают нейтрализующей активностью, содержат стабильные элементы вторичной структуры. Оценить стабильность – способность к воспроизведению в составе коротких пептидов – элементов вторичной структуры можно с помощью вероятностных методов. В составе фосфолипазного домена капсидного белка парвовируса B19, согласно алгоритмам PentaFOLD 3.0 и PentUnFOLD, таковыми являются первая и вторая альфа-спирали. Петля между этими альфа-спиралями склонна к структурным переходам, в связи с чем при дизайне вакцинного пептида длина её должна быть сокращена.

Литература

1. Peptide vaccine: Progress and challenges / W. Li [et al.] // *Vaccines*. – 2014. – Vol. 2. – P. 515-536.
2. Peptides derived from the unique region of B19 parvovirus minor capsid protein elicit neutralizing antibodies in rabbits / S. Anderson [et al.] // *Virology*. – 1995. – Vol. 206. – P. 626-632.
3. Antiphospholipid antibodies in pediatric and adult patients with rheumatic disease are associated with parvovirus B19 infection / P. Von Landenberg [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2003. – Vol. 48. – P. 1939-1947.
4. The determinants for the enzyme activity of human parvovirus B19 phospholipase A2 (PLA2) and its influence on cultured cells / X. Deng [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – e61440.
5. Khrustalev, V.V. The PentaFOLD 3.0 Algorithm for the selection of stable elements of secondary structure to be included in vaccine peptides / V.V. Khrustalev // *Protein Pept. Lett.* – 2021. – Vol. 28. – P. 573-588.
6. Kabsch, W. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features / W. Kabsch, C. Sander // *Biopolymers*. – 1983. – Vol. 22. – P. 2577-2637.
7. Tina, K.G. PIC: Protein Interactions Calculator / K.G. Tina, R. Bhadra, N. Srinivasan // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35. – P. W473–W476.
8. Manaresi, E. Advances in the development of antiviral strategies against parvovirus B19 / E. Manaresi, G. Gallinella // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – P. 659.
9. Effect of N-terminal region of human parvovirus B19-VP1 unique region on cardiac injury in naïve mice / K.C. Hung [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2021. – Vol. 24. – P. 759.
10. Increased cardiac injury in NZB/W F1 mice received antibody against human parvovirus B19 VP1 unique region protein / B.S. Tzang [et al.] // *Mol. Immunol.* – 2011. – Vol. 48. – P. 1518-1524.

11. The N-terminal 5-68 amino acids domain of the minor capsid protein VP1 of human parvovirus B19 enters human erythroid progenitors and inhibits B19 infection / W. Zou [et al.] // J. Virol. – 2021. – Vol. 95. – e00466-21.

DESIGN OF SYNTHETIC VACCINE PEPTIDE CORRESPONDING TO PHOSPHOLIPASE DOMAIN OF PARVOVIRUS B19 CAPSID PROTEIN

**¹Khrustalev V.V., ¹Khrustaleva T.A., ¹Poboinev V.V., ¹Stojarov A.N.,
¹Shalygo N.V., ²Samoilovich E.O., ²Yermalovich M.A., ²Semeiko G.V.**

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

²Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology», Minsk, Republic of Belarus

In the article the results of the evaluation of secondary structure elements stability by original probability-based algorithms PentaFOLD 3.0 and PentUnFOLD for the model of the Parvovirus B19 minor capsid protein domain possessing phospholipase A2 activity are provided. Obtained results taken together with the data on the structure of active center of that enzyme and on the results of immunization of rabbits by corresponding peptides allowed us to suggest a new synthetic vaccine antigen against Parvovirus B19 infection.

Keywords: parvovirus B19, synthetic peptide, phospholipase A2, secondary structure, antiphospholipid syndrome.

Поступила 15.10.2022

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСА КАРДИОЛИПИНА И ДОМЕНА КАПСИДНОГО БЕЛКА ПАРВОВИРУСА В19, ОБЛАДАЮЩЕГО ФОСФОЛИПАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

¹Хрусталёв В.В., ¹Хрусталёва Т.А., ¹Побойнев В.В., ¹Стожаров А.Н., ¹Шальго Н.В.,
²Самойлович Е.О., ²Ермолович М.А., ²Семейко Г.В.

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

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

Резюме. Дизайн вакцинных пептидов для иммунизации против парвовируса В19 должен включать дополнительный этап – поиск фрагментов капсида, способных к связыванию с кардиолипином, с целью исключения их из состава синтетических антигенов. Наиболее вероятный сайт связывания кардиолипина с фосфолипазным доменом капсидного белка (остатки Leu160 – Thr169) найден с помощью молекулярного докинга. Предложен пептид SK30, иммунизация которым не должна провоцировать развитие антифосфолипидного синдрома.

Ключевые слова: парвовирус В19, синтетический пептид, фосфолипаза А2, кардиолипин, антифосфолипидный синдром.

Введение. Парвовирус В19 представляет собой патоген, способный вызывать как острую, так и хроническую инфекцию, а также запускать развитие аутоиммунных системных заболеваний. Антитела к парвовирусу В19 обнаруживаются у 50% 15-летних подростков [1] и у 55 – 70% женщин во время первой беременности [2]. Острая парвовирусная инфекция у детей раннего возраста может проявляться в виде инфекционной эритемы и апластического криза, а у беременных может привести к самопроизвольному аборту, развитию неиммунной водянки плода, его внутриутробной гибели [2]. Реплицироваться этот одноцепочечный ДНК-вирус самостоятельно может только в клетках эритроидного ростка, а персистировать способен во многих других клетках [3]. Репликация парвовируса В19 в таких клетках возможна только в присутствии вируса-помощника, что может стать причиной фульминантных летальных парвовирусных миокардитов [4] и гепатитов [1], в особенности, у лиц с иммунодефицитом.

На данный момент вакцина против парвовируса В19 отсутствует. Целесообразность её разработки заключается в том, чтобы предотвратить инфицирование женщин в первый триместр беременности и снизить вероятность развития аутоиммунных заболеваний. С перенесённой парвовирусной инфекцией связывают развитие ревматоидного артрита, системной красной волчанки, склеродермии и антифосфолипидного синдрома [3]. Наиболее убедительная доказательная база имеется по факту развития последнего: антитела, распознающие фрагмент капсидного белка парвовируса В19, содержащий фосфолипазный домен, перекрёстно реагируют с кардиолипином в комплексе с бета-2-гликопротеином-1 [5]. Антифосфолипидный синдром может развиваться и как осложнение некоторых других вирусных и бактериальных инфекций [6].

Парвовирус В19 проникает в цитоплазму клетки после прикрепления к рецептору и фагоцитоза: фрагмент капсида, обладающий фосфолипазной активностью, разрушает мембрану эндосомы. Наибольшее сходство этот фрагмент капсида проявляет с фосфолипазой А2, которая катализирует гидролиз эфирной связи во втором положении глицерина, в том числе, в кардиолипине [7]. Антитела к кардиолипину должны вырабатываться на комплекс фермента со своим субстратом. При этом субстрат должен покинуть мембрану и связываться непосредственно с капсидом, что может происходить не внутри эндосомы, а при контакте вируса с клеточной мембраной.

Фосфолипаза А2 из капсида парвовируса В19 является перспективной мишенью для выработки нейтрализующих антител. Если такие антитела лишат фермент возможности связываться с липидами, вирус не сможет проникнуть внутрь цитоплазмы. Однако иммунизация полноразмерным капсидным белком или фосфолипазным доменом может приводить к развитию аутоиммунной реакции. Для дизайна качественного и безопасного вакцинного пептида необходимо не только сохранение антигенных детерминант, но и лишение способности этого пептида к связыванию с кардиолипином. Последнюю задачу можно решить с помощью молекулярного докинга.

Целью исследования явился поиск наиболее вероятного сайта связывания фосфолипазы А2 из капсида парвовируса В19 с кардиолипином.

Материалы и методы исследования. В качестве материала для исследования использовали трёхмерную модель фосфолипазы А2 из минорного капсидного белка парвовируса В19 и трёхмерную модель кардиолипина. Модель фермента была получена с помощью сервера SWISS MODEL [8], который нашёл наиболее близкого гомолога у адено-ассоциированного вируса 2 типа. При этом использовалась консенсусная аминокислотная последовательность минорного капсидного белка парвовируса В19 из базы данных UniProt под номером Q9PZT0, в которой фосфолипазе А2 соответствуют остатки 123–181.

Модель кардиолипина получена из трёхмерной структуры белка (идентификатор в PDB: 1QOV) под названием «фотосинтетический реакционный центр» бактерии *Cereibacter sphaeroides* [9]. Кардиолипин представляет собой макромолекулу, гидрофильная часть которой включает три остатка глицерина, два из которых соединены друг с другом остатками фосфорной кислоты. Крайние остатки глицерина соединены эфирными связями с гидрофобными остатками жирных кислот. Среди всех доступных вариантов кардиолипина был выбран тот, остатки жирных кислот в котором имеют наибольшую длину (9, 14, 15, 15 атомов углерода). В рентгеноструктурном анализе при этом использовали кардиолипин, содержащий 3 остатка стеариновой и один остаток олеиновой кислоты, но положение некоторых атомов углерода установить не удалось [9].

Молекулярный докинг с помощью AutoDock, заключённого в интуитивно понятную оболочку DockingServer [10], позволяет проводить разные типы экспериментов. В данной работе мы использовали два подхода. Зная, что кардиолипин склонен к образованию связей с положительно заряженными фрагментами белков [9], мы указывали в качестве взаимодействующей кислоты один из двух остатков аргинина или один из четырёх остатков лизина на модели фосфолипазы А2 из капсида парвовируса В19. В таком случае DockingServer формировал область для докинга размером 20/20/20 Ангстрем на белке с указанным аминокислотным остатком в центре. Используя данный подход можно сравнить шесть сайтов связывания друг с другом и определить наиболее вероятный из них. Второй подход заключался в выборе центра массы белка в качестве начала координат и расширении области для докинга до 40 Ангстрем по всем трём осям. В таком случае вся поверхность фосфолипазы А2 оказывается задействованной. При таком подходе количество возможных положений кардиолипина относительно поверхности фермента значительно больше, чем при указании конкретного центрального аминокислотного остатка для связывания. В случае наличия хотя бы одной трёхмерной структуры белка (или его гомолога) с соответствующим лигандом (или со схожим лигандом), технически докинг осуществить было бы проще – достаточно было бы использовать ту же область, с которой рассматриваемый лиганд действительно образует комплекс. Известны структуры фосфолипазы А2 разных организмов в комплексе с низкомолекулярными аналогами субстрата, но не с кардиолипином. Кроме того, положение последнего при образовании каталитически активного комплекса должно отличаться от такового при образовании мишени для выработки антител.

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью программ MS Excel и PAST.

Результаты исследования. Эффективность связывания кардиолипина остатками лизина и аргинина может быть оценена по четырём энергетическим параметрам: по энергии Гиббса связывания (ΔG), по суммарной энтальпии образования Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, водородных связей и процесса дегидратации ($\Delta H_{vdW+Hb+desolv}$), по энтальпии электростатических взаимодействий ($\Delta H_{electro}$) и по суммарной энтальпии межмолекулярных взаимодействий (ΔH). На рисунке 1 приведено распределение этих четырёх параметров для 100 прогонов докинга кардиолипина к области фосфолипазы A2 размером 20/20/20 Ангстрем с центром на остатке Lys162.

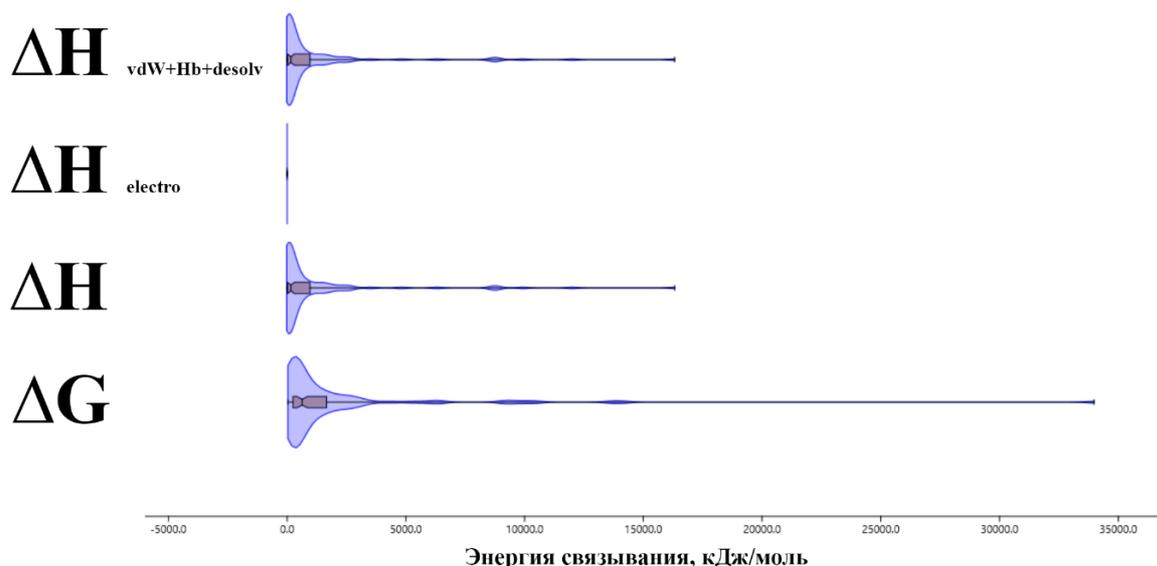


Рисунок 1. – Энергетические характеристики результатов докинга кардиолипина к области фосфолипазы A2 парвовируса B19 с остатком Lys162 в центре

На рисунке 1 заметно, что вклад электростатических взаимодействий в величину суммарной энтальпии образования данного комплекса не столь велик. Разброс значений ΔG при этом существенно отличается от такового для ΔH , что говорит о важности вклада уменьшения энтропии в конечную величину ΔG . Таким образом, для дальнейшего анализа были использованы только ΔG и ΔH образования комплекса. Распределение этих величин не является нормальным согласно критерию Шапиро-Уилка, что заставляет использовать непараметрический метод Манна-Уитни для установления различий между медианами ΔG и ΔH для докинга к разным аминокислотным остаткам (таблица).

Докинг к остаткам Lys162 и Lys180 оказался несколько более успешным, чем докинг к остаткам Arg151, Arg156, Lys183 и Lys194, так как в 19% и 3% прогонов, соответственно, были предсказаны комплексы с отрицательным значением ΔH . При этом ни один из прогонов не завершился предсказанием комплекса с отрицательным значением ΔG . Достоверных различий как в ΔG , так и в ΔH образования комплексов с Lys162 и Lys180 в центре найдено не было. Однако эти величины оказались достоверно ниже, чем таковые для докинга к четырём другим остаткам (таблица). Тем не менее, согласно критерию хи-квадрат, вероятность образования комплекса с отрицательным значением ΔH при докинге к Lys162 достоверно выше, чем при докинге к Lys180.

На рисунке 2 приведена диаграмма с процентом пробегов, в которых каждый аминокислотный остаток формировал контакты с кардиолипином для 100 пробегов докинга к Lys162. Помимо этого, на диаграмме приведены границы трёх альфа-спиралей и поло-

жения остатков, образующих бета-мостик в петле между первой и второй альфа-спиралями. Действительно, при таком проведении эксперимента взаимодействующие остатки, в основном, находятся в пределах упомянутой выше гидрофобной петли, содержащей Lys162. К этим остаткам примерно в трети случаев присоединяется Pro133, расположенный между двумя остатками, связывающими катионы кальция.

Таблица. – Результаты докинга кардиолипина к модели фосфолипазы A2 капсида парвовируса В19 с центром на шести аминокислотных остатках

Аминокислотные остатки	Arg151	Arg156	Lys162	Lys180	Lys183	Lys194
ΔG медиана, кДж/моль	6360	50836	633	376	11443	2530
25% перцентиль	2648	25679	247	153	5000	1286
75% перцентиль	25962	110562	1647	1211	25501	6726
ΔH медиана, кДж/моль	3665	40480	155	182	9288	1397
25% перцентиль	1532	20345	18	55	3682	474
75% перцентиль	22499	91734	931	700	19748	4717
число прогонов с $\Delta G < 0$	0	0	0	0	0	0
число прогонов с $\Delta H < 0$	0	0	19	3	0	0
ΔG минимум, кДж/моль	255	4226	32	23	296	201
ΔH минимум, кДж/моль	66	3488	-22	-11	49	10

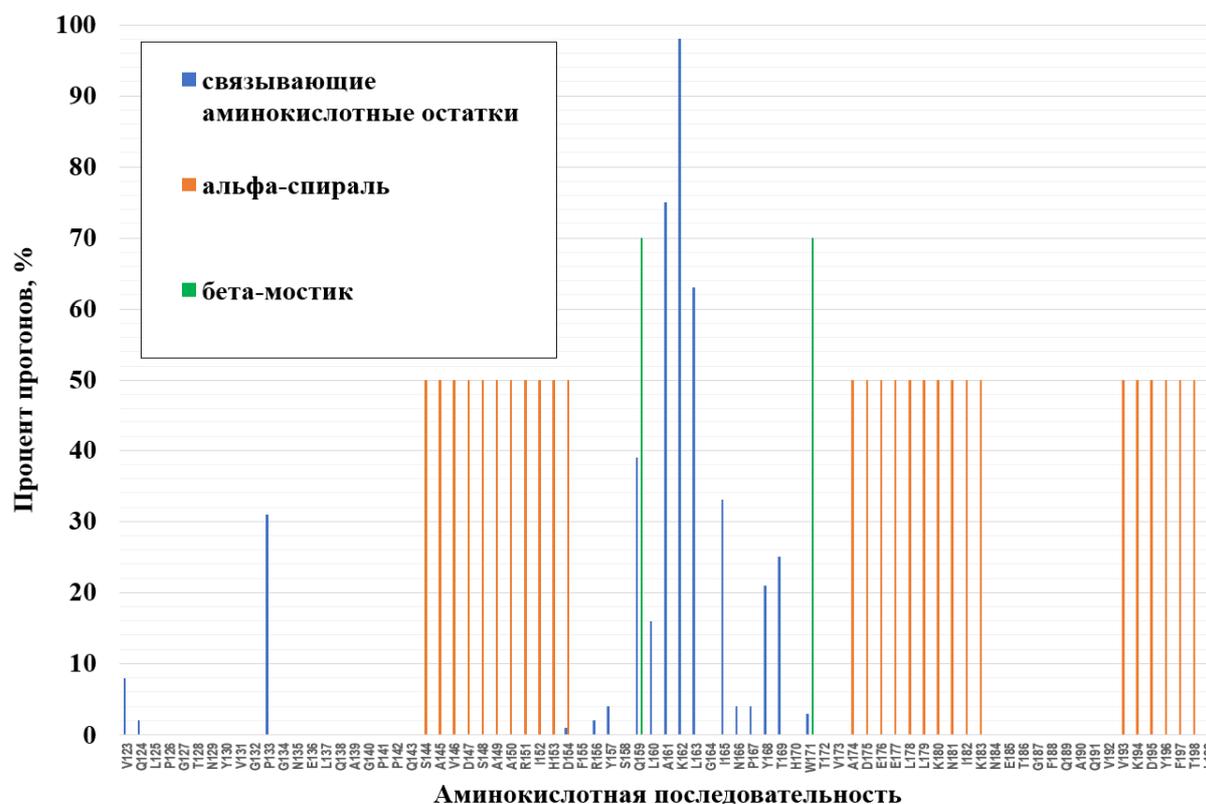


Рисунок 2. – Участие аминокислотных остатков в связывании кардиолипина при докинге к области фосфолипазы A2 парвовируса В19 с центром на остатке Lys162

После 220 попыток проведения молекулярного докинга кардиолипина ко всей поверхности фосфолипазы A2 из малого капсидного белка парвовируса В19, была найдена модель комплекса, отличающаяся наименьшей ΔG связывания. Интересно отметить, что только 16 попыток докинга завершились с отрицательным значением разницы в свободной энергии Гиббса между состоянием до связывания этих молекул друг с другом и состоянием после связывания. Редкость комплексов с отрицательным ΔG объясняется крупными размерами молекулы кардиолипина, соизмеримой с самой фосфолипазой A2: энтропия при формировании такого комплекса снижается достаточно резко, в результате чего ΔG приобретает положительное значение, несмотря на отрицательное значение ΔH . Тем не менее, при расширении области связывания варианты с отрицательным ΔG всё-таки находятся.

В комплексе с наименьшим значением энергии связывания ($\Delta G = -10,3$ кДж/моль) атом кислорода одного из остатков фосфорной кислоты кардиолипина даёт водородную связь с атомом азота N-концевого остатка Val123, а остатки жирных кислот образуют гидрофобные контакты с остатками Pro133, Leu163, Tyr168, Thr169, Phe197. Известно, что замена остатка Tyr168 на фенилаланин приводит к полной потере каталитической активности данного фермента [7]. Если предположить, что изначально гидрофильная часть кардиолипина из клеточной мембраны попадает в активный центр фосфолипазы A2, а затем происходит «обращение» этого комплекса (гидрофобные «хвосты» кардиолипина перемещаются из мембраны на поверхность фермента), то одна из эфирных связей на полученной структуре должна находиться вблизи активного центра, что имеет место быть в данном случае (рисунок 3). Наибольший энергетический вклад в образование комплекса при этом вносит не водородная связь, а гидрофобные взаимодействия с Tyr168 и Leu163.

Обсуждение. Поскольку результаты обоих способов молекулярного докинга указали на высокое сродство к кардиолипину петли между первой и второй альфа-спиралями, целесообразным будет исключение этой части аминокислотной последовательности из состава вакцинного пептида. Так как в этой петле существует бета-мостик между остатками Gln159 и Trp171, логичным представляется удаление последовательности 160-LAKLGINPYTH-170 и введение вместо неё шарнирного остатка глицина. Поскольку в этом фрагменте из 11 остатков 7 являются гидрофобными, именно он с высокой долей вероятности и внедряется в толщу мембраны, приближая активный центр фермента к эфирным связям кардиолипина. Логичным представляется оставить в составе такого пептида первую и вторую альфа-спирали. В таком случае пептид будет иметь аминокислотную последовательность: SAVDSAARIHDFRYSQGWTVADEELLKNIK – сокращённо SK30. При таком дизайне пептид должен будет утратить фосфолипазную активность не только за счёт отсутствия гидрофобного фрагмента петли, но и за счёт того, что в нём останутся только два (His153 и Tyr157) из четырёх остатков (His153, Tyr157, Tyr168, Asp195) [7], образующих каталитический центр фермента, и только один (Asp154) из четырёх остатков (Tyr130, Gly132, Gly134, Asp154) [7], образующих сайт связывания катиона кальция. Тем не менее, антитела к такому пептиду должны будут обладать способностью к связыванию с линейным фрагментом, содержащим функционально важные остатки His153, Asp154 и Tyr157, вторичная структура которого должна воспроизвестись за счёт контактов аминокислотных остатков внутри первой альфа-спирали, а также между первой и второй альфа-спиралями.

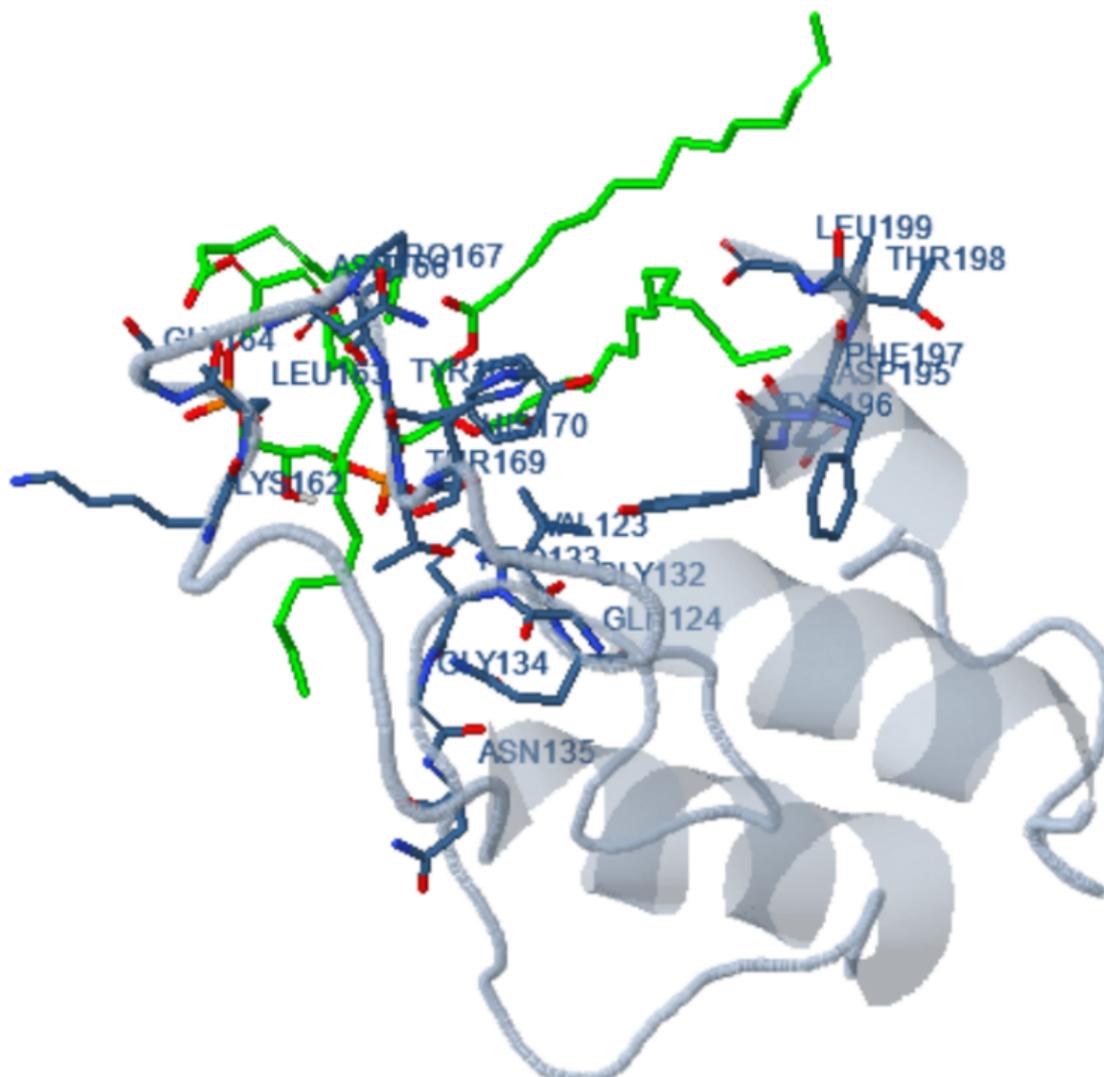


Рисунок 3. – Наиболее вероятная модель комплекса фосфолипазы A2 парвовируса B19 с кардиолипином

Заключение. По результатам молекулярного докинга найдена область фосфолипазы A2 из минорного капсидного белка парвовируса B19, наиболее склонная к взаимодействию с кардиолипином: гидрофобный фрагмент петли Leu160 – Thr169, содержащий остаток Lys163. Этот фрагмент должен быть удалён из состава антигенов, предлагаемых для вакцинопрофилактики парвовирусной инфекции, с целью снижения риска развития антифосфолипидного синдрома.

Литература

1. Parvovirus B19 infection: A challenging cause of fulminant hepatitis / N. Gille [et al.] // Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol. – 2020. – Vol. 44. – P. e89-e91.
2. Парвовирусная инфекция у детей / В.А. Анохин [и др.] // Детские инфекции. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 22-28.
3. Human parvovirus B19 infection and autoimmunity / C. Lunardi [et al.] // Autoimmun. Rev. – 2008. – Vol. 8. – P. 116-120.
4. Fulminant myocarditis parvovirus B19 related in a young woman / R. Pesce [et al.] // J. Artif. Organs. – 2021. – Vol. 24, No. 4. – P. 498-502.

5. The association of VP1 unique region protein in acute parvovirus B19 infection and anti-phospholipid antibody production / B.S. Tzang [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2007. – Vol. 378. – P. 59-65.
6. Avcin, T. Antiphospholipid antibodies in response to infection / T. Avcin, N. Toplak // *Curr. Rheumatol. Rep.* – 2007. – Vol. 9. – P. 212-218.
7. The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity / S. Dorsch [et al.] // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76. – P. 2014-2018.
8. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes / A. Waterhouse [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – Vol. 46. – P. W296-W303.
9. Structural details of an interaction between cardiolipin and an integral membrane protein / K.E. McAuley [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 14706-14711.
10. Bikadi, Z. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock / Z. Bikadi, E. Hazai // *J. Cheminform.* – 2009. – Vol. 1. – P. 15.

MOLECULAR MODELING OF THE COMPLEX OF CARDIOLIPIN AND PHOSPHOLIPASE DOMAIN OF THE PARVOVIRUS B19 CAPSID

**¹Khrustalev V.V., ¹Khrustaleva T.A., ¹Poboinev V.V., ¹Stojarov A.N.,
¹Shalygo N.V., ²Samoilovich E.O., ²Yermalovich M.A., ²Semeiko G.V.**

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

²Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology», Minsk, Republic of Belarus

The design of vaccine peptides for the immunization against parvovirus B19 must include an additional step that is the search of capsid fragments able to bind cardiolipin with the aim to exclude them from synthetic antigens. The most probable binding site of cardiolipin with phospholipase domain of capsid protein (residues Leu160 – Thr169) has been found with the help of molecular docking. The SK30 peptide that should not provoke the development of antiphospholipid syndrome has been suggested.

Keywords: parvovirus B19, synthetic peptide, phospholipase A2, cardiolipin, antiphospholipid syndrome.

Поступила 15.10.2022

ИММУНОПАТОГЕНЕЗ И ЛЕЧЕНИЕ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (COVID-19): ПОЗИЦИЯ КЛИНИЧЕСКОГО ФАРМАКОЛОГА

Василевский И.В.

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

Резюме. Приведены современные литературные данные по иммунопатогенезу и возможностям лечения инфекции COVID-19, вызванной новым коронавирусом SARS-CoV-2, с позиций клинической фармакологии.

Ключевые слова: инфекция COVID-19, цитокиновый шторм, лечение.

Введение. Тяжелая форма новой коронавирусной инфекции (COVID-19) характеризуется системным гипервоспалением, острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС) и полиорганной недостаточностью, часто приводящей к летальным исходам. Цитокиновый шторм относится к набору клинических состояний, вызванных чрезмерными иммунными реакциями; он был признан ведущей причиной тяжелой формы COVID-19.

Цель исследования – проанализировать литературные данные о роли иммунологических нарушений у пациентов при COVID-19 с акцентом на синдром активации макрофагов (MAS) и возможности минимизации цитокинового шторма с позиций клинической фармакологии.

Материалы и методы исследования. В сообщении приведены важные для клинической практики врачей разных специальностей сведения, представленные в основных информационных источниках, включая базы данных PubMed.

Результаты исследования и обсуждение. В условиях глобальной пандемии COVID-19 тяжесть клинической картины у пациента и прогноз заболевания связаны с особенностями течения так называемого цитокинового шторма [1]. Синдром высвобождения цитокинов, часто именуемый в литературе как «цитокиновый шторм» (англ. cytokine storm, cytokine release syndrome) представляет собой особую форму системной воспалительной реакции организма, характеризующейся чрезмерным синтезом цитокинов в очаге воспаления. Цитокиновый шторм может развиваться в результате инфекционно-токсического шока, сепсиса, жёлтой лихорадки, лихорадки Эбола, тяжелого острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом, острого панкреатита, тяжелых травм, реакции отторжения трансплантата и т.д. Исследования показали, что быстрое клиническое ухудшение и высокий риск смертности при тяжелой форме COVID-19 могут быть связаны с цитокиновым штормом [2]. Ruan Q.C соавторами в своем исследовании констатировали тот факт, что уровень IL-6 был значимо повышен у умерших пациентов в сравнении с выжившими от COVID-19. Это наблюдение позволило авторам предположить, что смертность от COVID-19 может быть связана с активированным вирусом цитокиновым штормом [3]. Herold T. с соавторами показали, что высокий уровень IL-6 у пациентов с COVID-19 является предиктором необходимости механической вентиляции легких [4]. Недавнее проспективное когортное исследование позволило заключить, что высокие уровни IL-6 и d-димер отражали системное воспаление и тромботическое состояние и предсказывали внутрибольничную смертность от COVID-19 [5].

Недавние исследования показали, что нарушение ответа на интерфероны типа 1 на ранней стадии инфекции COVID-19 играет важную роль в развитии цитокинового шторма, а различные цитокины, такие как IL-6 и IL-1, участвуют в тяжелой форме COVID-19. Интерфероны типа 1 играют важную роль в подавлении ранней стадии инфекции COVID-19. Дендритные клетки и мононуклеарные макрофаги, распознающие вирусные антигены, вызывают реакцию острой фазы через провоспалительные цитокины, такие как IL-6, IL-1 и TNF- α . Среди них IL-6 стимулирует Т-клетки для активации адаптивного иммунитета. Активированные Т-клетки также стимулируют макрофаги и NK-клетки через IFN- γ , способствуя удалению вируса. Отсутствие первоначального иммунного ответа на IFN типа 1 чрезмерно увеличивает активность иммунной системы, что приводит к цитокиновому шторму [6].

Основными патологическими эффекторами при COVID-19 являются IL-6 и макрофаги. IL-6 – важный провоспалительный цитокин, обладающий плеiotропным действием. Это вызвано инфекцией или повреждением тканей и быстро вызывает острые реакции, чтобы свести их к минимуму. IL-6 способствует выработке различных белков острой фазы в гепатоцитах и индуцирует дифференцировку иммунных клеток, таких как В- и Т-клетки. Кроме того, IL-6 участвует в метаболизме железа, регулируя гепсидин, что делает микроокружение устойчивым к инфекции. Взятые вместе, IL-6 играет роль в инициации воспалительных реакций и в активации адаптивного иммунитета против инфекции или повреждения [7].

В связи с тем, что на данный момент только разрабатывается этиотропная терапия COVID-19, актуальным являются клинико-фармакологические подходы к патогенетическому лечению COVID-19, минимизации иммунологических осложнений в виде синдрома активации макрофагов, приводящего к синдрому цитокинового шторма. Именно раннее фармакологическое вмешательство при указанных иммунологических осложнениях уменьшит тяжесть заболевания и смертность при инфекции COVID-19. Учитывая, что вторичный синдром активации макрофагов (MAS)/гемофагоцитарный лимфогистоцитоз (ГЛГ) при COVID-19 является следствием массивной неконтролируемой активации иммунной системы (гипериммунной реакции), спровоцированной острой вирусной инфекцией, пациентам, наряду с симптоматическим и этиотропным лечением, в большинстве случаев должна проводиться иммуносупрессивная терапия [8].

С позиции клинической фармакологии обосновано положение о том, что потенциальная целевая терапия при этом – использование блокаторов и нейтрализаторов IL-6 [9]. В 12 версии Временных методических рекомендаций Министерства здравоохранения Российской Федерации по лечебно-профилактическим мероприятиям при COVID-19 (2021 г.) указывается, что уже на ранних стадиях гемофагоцитарного синдрома (ГФС) целесообразно назначение человеческих моноклональных антител к рецептору IL-6 (тоцилизумаба или сарилумаба) с целью подавления цитокинового шторма и предотвращения развития полиорганной недостаточности, ведущей к летальному исходу [10]. Следует заметить, что в течение ряда лет группа ингибиторов биологических эффектов IL-6 была представлена одним препаратом – тоцилизумабом [11]. Новый препарат из этой группы сарилумаб – человеческое моноклональное антитело (подтип IgG1) к рецептору IL-6. Сарилумаб специфически связывается как с растворимыми, так и с мембранными рецепторами IL-6 (IL-6R α) и подавляет IL-6-опосредованную передачу сигнала с вовлечением сигнального белка – гликопротеина 130 (gp130) и сигнальных белков STAT-3. Сарилумаб отличается более выраженной аффинностью в отношении связывания рецептора IL-6, а также связывает рецептор более стабильно, чем тоцилизумаб. Сарилумаб по своим характеристикам близок к тоцилизумабу, хотя имеются и значимые различия. Так, сарилумаб – это антитело, идентичное человеческому, тогда как тоцилизумаб – гумани-

зированной антитело, то есть содержащее некоторое количество мышинового белка. Характерной чертой сарилумаба считается отсутствие комплемент-опосредованной и антителозависимой цитотоксичности. Имеется достаточно клинических данных, чтобы заключить, что сарилумаб, как новый представитель класса ингибиторов биологических эффектов ИЛ-6, имеет значительные перспективы для широкого внедрения в практику лечения больных с иммунопатологическими состояниями, включая возникающий ГФС при COVID-19 [12].

В настоящее время используется несколько подходов для лечения наблюдаемого при инфекции COVID-19 цитокинового шторма и определенные ожидания связаны с применением лекарственных препаратов, ингибирующих пути JAK. JAK – это внутриклеточная тирозинкиназа, которая опосредует сигналы цитокинов, гормонов и факторов роста. Преобразователь сигнала киназы Janus и активатор пути транскрипции (JAK / STAT) обычно участвует в различных процессах активации цитокинов. Ингибиторы JAK, включая руксолитиниб и барицитиниб, используются для лечения различных аутоиммунных и гематологических заболеваний. Считается, что ингибирование JAK может эффективно подавлять цитокиновый шторм, поскольку оно может неизбирательно подавлять активность многих цитокинов. Подавление JAK при COVID-19 дает два клинических преимущества. Ингибиторы JAK блокируют передачу сигналов цитокинов, тем самым снижая чрезмерные воспалительные реакции, а также проникновение SARS-CoV-2 на ранней стадии инфекции [13]. Известно, что вирус SARS-CoV-2 проникает в организм через рецептор ангиотензин-превращающего фермента-2 (ACE2) на альвеолярных клетках 2 типа в легких, и несколько регуляторов участвуют в опосредовании эндцитоза и внутриклеточного транспорта через ACE2. AP2-ассоциированная протеинкиназа-1, один из таких регуляторов, является мишенью ингибиторов JAK, особенно барицитиниба. Таким образом, ингибиторы JAK могут препятствовать проникновению и распространению SARS-CoV-2 [14]. Соответственно, некоторые ингибиторы JAK, включая барицитиниб, руксолитиниб и федратиниб, изучаются для лечения тяжелой формы COVID-19. В частности, Cantini F. с соавторами в многоцентровом ретроспективном исследовании обнаружили тот факт, что барицитиниб снижал частоту госпитализаций и летальных исходов в отделениях интенсивной терапии, а также увеличивал число выздоровевших пациентов [15].

Пожилой и старческий возраст не является противопоказаниями для применения моноклональных антител к цитокинам и их рецепторам. Пациентам, получающим лечение иммунодепрессантами при трансплантации органов, назначение данных препаратов возможно по решению врачебной комиссии с коррекцией исходной базовой иммуносупрессивной терапии. Необходимо, однако помнить о том, что на фоне терапии блокаторами ИЛ-6 могут возникать нежелательные явления – инфекционные заболевания: бактериальная пневмония, флегмона, инфекции, вызванные *Herpes zoster*, и др.; сыпь, крапивница; повышение показателей липидного обмена (общего холестерина, триглицеридов, ЛПВП, ЛПНП).

Противопоказания для назначения генно-инженерных биологических препаратов: сепсис, подтвержденный патогенами, отличными от SARS-CoV-2; гиперчувствительность к любому компоненту препарата; вирусный гепатит В; иммуносупрессивная терапия при трансплантации органов; нейтропения $<0,5 \times 10^9/\text{л}$; повышение активности АСТ или АЛТ более чем в 5 норм; тромбоцитопения $<50 \times 10^9/\text{л}$; применение генно-инженерных биологических препаратов при беременности возможно в случае, если потенциальная польза превышает риск [10].

Заключение. С учетом накопления современных данных по иммунопатогенезу новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в настоящее время используются несколько подходов для лечения наблюдаемого цитокинового шторма, связанного с COVID-19.

Практический интерес с позиций клинической фармакологии представляют новые подходы к лечению инфекции COVID-19, нацеленных на блокаду цитокинов. В частности, это использование ингибиторов ИЛ-6 (тоцилизумаба, сарилумаба), ингибиторов ИЛ-1 (анакинры), ингибиторов пути янус-киназы (JAK) (барицитиниба). В недавних исследованиях различных авторов реализация подобных подходов показала многообещающий потенциал для лечения тяжелых форм COVID-19.

Литература

1. The cytokine storm and COVID-19 / B. Hu [et al.] // *J. Med. Virol.* – 2021. – Vol. 93, No. 1. – P. 250-256.
2. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression / P. Mehta [et al.] // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395, No. 10229. – P. 1033–1034.
3. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China / Q. Ruan [et al.] // *Intensive Care Med.* – 2020. – Vol. 46, No. 5. – P. 846–848.
4. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19 / T. Herold [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2020. – Vol. 146, No. 1. – P. 128–136.
5. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study / M.J. Cummings [et al.] // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395, No. 10239. – P. 1763–1770.
6. Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19 / J.S. Kim [et al.] // *Theranostics.* – 2021. – Vol. 11, No. 1. – P. 316–329.
7. Tanaka, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease / T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2014. – Vol. 6, No. 10. – a016295.
8. COVID-19: Immunology and treatment options / S. Felsenstein [et al.] // *Clin. Immunol.* – 2020. – Vol. 215. – 108448. doi: 10.1016/j.clim.2020.108448
9. Coperchini, F. CXCL10 and infiltrating macrophages in COVID-19-related cytokine storm: not one for all but all for one! / F. Coperchini, L. Chiovato, M. Rotondi // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – 668507. doi: 10.3389/fimmu.2021.668507
10. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 12. (21.09.2021) [Электронный ресурс] / М-во здравоохранения Рос. Федерации, 2021. – 231 с. – Режим доступа: https://con-med.ru/upload/iblock/2d9/VMR_COVID_19_V12.pdf. – Дата доступа: 14.10.2021.
11. Therapeutic role of Tocilizumab in SARS-CoV-2-induced cytokine storm: rationale and current evidence / C. Pelaia [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, No. 6. – P. 3059.
12. Сарилумаб (Кевзара): инструкция по медицинскому применению // Видаль: справочник лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.vidal.ru/drugs/>. – Дата доступа: 24.01.2019.
13. JAK inhibition as a new treatment strategy for patients with COVID-19 / F. Seif [et al.] // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2020. – Vol. 181, No. 6. – P. 467–475.
14. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease / P. Richardson [et al.] // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395, No. 10223. – e)30–31.
15. Beneficial impact of Baricitinib in COVID-19 moderate pneumonia; multicentre study / F. Cantini [et al.] // *J. Infect.* – 2020. – Vol. 81, No. 4. – P. 647-679.

IMMUNOPATHOGENESIS AND TREATMENT OF NEW CORONAVIRUS INFECTION (COVID-19): CLINICAL PHARMACOLOGY STANDPOINT

Vasilevsky I.V.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The current literature data on immunopathogenesis and treatment options for the new coronavirus infection (COVID-19) from the standpoint on clinical pharmacology are presented.

Keywords: COVID-19 infection, cytokine storm, treatment.

Поступила 15.10.2021

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ ПОЛЛИНОЗА: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Пархомчук О.Ю., Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е.

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

Резюме. Рост аллергических заболеваний является одной из наиболее актуальных медико-социальных проблем. В последние годы наблюдается значительный рост атопических IgE-опосредованных заболеваний, таких, как бронхиальная астма, сезонный аллергический ринит (поллиноз), атопический дерматит, аллергический конъюнктивит. Результаты проведенных многочисленных исследований, направленных на поиск генетических предикторов формирования аллергических заболеваний в различных этнических группах, носят противоречивый характер. Вероятно, это можно объяснить сложными генетическими взаимодействиями, а также влиянием факторов окружающей среды на генетический фон исследуемой популяции. В данном обзоре представлена информация о роли аллельных полиморфизмов некоторых генов, ассоциированных с развитием аллергических заболеваний.

Ключевые слова: поллиноз, аллергический ринит, полиморфизм генов.

Введение. Этиология аллергических заболеваний включает в себя сочетание нескольких факторов. Чаще всего та или иная аллергическая патология развивается при взаимодействии как наследственных факторов, так факторов и окружающей среды [1]. Такие заболевания называют многофакторными. Геномные исследования таких заболеваний являются одним из основных направлений современной медицинской генетики, которые позволяют приблизиться к пониманию наследственных основ этиологии и патогенетики аллергических заболеваний. Актуальной стороной таких исследований служит изучение полиморфных вариантов генов, кодирующих белки, участвующие в иммунном ответе на воздействие аллергенов. В настоящее время во всем мире ведется активный поиск генов, влияющих на развитие аллергических заболеваний, в том числе и поллиноза [2-4].

Поллиноз – хроническое сезонное заболевание, причиной которого является аллергическая реакция на пыльцу растений, клинически проявляющаяся в виде аллергического ринита (АР) и/или конъюнктивита. К симптомам АР относятся чихание, зуд, стойкая заложенность носа и слизистые выделения; аллергического конъюнктивита – зуд и слезотечение, которые могут в значительной степени влиять на качество жизни человека, в первую очередь, из-за риска развития дополнительных осложнений (например, бронхиальной астмы), широкого распространения и выраженного негативного влияния на личную и общественную жизнь [5-10].

При анализе результатов некоторых исследований установлены как общие иммуногенетические маркеры, влияющие на развитие аллергических заболеваний, в том числе и поллиноза, так и специфические гены, кодирующие белки, участвующие в иммунном ответе на воздействие аллергенов [11, 12].

В данной статье представлена информация о роли некоторых полиморфных вариантов генов, ассоциированных с развитием поллиноза в различных этнических популяциях. С этой целью были использованы доступные источники информации профессиональной базы данных научной информации Национальной медицинской библиотеки и Национального института здравоохранения США (PubMed), электронные информационные ресурсы издательства «Wiley» и издательства «Springer Nature».

Интерлейкин 4 (IL-4, interleukin-4)

Развитие аллергических заболеваний часто ассоциировано с полиморфными вариантами гена IL-4, расположенного на длинном плече 5 хромосомы в участке q31.1. Этот ген кодирует противовоспалительный цитокин, участвующий в модулировании иммунного ответа практически на всех стадиях аллергической реакции. IL-4 участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки Т-клеток за счет ускорения синтеза IgE. Кроме того, IL-4 действует как кофактор для пролиферации и дифференцировки В-клеток [13].

Проведенные многочисленные исследования, касающиеся генетических полиморфизмов IL4, ассоциированных с аллергическим ринитом, указывают на различную роль определенных генетических полиморфизмов в развитии данного заболевания среди разных этнических групп. Так, при изучении ассоциации между однонуклеотидными полиморфизмами (ОНП) IL-4 rs2243250 (C-589T) и rs2227284 (T2979G) и АР среди населения Иордании, было установлено, что генотип ТТ для rs2243250 (C-589T) среди трех комбинаций аллелей достоверно связан с у иорданцев с АР по сравнению с контролем. Кроме того, наблюдалось повышение риска формирования аллергического ринита в 4,17 раза. В отношении ОНП rs2227284 (T+2979G) не наблюдалось значительных различий в группе исследования с АР и контрольной группой с точки зрения частот генотипа или аллелей [13]. Однако, в другом исследовании, проведенном в Пакистане, установлено, что и тот и другой ОНП в гене IL-4 ассоциировались с АР. Было показано, что генотипы ТТ для rs2243250 (C-589T) и GG для rs2227284 (T+2979G) ассоциированы с АР [14]. Интересные результаты получены при анализе ОНП rs2243250 (C-589T) в группе азербайджанцев с АР, проживающих на территории Ирана. Выявлено, что генотип СТ (IL-4 C-590T) достоверно связан с АР у детей, но не было установлено никакой ассоциации между ОНП rs2243250 (C-589T) и АР у взрослых [15]. В одном из исследований, направленном на изучение влияния полиморфизма генов α-цепи рецептора IL-4 (IL4RA) на риск развития поллиноза, вызванного пылью японского кедр, было установлено, что замена Ile на Val в кодирующей области (Ile50Val) достоверно связана с данным заболеванием [16].

Фактор некроза опухоли альфа (TNFα, tumor necrosis factor alpha)

Фактор некроза опухоли альфа является плейотропным провоспалительным цитокином, высокий уровень которого наблюдается при заболеваниях легких. Он обнаружен в слизистой оболочке носа и эпителиальных клеток. Синтез цитокина TNF-α опосредуется геном TNFα, расположенным на 6 хромосоме (6p21.3). Высокая экспрессия TNFα была зарегистрирована у пациентов с АР. Показано также, что недостаток TNFα ингибирует развитие АР у мышей, что свидетельствует о его значительной роли в патогенезе данного заболевания. До сих пор нет устоявшегося мнения об ассоциации полиморфных вариантов гена TNFα и АР в различных этнических популяциях [17, 18].

В одном из исследований в популяции ханьцев (Китай) установлено, что ОНП в локусах rs1799964 (T-1031C), rs1800630 (C-863A) и rs1800629 (G-308A) не связаны с АР. В то время как генотипы GT и GT + TT гена TNF-α (rs769178, G+1402T) являются наиболее достоверно связанными с АР по сравнению с генотипом GG [8]. В группе пакистанцев, напротив, была установлена положительная корреляция между АР и генотипом GA в локусе rs1800629 и ОНП G-308A [19]. А в исследовании, проведенном в группе инуитов, проживающих в Гренландии и Дании, не было обнаружено значительных ассоциаций между ринитом и ОНП TNF-α T-1031C (rs1799964), C-863A (rs1800630) и G-308A (rs1800629) [18]. Интересные результаты были получены при изучении ОНП TNFα G-308A (rs1800629) и G-238A (rs361525) в группе хорватских студентов с atopическими заболеваниями: астмой, ринитом и дерматитом. Риск развития аллергического ринита достоверно не был связан ни с одним из исследованных ОНП

TNF α . Однако полученные результаты указывают на защитную роль однонуклеотидного полиморфизма TNF α G-308A (rs1800629) в отношении атопического дерматита [20].

Домен дезинтегрина и металлопротеиназы 33 (ADAM33, a disintegrin and metalloprotease domain-containing protein 33)

Известны исследования, свидетельствующие о роли полиморфных вариантов гена ADAM33 в вероятности развития аллергических заболеваний. Ген, кодирующий белок ADAM33, расположен на 20p13 хромосоме. ADAM33 представляет собой сложную белковую молекулу, принадлежит к семейству Zn-зависимых металлопротеиназ, имеет важное значение для слияния клеток, клеточной адгезии, передачи сигналов и протеолиза, экспрессируется преимущественно в гладкой мускулатуре и фибробластах легких, участвует в развитии субэпителиального фиброза, гипертрофии гладких мышц, гиперреактивности бронхов и воспаления. Во многих исследованиях изучалась связь между генетическими вариантами гена ADAM33 и AP [21, 22].

Так, в исследовании, проведенном в Японии, установлена достоверная связь между риском возникновения поллиноза, вызванным пылью японского кедр, и шестью ОНП гена ADAM33. Три ОНП расположены в интронах: F + 1, L – 1 и T + 1 и три – в кодирующей области: S2, T1, T2 [23]. В исследовании в популяции ханьцев (Китай) установлено, что три ОНП в локусах rs2787094 (V4 C/G), rs2290089 (T + 1 G/A) и rs2280091 (T1 A/G) достоверно связаны с AP [21]. У иорданцев, напротив, никаких существенных различий в аллельных частотах всех изученных ОНП (T1 A/G, T2 G/A, T + 1 G/A, V4 C/G, S1 G/A, S2 C/G, F + 1 T/C, Q – 1 G/A) между группой пациентов с AP и контрольной группой не было обнаружено. Значимые ассоциации были обнаружены только на уровне генотипа: T1 AA, T1 AG; T2 GG, T2 AG; T + 1 GG, T + 1 AG, V4 CG; S2 CC, S2 CG; Q – 1 AA ($p = 0,05, 0,05, 0,05, 0,02, 0,02, 0,02$, соответственно) [24]. Пять из этих генотипов (T1, T2, T + 1, V4, S2) были также достоверно связаны с AP в китайском исследовании, и четыре из этих генотипов (T1, T2, T + 1, V4) ассоциированы с заболеваемостью AP в японском исследовании [21, 23].

Филаггрин (FLG, filaggrin)

Развитие атопического дерматита, бронхиальной астмы и AP ассоциировано с носительством мутаций в гене филаггрина (FLG). Ген FLG расположен на хромосоме 1q21 в комплексе эпидермальной дифференцировки (EDC, epidermal differentiation complex). EDC представляет собой плотный кластер генов, которые участвуют в терминальной дифференцировке эпидермиса и формировании рогового слоя кожи. Следствием мутаций в гене FLG является нарушение барьерной функции кожи, что облегчает проникновение аллергенов через эпидермис, инициирует развитие местной и системной аллергической реакции [25, 26]. Ген, кодирующий белок FLG, очень полиморфен. Известно, что мутации гена FLG различаются в разных этнических группах [27-30].

При изучении мутаций 2282del4, R501X, R2447X, S3247X в гене FLG в группе немецких детей установлена достоверная ассоциация этих мутаций с AP [26]. Напротив, в исследовании, проведенном в Великобритании не было установлено достоверной связи между аллергическим ринитом и тремя мутациями гена FLG (R501X, 2282del4 или S3247X) [31]. Позже в той же когорте было дополнительно проанализировано влияние некоторых мутаций FLG (R501X, 2282del4, S3247X, 3702delG, R2447X) на отдаленные исходы аллергических заболеваний дыхательных путей у детей до 18 лет (группы 1 – 2 года, 4 года, 10 лет и 18 лет). В результате исследования была установлена достоверная связь с AP у детей в возрастной группе 10 лет ($p < 0,001$) [32].

Человеческие лейкоцитарные антигены (HLA, human leukocyte antigens)

Исследования системы HLA показали тесную взаимосвязь продуктов этой системы с развитием различных заболеваний и возможность их использования в качестве

генетических маркеров вероятного развития или резистентности к той или иной патологии. Особый интерес вызывают гены HLA II класса [33], которые присутствуют только на поверхности антигенпрезентирующих клеток и экспонируют антигены внеклеточного пространства CD4⁺ Т-лимфоцитам. Молекулы HLA класса II подразделяются на изоформы HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP, расположенные на коротком плече шестой хромосомы [34, 35]. Установлено, что гены системы HLA в некоторых популяциях имеют прогностическое значение в формировании поллиноза.

В исследовании, направленном на изучение связи аллельных вариантов гена HLA-DPB1 с поллинозом, вызванным пылью японского кедрового дерева у подростков было установлено, что аллель HLA-DPB1*02 достоверно связан с данным заболеванием. Кроме того, наличие вариантов HLA-DPB1*02:01 и HLA-DPB1*02:02 у исследуемых лиц выполняло протективную функцию в отношении поллиноза [35]. Интересные результаты были получены при изучении аллельного полиморфизма генов HLA класса II локусов DR и DQ в популяции русских астраханской геногеографической зоны. В результате исследования было выявлено, что маркерами риска развития поллиноза и для мужчин и для женщин являются группа аллелей HLA-DRB1*08 и двулокусные гаплотипы HLA-DRB1*08/DQB1*05, DRB1*17/DQB1*0401/02. В группе мужчин установлена дополнительно достоверная связь с аллелями HLA-DQB1*0401/02, HLA-DRB1*13(06), DQB1*020 и двулокусными гаплотипами HLA-DRB1*08/DQB1*0401/02, HLA-DRB1*13/DQB1*0301 и DRB1*13/DQB1*06. В группе женщин дополнительными маркерами риска развития поллиноза являются гаплотипы HLA-DRB1*08/DQB1*0201, HLA-DRB1*07/DQB1*0301, DRB1*11(05)/DQB1*0302, аллели – HLADRB1*01, DQB1*0302, DQB1*0303. Маркером резистентности к развитию поллиноза в обеих группах является аллель HLA-DQB1*03:01 [36]. При изучении литературных данных, касающихся взаимосвязи аллергического ринита и гена HLA-DQB1 в китайской популяции было установлено, что изученный ген может быть маркером развития АР [37].

Хотелось бы остановиться еще на некоторых исследованиях ОНП генов, также направленных на изучение возможных предикторов развития АР, проведенных в популяциях Ирана и Китая.

В иранской популяции была изучена ассоциация с АР некоторых полиморфных вариантов генов, кодирующих цитокины интерлейкин 12 (IL-12, interleukin 12) и интерлейкин 33 (IL-33, interleukin 33). Гетеродимерный цитокин IL-12 продуцируется дендритными клетками, макрофагами, нейтрофилами и В-лимфобластоидными клетками человека в ответ на антигенное воздействие. IL-12 выполняет регуляторную функцию в индуцированном аллергеном воспалении путем поляризации субпопуляций CD4⁺ Т-клеток и кодируется генами IL12A и IL12B. Предметом данного исследования стали ОНП гена IL-12B (rs3212227, A > C; rs6887695, G > C). Итогом анализа полученных результатов стала достоверная ассоциация генотипа GC (rs6887695 G > C) с АР по сравнению с генотипом GG. Напротив, не было установлено достоверной связи между ОНП rs3212227 (A > C) с АР [38, 39].

При изучении взаимосвязи между ОНП гена IL-33 (rs7044343, rs1929992 и rs12551256) и АР было выявлено, что генотип ТТ и аллель Т (rs7044343 C > T) значительно связаны со сниженным риском развития АР. Кроме того, генотип ТТ ассоциировался с более низкими уровнями IL-33 по сравнению с генотипами СС и СТ, но эти различия не были статистически значимыми. Не было обнаружено связи между вариантами ОНП rs1929992 A > G, ОНП rs12551256 A > G и АР. Но генотип GG (rs1929992 A > G) был ассоциирован с повышенными уровнями IL-33 в сыворотке крови в контрольной группе. Однако, в тоже время, не было установлено достоверного различия

сывороточных уровней IL-33 между пациентами с АР и здоровыми людьми из контрольной группы [40].

Еще одно недавнее исследование касается изучения роли полиморфизма FokI (rs2228570) гена рецептора витамина D (VDR, vitamin D receptor) в формировании АР у населения Китая. Ген VDR состоит из девяти экзонов и восьми интронов, расположен на хромосоме 12q13. Белок, продуцируемый этим геном, относится к семейству ядерных рецепторов. VDR связывается с 1,25-(OH)₂-D₃, активной формой витамина D, и влияет на его биологическую активность. В результате исследования установлена достоверная ассоциация генотипа AA (по сравнению с генотипами GG и GA) ОНП rs2228570 с АР в китайской популяции [41].

В китайской популяции также была изучена роль полиморфизма гена SP-A (rs1965708 C > A), кодирующего сурфактантный белок А (SP-A, surfactant associated protein A), в развитии АР. SP-A обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами, воздействует на рост и жизнеспособность микроорганизмов, повышая проницаемость микробной клеточной мембраны. Установлено, что варианты полиморфизма гена SP-A rs1965708 (CA, AA) связаны с аллергическим ринитом, а аллель А может увеличивать риск аллергического ринита [42].

Таким образом, несмотря на то, что роль факторов внешней среды в модификации генетических эффектов в развитии аллергических заболеваний не вызывает сомнений, и в последнее время активно ведётся поиск генетических маркеров, влияющих на вероятность развития аллергических заболеваний, к настоящему времени остается целый ряд пробелов в существующих знаниях. В то же время результаты исследований показывают наличие выраженной этнической и популяционной специфики наследственных детерминант, участвующих в формировании АР. Это диктует необходимость систематического анализа генетических маркеров в различных популяциях мира, учитывающих этническую специфику, а также факторов внешней среды на определённой территории. Изучение иммуногенетических маркеров, влияющих на вероятность развития поллиноза, является актуальной задачей для оценки предиктивной значимости генетических маркеров с доказанной ассоциацией с аллергическими заболеваниями.

Литература

1. Иммуногенетические маркеры поллинозов / Б.А. Шамгунова [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2010. – № 6. – С. 162-167.
2. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective / C. Ober [et al.] // Immunol. Rev. – 2011. – Vol. 242, No. 1. – P. 10-30.
3. Identification of key genes in allergic rhinitis by bioinformatics analysis / Y. Zhang [et al.] // J. Int. Med. Res. – 2021. – Vol. 49, No. 7. – doi: 10.1177/030006052110295215.
4. Age-of-onset information helps identify 76 genetic variants associated with allergic disease / M.A.R. Ferreira [et al.] // PLoS Genet. – 2020. – Vol. 16, No. 6. – e1008725.
5. Tsang, M. The role of new IL-1 family members (IL-36 and IL-38) in atopic dermatitis, allergic asthma, and allergic rhinitis / M. Tsang, X. Sun, C. Wong // Curr. Allergy Asthma Rep. – 2020. – Vol. 20, No. 8. – P. 40.
6. Chong, S. Epidemiology of allergic rhinitis and associated risk factors in Asia / S. Chong // World Allergy Organ. J. – 2018. – Vol. 11, No. 1. – P. 17.
7. Боков, Д.О. Аллергенный профиль полного экстракта пыльцы березы (*Betula pendula* Roth): изучение методологических подходов к идентификации и количественному определению мажорного белка Bet v 1 методом ВЭЖХ/МС/МС / Д.О. Боков, В.В. Смирнов // Химия растительного сырья. – 2014. – № 2. – С. 213-218.
8. Cui, Q. The assessment of TNF- α gene polymorphism association with the risk of allergic rhinitis in the Chinese Han population / Q. Cui, J. Li, J. Wang // Int. J. Gen. Med. – 2021. – Vol. 14. – P. 5183-5192.

9. Psychosocial impact of ocular surface allergic inflammatory disorders / S. Mendelson [et al.] // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* – 2021. – Vol. 21, No. 5. – P. 465-471.
10. Impact of rhinitis on work productivity: A systematic review / O. Vandenplas [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* – 2018. – Vol. 6, No. 4. – P. 1274-1286.
11. Portelli, M. Genetic risk factors for the development of allergic disease identified by genome-wide association / M. Portelli, E. Hodge, I. Sayers // *Clin. Exp. Allergy.* – 2015. – Vol. 45, No. 1. – P. 21-31.
12. Фрейдин, М.Б. Синтропные гены аллергических заболеваний / М.Б. Фрейдин, В.П. Пузырев // *Генетика.* – 2010. – Т. 46, № 2. – С. 255-261.
13. Association of IL-4 polymorphisms with allergic rhinitis in Jordanian population / B. Moh'd Al-Rawashdeh [et al.] // *Medicina (Kaunas).* – 2020. – Vol. 56, No. 4. – P. 179.
14. IL-4 gene polymorphisms and their association with atopic asthma and allergic rhinitis in Pakistani patients / S. Micheal [et al.] // *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* – 2013. – Vol. 23, No. 2. – P. 107-111.
15. Relationships between IL-13 and IL-4 genotypes and aeroallergens with risk of allergic rhinitis in Iranian-Azeri / N. Valatabar [et al.] // *Pediatr. Allergy Immunol. Pulmonol.* – 2020. – Vol. 33, No. 1. – P. 33-38.
16. The differences in the involvements of loci of promoter region and Ile50Val in interleukin-4 receptor α chain gene between atopic dermatitis and Japanese cedar pollinosis / T. Takeshi [et al.] // *Allergol. Int.* – 2012. – Vol. 61, No. 1. – P. 57-63.
17. TNF-alpha contributes to the development of allergic rhinitis in mice / M. Iwasaki [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2003. – Vol. 112, No. 1. – P. 134-140.
18. Song, Y. TNF superfamily protein-protein interactions: feasibility of small-molecule modulation / Y. Song, P. Buchwald // *Curr. Drug. Targets.* – 2015. – Vol. 16, No. 4. – P. 393-408.
19. Strong association between the -308 TNF promoter polymorphism and allergic rhinitis in Pakistani patients / K. Minhas [et al.] // *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* – 2010. – Vol. 20, No. 7. – P. 563-566.
20. Associations of TNF α -308G>A, TNF α -238G>A, IL-1 α -889C>T and IL-10 -1082G>A genetic polymorphisms with atopic diseases: asthma, rhinitis and dermatitis / Ž. Babić [et al.] // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2016. – Vol. 169, No. 4. – P. 231-240.
21. Association of ADAM33 gene polymorphisms with adult allergic asthma and rhinitis in a Chinese Han population / D. Su [et al.] // *BMC Med. Genet.* – 2008. – Vol. 9. – P. 82.
22. Association between ADAM33 polymorphisms and asthma risk: a systematic review and meta-analysis / H.F. Li [et al.] // *Respir. Res.* – 2019. – Vol. 20, No. 1. – P. 38.
23. Polymorphisms in ADAM33 are associated with allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen / L. Cheng [et al.] // *Clin. Exp. Allergy* – 2004. – Vol. 34, No. 8. – P. 1192-1201.
24. Frequency of genetic polymorphisms of ADAM33 and their association with allergic rhinitis among Jordanians / M. Zihlif [et al.] // *Gene.* – 2013. – Vol. 531, No. 2. – P. 462-466.
25. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris / F.J. Smith [et al.] // *Nat. Genet.* – 2006. – Vol. 38, No. 3. – P. 337-342.
26. Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children / S. Weidinger [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 121, No. 5. – P. 1203-1209.
27. Filaggrin null mutations and childhood atopic eczema: a population-based case-control study / S. Brown [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 121, No. 4. – P. 940-946.
28. Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis / T. Nomura [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 119, No. 2. – P. 434-440.
29. The prevalence and descriptive epidemiology of atopic dermatitis in Singapore school children / Y.K. Tay [et al.] // *Br. J. Dermatol.* – 2002. – Vol. 146, No. 1. – P. 101-106.
30. Akiyama, M. FLG mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema: spectrum of mutations and population genetics / M. Akiyama // *Br. J. Dermatol.* – 2010. – Vol. 162, No. 3. – P. 472-477.
31. Allergic sensitization and filaggrin variants predispose to the comorbidity of eczema, asthma, and rhinitis: results from the Isle of Wight birth cohort. / A. Ziyab [et al.] // *Clin. Exp. Allergy.* – 2014. – Vol. 44, No. 9. – P. 1170-1178.

32. Filaggrin mutations increase allergic airway disease in childhood and adolescence through interactions with eczema and aeroallergen sensitization / A. Chan [et al.] // Clin. Exp. Allergy. – 2018. – Vol. 48, No. 2. – P. 147-155.
33. Возрастная рестрикция аллельных вариантов генов HLA-DRB1 и DQB1 у больных поллинозами / Е.Е. Андреева [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2011. – Т. 6, № 1. – С. 28-32.
34. Goldberg, A. MHC structure and function – antigen presentation. Part 1. / A. Goldberg, L. Rizzo // Einstein (Sao Paulo). – 2015. – Vol. 13, No. 1. – P. 153-156.
35. Association of Japanese cedar pollinosis and sensitization with HLA-DPB1 in the Japanese adolescent / W. Morii [et al.] // Allergol. Int. – 2018. – Vol. 67, No. 1. – P. 61-66.
36. Иммуногенетические маркеры поллинозов из числа аллельных вариантов генов HLA-DRB1 и DQB1 / Е.Е. Андреева [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2010. – Т. 5, № 3. – С. 25-30.
37. Wang, J. Meta-analysis of the association study between allergic rhinitis and HLA-II gene (DQB1) in Northern China / J. Wang // J. Healthc. Eng. – 2021. – Vol. 2021. – P. 4356770.
38. Association of interleukin-12B rs6887695 with susceptibility to allergic rhinitis / S. Falahi [et al.] // Immunol. Invest. – 2021. – Vol. 69, No. 2. – P. 189-195.
39. Vignali, D. IL-12 family cytokines: immunological playmakers / D. Vignali, V. Kuchroo // Nat. Immunol. – 2012. – Vol. 13. – P. 722-728.
40. Association between IL-33 gene polymorphism (Rs7044343) and risk of allergic rhinitis / S. Falahi [et al.] // Immunol. Invest. – 2020. – P. 1-11. – doi: 10.1080/08820139.2020.1804399.
41. Zhang, W. Association between vitamin D receptor gene polymorphism rs2228570 and allergic rhinitis / W. Zhang, Y. Xu // Pharmgenomics Pers. Med. – 2020. – Vol. 13. – P. 327-335.
42. Association between SP-A rs1965708 gene polymorphism and allergic rhinitis risk in Chinese population / X. Yin [et al.] // J. Clin. Lab. Anal. – 2021. – Vol. 35, No. 7. – e23828.

GENE POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF POLYNOSES: LITERATURE REVIEW

Parkhamchuk O.Y., Fomina E.G., Grigorieva E.E.

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

The growth of allergic diseases is one of the most pressing medical and social problems. In recent years, there has been a significant increase in atopic IgE-mediated diseases, such as bronchial asthma, seasonal allergic rhinitis (hay fever), atopic dermatitis, and allergic conjunctivitis. The results of numerous studies aimed at finding genetic predictors of the formation of allergic diseases in various ethnic groups are contradictory. This can probably be explained by complex genetic interactions, as well as the influence of environmental factors on the genetic background of the studied population. This review provides information on the role of allelic polymorphisms of some genes associated with the development of allergic diseases.

Keywords: hay fever, allergic rhinitis, gene polymorphism.

Поступила 27.10.2021

ПОСТИНФЕКЦИОННЫЙ И ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ К ВОЗБУДИТЕЛЮ COVID-19 У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧКИ

**¹Амвросьева Т.В., ¹Бельская И.В., ¹Богущ З.Ф., ¹Поклонская Н.В.,
¹Юденкова Т.В., ²Калачик О.В., ²Чеботарева Т.К.**

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

²Государственное учреждение «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Работа посвящена изучению характеристик постинфекционного и поствакцинального гуморального ответа к коронавирусу SARS-CoV-2 у реципиентов почки. По результатам изучения их постинфекционного серостатуса установлено, что спустя 40 и более дней от начала появления клинических симптомов COVID-19 IgG к S и/или N белкам возбудителя обнаруживались у 89,1% обследованных. При этом серопревалентность и напряжённость антительного ответа к S белку была выше, по сравнению с таковыми к N белку. В разных возрастных группах доли серопозитивных лиц к возбудителю COVID-19 варьировали от 76,9% (более 64 лет) до 93,9% (50-64 года). Они зависели также от тяжести перенесённого заболевания: при бессимптомном и легком течении серопревалентность составила 83,3%, при среднетяжелом и тяжелом – 93,0%. В группе реципиентов, иммунизированных вакцинами Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) и Vero Cell, анти-SARS-CoV-2 IgG были выявлены у 64,3%. При этом иммунологическая эффективность вакцинации реципиентов почки была достоверно ниже, чем иммунокомпетентных лиц.

Ключевые слова: COVID-19, коронавирус SARS-CoV-2, постинфекционный иммунитет, поствакцинальный иммунитет, реципиенты почки.

Введение. Как известно, иммунокомпрометированные лица, которыми являются реципиенты почки, относятся к группе высокого риска тяжелого течения COVID-19, что объясняет особый интерес к этой категории пациентов в условиях высокой заболеваемости данной инфекцией и массовой вакцинации доступными вакцинами. Имеющиеся на сегодняшний день данные по проблеме формирования постинфекционного и поствакцинального гуморального иммунитета у реципиентов солидных органов весьма немногочисленны и разрозненны [1-5]. Они получены на небольших группах пациентов и в целом свидетельствуют о наличии определенных различий в развитии антительного ответа после перенесенной инфекции, по сравнению с таковым у иммунокомпетентных лиц. Это касается, прежде всего, кинетики появления и длительности сохранения постинфекционных антител, а также их количественных показателей [6-8]. Вместе с тем, в условиях постоянного появления новых геновариантов SARS-CoV-2, регистрации повторных заболеваний, а также случаев развития инфекции у привитых вакцинами против COVID-19, данная проблема требует дальнейшего изучения, что, несомненно, будет способствовать повышению качества и эффективности лабораторного и клинического сопровождения этой группы пациентов. Особый интерес применительно к реципиентам почки представляют исследования, направленные на изучение иммунологической и клинической эффективности существующих сегодня вакцинных препаратов. Полученная информация явится основой для определения тактики иммунопрофилактики против COVID-19 в до- и посттрансплантационный периоды.

До начала настоящих исследований системное изучение характеристик и особенностей формирования постинфекционного и поствакцинального иммунного ответа к коронавирусу SARS-CoV-2 у реципиентов почки в Республике Беларусь не проводилось. Данные, касающиеся кинетики и сроков появления и сохранения разных классов антител к возбудителю COVID-19, особенностей развития иммунитета в целом у данной группы населения практически отсутствуют.

В настоящей статье представлены результаты проведенных нами в 2021 г. исследований по изучению характеристик гуморального постинфекционного и поствакцинального иммунного ответа к коронавирусу SARS-CoV-2 у реципиентов почки.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили с февраля по ноябрь 2021 г.

Изучение кинетики, частоты образования постинфекционных анти-SARS-CoV-2 IgG и их количественных показателей осуществляли в группе реципиентов почки (n=119) с ПЦР подтвержденным диагнозом COVID-19 с легким, среднетяжелым и тяжелым течением инфекции, находящихся под наблюдением в Минском НПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии.

Исследования по изучению характеристик поствакцинального иммунитета проводили в группе привитых реципиентов (n=28) после двухэтапной иммунизации вакцинами Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) или Vero Cell (Синофарм, Китай).

Всего проанализировано 163 образца венозной крови. Для обнаружения IgG к S белку коронавируса SARS-CoV-2 использовали набор SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ («Вектор-Бест», Россия). Выявление IgG к N белку коронавируса SARS-CoV-2 осуществляли с помощью наборов «SARS-CoV-2-NP-ИФА-G» (Беларусь). Постановку иммуноферментного анализа (ИФА) и расчет значений коэффициента позитивности (КП) выполняли в соответствии с инструкциями производителей.

В сравнительных исследованиях использовали простую рандомизированную выборку иммунокомпетентных переболевших COVID-19 пациентов, соответствующую по возрастной и половой структуре группе обследуемых реципиентов (n=97).

Достоверность обнаруживаемых различий оценивали по методу хи-квадрат.

Результаты исследования и обсуждение. Для исследований сформировано 2 группы реципиентов почки: переболевшие COVID-19 (n=119) и привитые вакцинами Гам-КОВИД-Вак (n=18) и Vero Cell (n=10). В таблице 1 представлены основные демографические характеристики каждой из групп.

Таблица 1. – Характеристики групп реципиентов, участвовавших в серологическом тестировании

Параметр оценки	Доля реципиентов почки, %	
	переболевшие COVID-19 (n=119)	привитые Гам-КОВИД-Вак и VeroCell (n=28)
Возраст:		
18-34 года	16,8%	7,1%
35-49 лет	31,1%	39,3%
50-64 года	41,2%	35,7%
более 64 лет	10,9%	17,9%
Пол:		
женщины	45,4%	31,0%
мужчины	54,6%	67,9%

Характеристики постинфекционного антительного ответа

В результате проведенных исследований установлено, что спустя 40 и более дней от начала появления у реципиентов почки клинических симптомов COVID-19 IgG к S и/или N белкам возбудителя обнаруживались у 89,1% из них. При этом частота детекции IgG к S белку была выше по сравнению с таковой к N белку (84,9% и 59,7% соответственно).

У большей половины тестируемых лиц (55,5%) наблюдалось одновременное выявление IgG как к S, так и к N белку. У 29,4% пациентов обнаруживались только IgG к S белку, и лишь у 4,2% – только к N белку (рисунок 1).

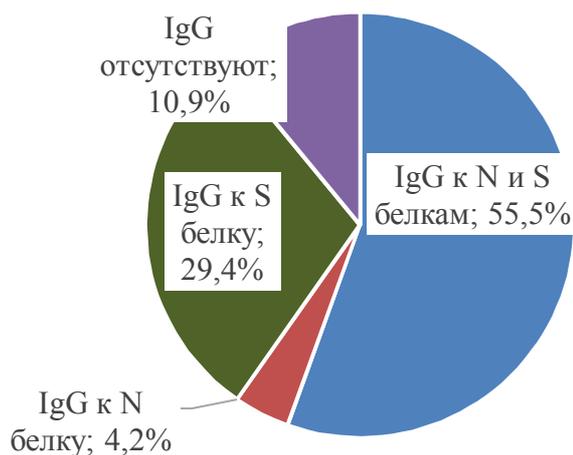


Рисунок 1. – Частота выявления анти-SARS-CoV-2 антител у реципиентов почки к разным белкам возбудителя COVID-19

Сравнительный анализ серопревалентности к коронавирусу SARS-CoV-2 у реципиентов почки и иммунокомпетентных лиц показал отсутствие статистически значимых различий как по IgG к N белку, так и по IgG к S белку. Хотя показатели в группе реципиентов были несколько ниже (59,7% и 84,9%) по сравнению с таковыми у иммунокомпетентных лиц (82,9% и 91,2%) – рисунок 2.

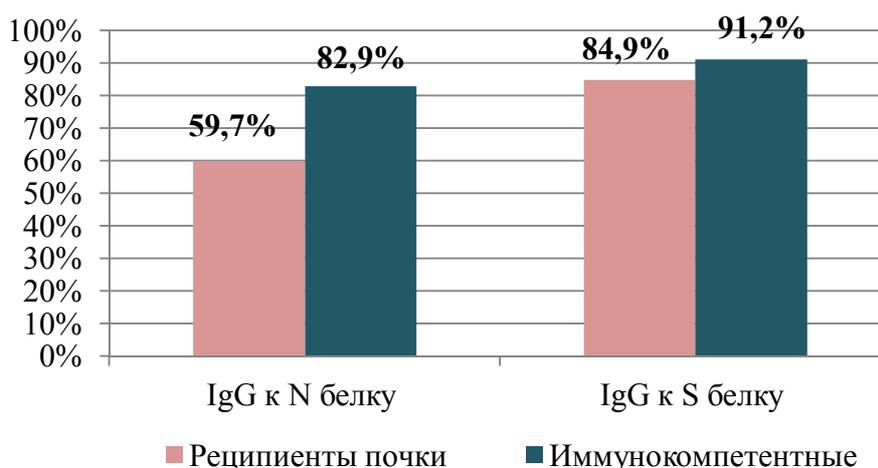


Рисунок 2. – Частота выявления IgG к N и S белкам SARS-CoV-2 у реципиентов почки и иммунокомпетентных лиц

Анализ частоты выявления IgG к N и/или S белкам у реципиентов в зависимости от

возраста показал, что среди лиц 18-64 лет этот показатель составил 80% и более, а у лиц старше 64 лет он был незначительно ниже – 76,9% (таблица 2). Серонегативные по IgG к SARS-CoV-2 реципиенты регистрировались в каждой из возрастных групп: 4 человека в группе 18-34 года и по 3 – в группах 35-49 лет, 50-64 года и старше 64 лет.

Таблица 2. – Результаты исследований по выявлению IgG к коронавирусу SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19 реципиентов почки разных возрастных групп

Возрастная группа	Доля серопозитивных реципиентов по IgG к N белку, %	Доля серопозитивных реципиентов по IgG к S белку, %	Доля серопозитивных реципиентов по IgG к N и/или S белкам, %
18-34 года	45,0	80,0	80,0
35-49 лет	62,2	86,5	91,9
50-64 года	63,3	89,8	93,9
Старше 64 лет	61,5	69,2	76,9

Оценка напряженности сформировавшегося у реципиентов почки постинфекционного гуморального иммунитета, базирующаяся на показателях индивидуально рассчитанных КП по IgG к S и N белкам, показала их большой разброс – от 1,1 до >12 (рисунок 3). При этом доля серопозитивных реципиентов с максимально высокими КП (>12) к S белку составила 47,9%, в то время как к N белку такие показатели не были зарегистрированы ни у одного их реконвалесцентов.

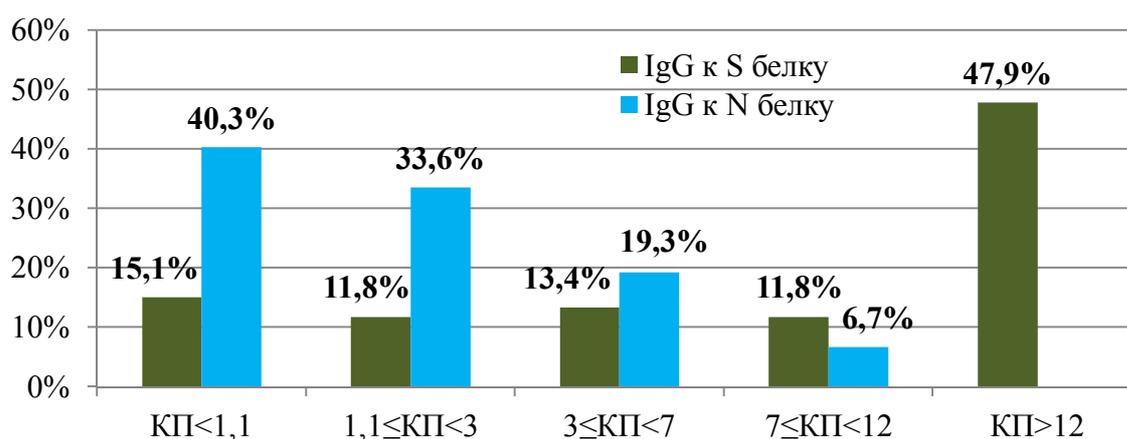


Рисунок 3. – Напряжённость постинфекционного иммунного ответа у реципиентов почки, оцениваемая по значениям КП

В обследованной группе у 40,3% реципиентов инфекция протекала бессимптомно или в легкой форме. 59,7% составили реципиенты со среднетяжелым и тяжелым течением инфекции. Частота регистрации реконвалесцентов с различными формами течения COVID-19 в зависимости от возраста представлена на рисунке 4. Анализ данных показал, что среди реципиентов почки в возрастной категории 18-34 года в 2 раза чаще регистрировалось бессимптомное течение инфекции или она протекала в легкой форме. У пациентов старше 34 лет преобладало среднетяжелое и тяжелое течение инфекции, при этом в возрастных группах 50-64 года и >64 лет среднетяжелая и тяжелая формы COVID-19 регистрировались в 2 раза чаще, чем бессимптомная и легкая.

Антивирусные IgG к S и/или N белкам коронавируса SARS-CoV-2 определялись у 93,0% пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением инфекции. Среди реципиентов

с бессимптомным и легким течением доля серопозитивных составила 83,3%. У иммунокомпетентных реконвалесцентов эти показатели достигали 98,3% и 94,7% соответственно.

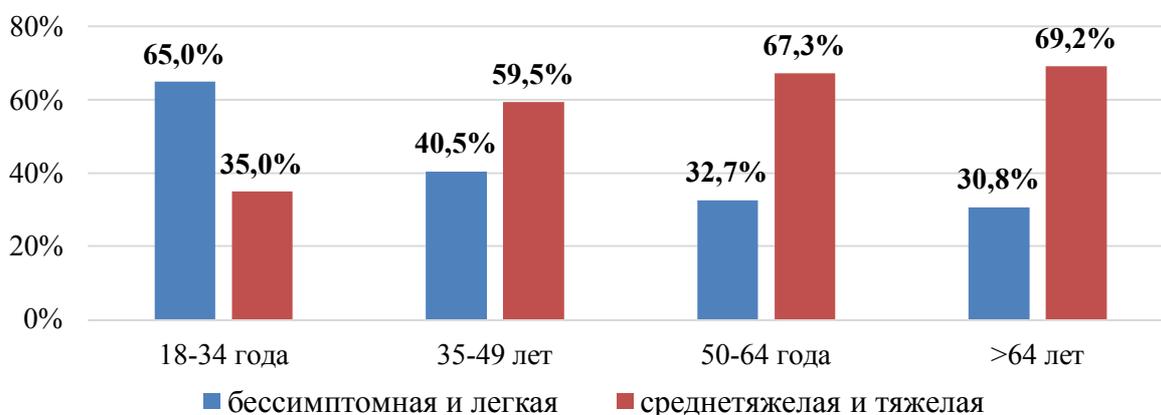


Рисунок 4. – Частота регистрации бессимптомной и легкой, среднетяжелой и тяжелой форм инфекции в разных возрастных группах реципиентов почки

Независимо от возраста (рисунок 5) частота выявления антиSARS-CoV-2 антител оказалась несколько выше у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением инфекции, а у лиц старше 64 лет эта разница была более существенной (серопревалентность у пациентов с бессимптомным и легким течением составила 50,8 %, со среднетяжелым и тяжелым – 88,9 %).

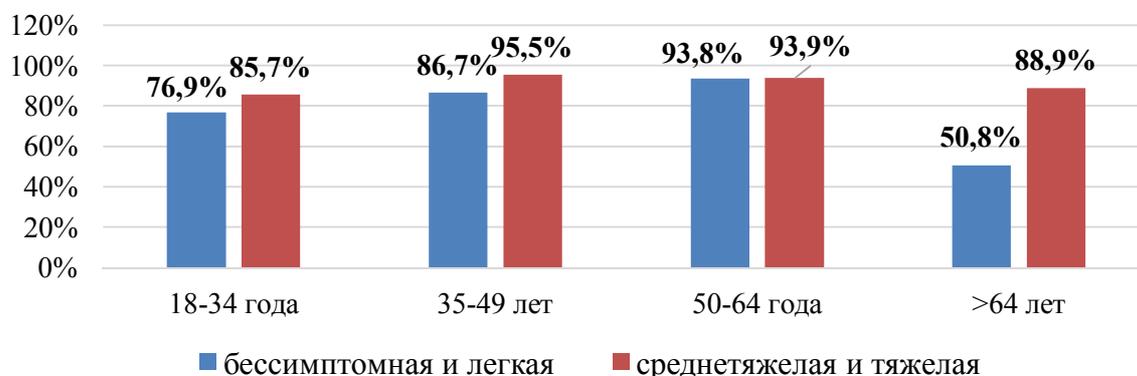


Рисунок 5. – Серопревалентность у реципиентов почки в зависимости от возраста и от тяжести перенесённого заболевания

Сравнительный анализ частоты выявления IgG к N белку SARS-CoV-2 в зависимости от тяжести перенесённого заболевания показал, что у реципиентов почки, переболевших в бессимптомной и лёгкой форме, этот показатель составил 52,1%, в то время как среди иммунокомпетентных пациентов с той же формой инфекции – 71,1%. Среди пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением инфекции IgG к N белку выявлялись у 64,9% реципиентов и 74,6% иммунокомпетентных лиц (рисунок 6). При сравнительном анализе частоты выявления IgG к S белку SARS-CoV-2 были получены следующие показатели серопревалентности: при бессимптомном и лёгком течении – 79,2% у реципиентов почки и 94,7% у иммунокомпетентных лиц, при среднетяжелом и тяжелом течении они составили 88,7% и 94,9% соответственно. Приведенные данные свидетельствуют о

том, что независимо от формы течения COVID-19 показатели серопревалентности по IgG и к N, и к S белку SARS-CoV-2 в обследованной группе реципиентов почки были ниже таковых, регистрируемых в группе иммунокомпетентных лиц, однако эти различия не были статистически достоверными ($p > 0,001$).

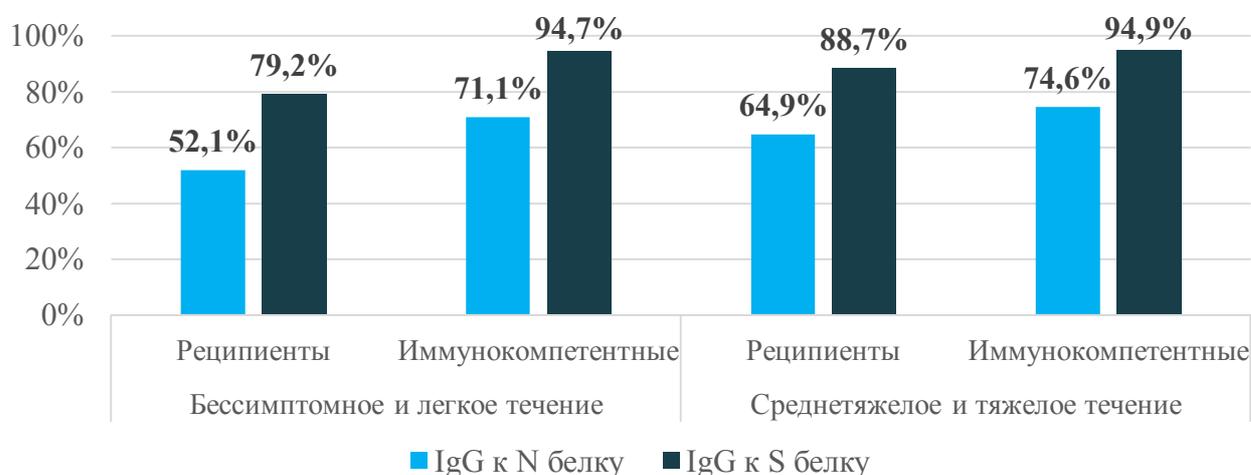


Рисунок 6. – Сравнительный анализ частоты выявления IgG к N и S белкам SARS-CoV-2 у реципиентов почки и иммунокомпетентных лиц в зависимости от тяжести перенесённого заболевания

Изучение напряженности постинфекционного иммунитета выявило наличие зависимости величины КП от тяжести перенесённой инфекции как в группе переболевших реципиентов, так и в группе иммунокомпетентных реконвалесцентов (рисунок 7). Так, при бессимптомном и легком течении инфекции КП>3 по IgG к N белку регистрировался у 40,0% серопозитивных реципиентов, а при среднетяжелом и тяжелом течении этот показатель был выше и составил 46,0%. Среди серопозитивных иммунокомпетентных лиц КП>3 по IgG к N регистрировался у 43% реципиентов с лёгкой формой COVID-19 и у 59,0% – с тяжелой формой. Достоверных различий в сравниваемых группах выявлено не было.

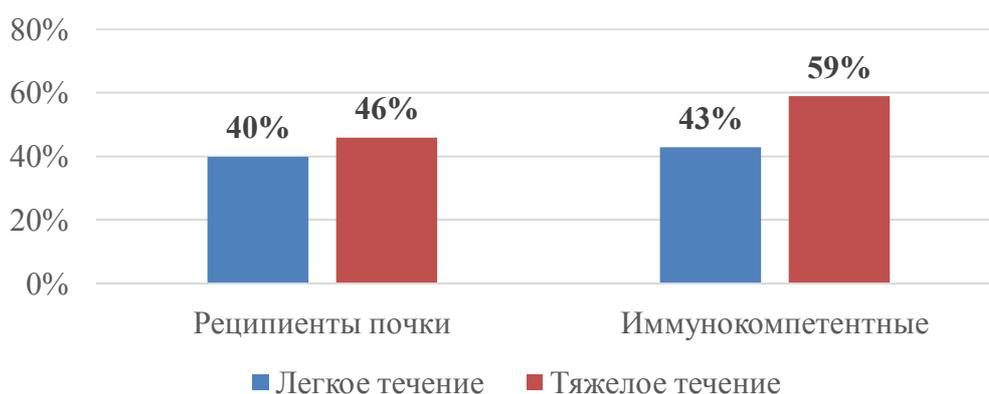


Рисунок 7. – Сравнительный анализ регистрируемых высоких концентраций антител к N белку у реципиентов и иммунокомпетентных лиц в зависимости от тяжести перенесённого заболевания

Сравнительный анализ наличия высоких концентраций антител (КП>12) к S белку показал, что при легком течении инфекции этот показатель регистрировался у 50,0% реципиентов почки и у 71,0% иммунокомпетентных лиц, а при тяжелом – у 56,0% и у 80,0% соответственно (рисунок 8). Таким образом, несмотря на общие закономерности антителиобразования, в группе иммунокомпетентных лиц доли серопозитивных с высокими концентрациями IgG к S белку SARS-CoV-2 (КП>12) были больше, чем в группе реципиентов почки, хотя эти различия не были статистически достоверными ($p>0,001$).



Рисунок 8. – Сравнительный анализ присутствия высоких концентраций антител (КП >12) к S белку у реципиентов и иммунокомпетентных лиц в зависимости от тяжести перенесённого заболевания

Длительность сохранения постинфекционных антиSARS-CoV-2 IgG в группе реципиентов почки и группе иммунокомпетентных лиц оценивали в процессе серотестирования в разные сроки от начала заболевания (рисунок 9). Данные, полученные при выявлении IgG к N белку, свидетельствовали о том, что у 60% переболевших реципиентов данные антитела сохранялись на протяжении относительно короткого периода – в течение 3 месяцев от начала инфекции. При этом у 40% реципиентов постинфекционные антитела выявлялись значительно дольше, вплоть до 15 месяцев. В целом динамика исчезновения анти-SARS-CoV-2 антител у реципиентов повторяла закономерности этого процесса у иммунокомпетентных пациентов.

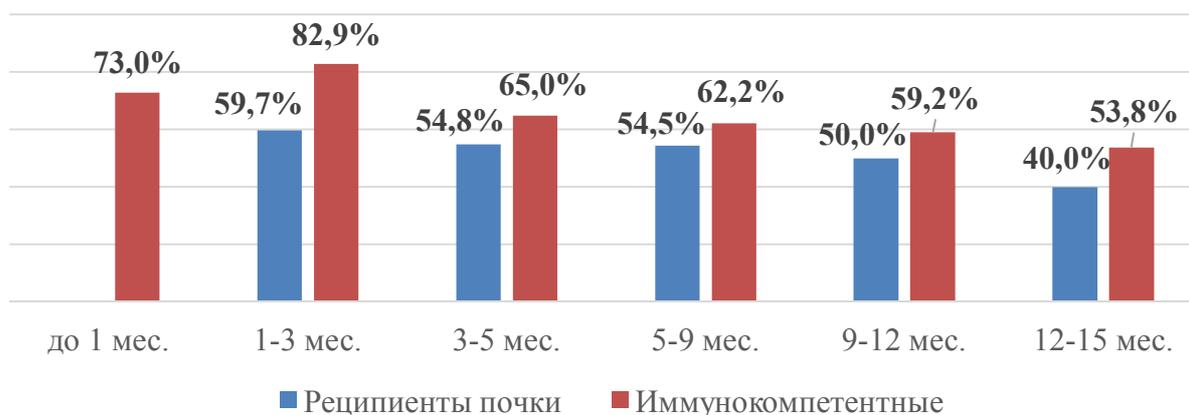


Рисунок 9. – Длительность сохранения антиSARS-CoV-2 IgG у реципиентов почки и иммунокомпетентных реконвалесцентов

Характеристики поствакцинального антительного ответа

Согласно результатам проведенных исследований по изучению серостатуса реципиентов почки (n=28), иммунизированных вакцинами Гам-КОВИД-Вак и Vero Cell, общий уровень серопревалентности к возбудителю составил 64,3%. Этот показатель оказался достоверно ниже ($p < 0,001$) показателей серопревалентности среди иммунокомпетентных лиц, привитых как Гам-КОВИД-Вак (98,8%), так и Vero Cell (95,0%).

У реципиентов почки, ранее переболевших COVID-19, после иммунизации любой из вакцин в 100% случаев регистрировались IgG к SARS-CoV-2. У не болевших ранее и привитых Гам-КОВИД-Вак или Vero Cell анти-SARS-CoV-2 антитела были обнаружены у 46,7% и 50% лиц соответственно (рисунок 10).

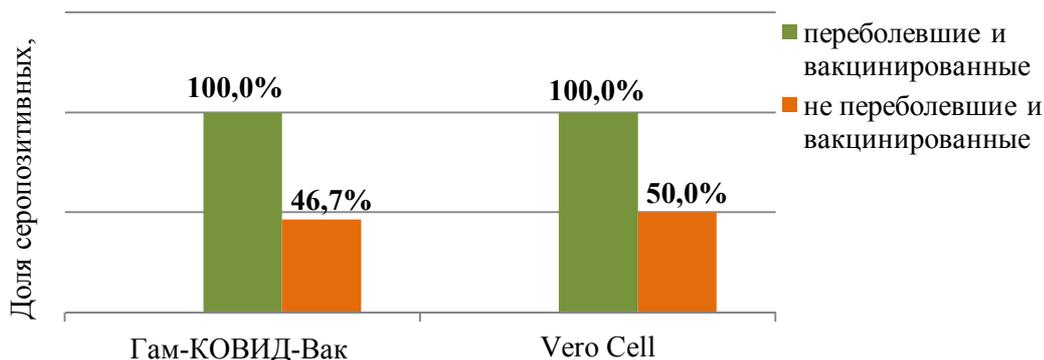


Рисунок 10. – Частота выявления антиSARS-CoV-2 IgG у переболевших и вакцинированных и не переболевших и вакцинированных реципиентов почки

В сравнительном аспекте с группой иммунокомпетентных лиц, перенесших COVID-19 в период до вакцинации Гам-КОВИД-Вак и Vero Cell, были получены аналогичные результаты. Что касается не переболевших и привитых иммунокомпетентных лиц, то доля серопозитивных среди них была достоверно выше ($p < 0,001$) как после вакцинации Гам-КОВИД-Вак (98,8%), так и Vero Cell (92,9%).

Анализ напряженности поствакцинального иммунитета у реципиентов почки по антителам к S белку SARS-CoV-2 показал, что значение КП>3 регистрировалось у 49,9% привитых вакциной Гам-КОВИД-Вак и 75,0% – Vero Cell. Доля привитых, имеющих чрезвычайно высокую концентрацию антител в крови (КП>12), составила 44,4% и 50,0% после иммунизации Спутник V и Vero Cell соответственно (рисунок 11).

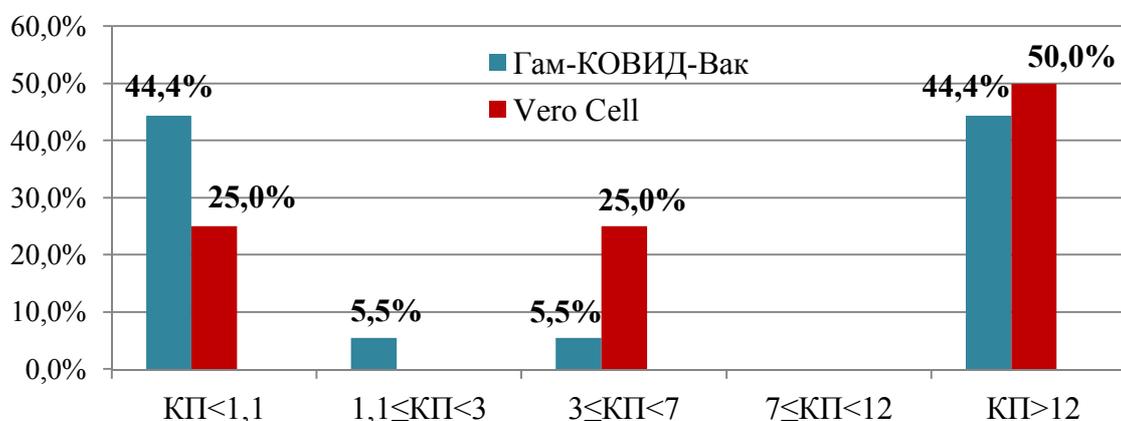


Рисунок 11. – Напряженность поствакцинального иммунитета у реципиентов почки по антителам к S белку SARS-CoV-2 после иммунизации Гам-КОВИД-Вак и Vero Cell

Что касается показателей напряженности поствакцинального иммунитета (по антителам к S белку SARS-CoV-2) среди иммунокомпетентных лиц, то в этой группе значения КП>3 регистрировались у 94,0% привитых вакциной Гам-КОВИД-Вак и 88,2% – Vero Cell. Доля привитых, имеющих чрезвычайно высокую концентрацию антител в крови (КП>12), составила 64,4% и 44,4% после иммунизации Гам-КОВИД-Вак и Vero Cell соответственно.

Заключение. Полученные в настоящей работе результаты впервые проведенных в нашей стране исследований по изучению постинфекционного и поствакцинального антительного ответа у реципиентов почки дают основания сделать следующие предварительные выводы:

- постинфекционные IgG к SARS-CoV-2 обнаруживались у подавляющего большинства (89,1%) тестируемых лиц;
- анти-SARS-CoV-2 IgG к N белку регистрировались у 59,7% реципиентов почки, к S белку – у 84,9%;
- доли серопозитивных по IgG к N и/или S белкам реципиентов в разрезе возрастных групп колебались незначительно в пределах от 76,9% (более 64 лет) до 93,9% (50-64 года);
- в зависимости от тяжести перенесенного заболевания антивирусные IgG к S и/или N белкам коронавируса SARS-CoV-2 определялись у 93,0% реципиентов со среднетяжелым и тяжелым течением инфекции и у 83,3% – с бессимптомным и легким;
- изучение напряженности постинфекционного гуморального иммунитета показало наличие зависимости величины КП от тяжести перенесённой инфекции;
- характер формирования постинфекционного антительного ответа как в группе реципиентов почки, так и в группе иммунокомпетентных реконвалесцентов имел общие закономерности;
- показатели серопревалентности, напряжённости и длительности сохранения постинфекционных антител в группе реципиентов почки были ниже, чем в группе иммунокомпетентных лиц, хотя статистически значимых различий между ними не выявлено;
- после иммунизации вакцинами Гам-КОВИД-Вак и Vero Cell доля серопозитивных реципиентов почки составила 64,3%;
- иммунологическая эффективность вакцинации реципиентов почки оказалась достоверно ниже, чем иммунокомпетентных лиц.

Полученные результаты дополняют накопленную мировой наукой и практикой информацию по проблеме формирования постинфекционного и поствакцинального иммунитета у реципиентов почки в условиях заболеваемости COVID-19 и применения доступных в нашей стране вакцинных препаратов Гам-КОВИД-Вак и Vero Cell. Представленные данные диктуют необходимость проведения дальнейших углубленных исследований по этой проблеме.

Литература

1. COVID-19 in solid organ transplant recipients: A single-center case series from Spain / M. Fernández-Ruiz [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2020. – Vol. 20, No. 7. – P. 1849-1858.
2. In-depth virological assessment of kidney transplant recipients with COVID-19 / I. Benotmane [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2020. – Vol. 20, No. 11. – P. 3162-3172.
3. Low immunization rates among kidney transplant recipients who received two doses of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine / I. Benotmane [et al.] // *Kidney Int.* – 2021. – Vol. 99, No. 6. – P. 1498-1500.
4. Impaired anti-SARS-CoV-2 humoral and cellular immune response induced by Pfizer-BioNTech BNT162b2 mRNA vaccine in solid organ transplanted patients / M. Miele [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2021. – Vol. 21, No. 8. – P. 2919-2921.
5. Basic-Jukic, N. SARS-CoV-2 infection after two doses of mRNA vaccine in renal transplant

recipients / N. Basic-Jukic, J. Ivo // *Transpl. Infect. Dis.* – 2021. – Vol. 23, No. 4. – e13628.

6. Kinetics of torquetenovirus DNA load in a recent kidney transplant recipient with mild SARS-CoV-2 infection and a failed antibody response / S. Querido [et al.] // *Transpl. Infect. Dis.* – 2020. – Vol. 23, No. 2. – e13524.

7. SARS-CoV-2 serologic immune response in exogenously immunosuppressed patients / M.L. Zilla [et al.] // *J. Appl. Lab. Med.* – 2021. – Vol. 6, No. 2. – P. 486-490.

8. Viral clearance and serological response to SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients / J. Silvano [et al.] // *Transplant. Proc.* – 2021. – Vol. 53, No. 4. – P. 1180-1186.

POST-INFECTIOUS AND POST-VACCINAL HUMORAL RESPONSE TO SARS-COV-2 IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS

¹Amvrosieva T.V., ¹Belskaya I.V., ¹Bohush Z.F., ¹Paklonskaya N.V.,
¹Yudziankova T.V., ²Kalachik O.V., ²Chebotareva T.K.

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

²*Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus*

The work is dedicated to the study of the characteristics of post-infectious and post-vaccination humoral response to SARS-CoV-2 coronavirus in kidney transplant recipients. The results of the study of their post-infectious serostatus showed that after 40 or more days from the onset of the onset of clinical symptoms of COVID-19 IgG to S and/or N proteins of the pathogen were detected in 89.1% of the examined persons. At the same time, the seroprevalence and intensity of the antibody response to the S protein were higher than those to the N protein. In different age groups, the proportion of seropositive individuals to the causative agent of COVID-19 varied from 76.9% (over 64 years old) to 93.9% (50-64 years old). They also depended on the severity of the disease: with asymptomatic and mild course, seroprevalence was 83.3%, with the moderate and severe one it reached 93.0%. In the group of recipients immunized with Gam-COVID-Vac (Sputnik V) and Vero Cell vaccines, anti-SARS-CoV-2 IgG were detected in 64.3%. At the same time, the immunological efficiency of vaccination of kidney recipients was significantly lower than that of immunocompetent individuals.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2 coronavirus, post-infectious immunity, post-vaccination immunity, kidney transplant recipients.

Поступила 08.12.2021

БИОМАРКЕРЫ ПОЧЕЧНОГО ПОРАЖЕНИЯ ПРИ ГЛОМЕРУЛОПАТИЯХ

¹Асташенок А.Н., ²Козыро И.А., ²Сукало А.В., ¹Полещук Н.Н., ²Кондратенко О.А.

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

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

Резюме. Определена экспрессия маркеров апоптоза, антифосфолипидного синдрома (sAPO-1/FAS, аннексин V(AnV)) и эндотелиальной дисфункции (молекулы межклеточной адгезии – sICAM-1, sVCAM-1) в сыворотках крови, полученных от 52 детей (от 3 до 17 лет) с неиммунными (подгруппа I, n=13), иммунными (подгруппа II, n=25) нефропатиями, а также заболеваниями мочевыводящих путей (группа сравнения, n=14). В I подгруппе (n=13, 100%) выявлены вариации в концентрации фактора sAPO-1/FAS от 0,046 до 0,24 нг/мл (при норме 0,023±0,002 нг/мл). Уровень AnV у этих детей соответствовал значениям нормы. У детей из подгруппы II концентрация sAPO-1/FAS значительно превышала (от 0,2 до 0,24 нг/мл) показатели нормы. У 6 пациентов (24%) из этой подгруппы количественные значения AnV также превышали показатели нормы в 1,1-1,2 раза (7,5-8,49 нг/мл), а у 1 пациента (4%) – в 3,1 раза (21,06 нг/мл). В группе сравнения концентрация этих биомаркеров соответствовала референсным значениям. По биомаркерам эндотелиальной дисфункции установлено, что у 10 детей (40%) подгруппы II отмечались вариации в экспрессии sVCAM-1 от 0 до 1,2 нг/мл (при норме 0,7-0,9 нг/мл). При этом уровень sICAM-1 в обеих анализируемых подгруппах и группе сравнения соответствовал показателям нормы и находился в диапазоне от 50 до 67 нг/мл.

Ключевые слова: апоптоз, диагностика, иммунобиохимический анализ, наномолекулярные биомаркеры, эндотелиальная дисфункция.

Введение. Факторы развития ренальных заболеваний у детей разнообразны. Активно обсуждаются системные заболевания организма, вирусные поражение клубочков и почечных канальцев, врожденные аномалии нефрона и/или мочевыводящих путей, гипертензия и др. [1]. Актуальной задачей в настоящее время является поиск и анализ наиболее информативных и ранних диагностических показателей биологических жидкостей организма (кровь, моча и др.), позволяющих по количественным значениям прогнозировать течение и скорость прогрессирования патологических процессов в ренальной ткани для выбора оптимальной тактики этиопатогенетической терапии [2]. Тем не менее, многие аспекты, касающиеся изменений в экспрессии наномолекулярных биомаркеров апоптоза (фактор sAPO-1/FAS), антифосфолипидного синдрома (аннексин V), эндотелиальной дисфункции (молекулы межклеточной адгезии – sVCAM-1, sICAM-1) и других белковых компонентов при заболеваниях почек у детей остаются малоизученными.

Цель работы – оценить уровень экспрессии и значимость определения наномолекулярных биомаркеров (апоптоза, антифосфолипидного синдрома, эндотелиальной дисфункции) в крови пациентов как показателей нарушения ренального гомеостаза.

Материалы и методы исследований. Клиническое обследование детей проводилось на базе УЗ «2-ая городская детская клиническая больница г. Минска и включало уточнение жалоб, сбор анамнеза, а также проведение клинического, лабораторного, иммунологического, инструментального, морфологического исследования. Для иммунобиохимического анализа исследованы 52 образца сывороток крови детей (возраст – от 3 до 17 лет) с неиммунными (подгруппа I, n=13) и иммунными (подгруппа II, n=25) заболеваниями почек, а также пациентов с врожденными аномалиями мочевой системы (ВАМС) (группа сравнения, n=14) на биомаркеры sAPO-1/FAS, аннексин V, sICAM-1, sVCAM-1. Количественное определение их концентрации проводили с использованием

твёрдофазных иммуноферментных тест-систем: Human sFas/sAPO-1 ELISA kit (E-ELH5537, Elabscience, США) и Human ANXA 5 ELISA kit (E-EL-H0422, Elabscience, США), Human sICAM-1 ELISA kit (E-EL-R2850, США), Human sVCAM-1 ELISA kit (E-EL-H5587, США).

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ проводили в программе Statistica 7.0 с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты представляли, как среднее \pm стандартное отклонение.

Результаты исследования и их обсуждение. Проанализированы образцы сывороток крови от детей с неиммунными (подгруппа I) и иммунными заболеваниями (подгруппа II) почек в сравнении с биообразцами, полученными от детей с заболеваниями мочевыводящих путей. Выявлены более выраженные колебания в концентрации фактора sAPO-1/FAS у детей с иммунными нефропатиями (таблица).

Таблица. – Количественные значения белкового фактора sAPO-1/FAS, аннексина V, молекул межклеточной адгезии (sVCAM-1, sICAM-1) в сыворотке крови у детей с нефропатиями

Анализируемый биомаркер	Концентрация (нг/мл)		Референсные значения (нг/мл)
	Подгруппа I	Подгруппа II	
sAPO-1/FAS	0,046-0,2	0,2-0,24	0,023 \pm 0,002
Аннексин V	не выявлен	0-21,06	0-6,7
sVCAM-1	0-0,49	0-1,2	0 (0,7-0,9)
sICAM-1	не выявлен	0-55	231,60 \pm 60,87

Установлено, что у 13 детей отмечались колебания в концентрации белка sAPO-1/FAS (от 0,029 до 0,24 нг/мл) при нормальных значениях данного биомаркера для сыворотки крови, не превышающих 0,023 \pm 0,002 нг/мл. У 3 детей из этой подгруппы (17,6%) уровень анализируемого белка был в норме. В группе сравнения уровень данного биомаркера также соответствовал референсным значениям. Наиболее высокие значения (до 0,24 нг/мл) в концентрации фактора sAPO-1/FAS установлены у детей с иммунными нефропатиями, имеющими в анамнезе системный васкулит, IgA-васкулит, системную красную волчанку, IgA-нефропатию. При анализе концентрации другого биомаркера (AnV) установлено, что уровень данного белка в большинстве анализируемых проб (n=45, 86,5%) соответствовал нормальным значениям (от 0 до 6,7 нг/мл). У 6 пациентов (24%) концентрация биомаркера превышала показатели нормы в 1,1-1,2 раза (7,5-8,49 нг/мл). У одного пациента (4%) с IgA-васкулитом отмечено превышение в 3,1 раза (21,06 нг/мл) данного показателя.

Известно, что процесс апоптоза реализуется через ряд патологических процессов в почках: поражении гломерул, тубулоинтерстициального компонента, аутоиммунных и воспалительных заболеваниях. Интенсивность апоптоза прямо коррелирует со снижением фильтрационной функции почек, что лежит в основе хронических заболеваний renalной ткани [3].

Патомеханизм повышения концентрации AnV у пациентов с заболеваниями почек до настоящего времени активно дискутируется. Известно, что данный белок экспрессируется преимущественно в дистальных канальцах нефрона и эпителиальных клетках капсулы Боумена-Шумлянского [4]. В ряде работ показано, что повышение концентрации AnV приводит к повышению активности лизосомальных ферментов (например, N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы) нефрона и низкомолекулярных белков, таких как α 1-микроглобулин и β 2-микроглобулин [5, 6]. Известно, что фермент N-ацетил- β -D-глюкоза-

минидаза (НАГ) секретируется эпителием проксимальных канальцев и участвует в деградации мукополисахаридов и гликопротеинов. В норме НАГ не проходит через гломерулярный барьер [7]. При повреждении клеток эпителия происходит высвобождение НАГ, что приводит к увеличению концентрации фермента в первичной моче. Это может быть ранним субклиническим маркером повреждения проксимальных канальцев и окружающей их соединительной ткани при острых и хронических заболеваниях почек. В наших исследованиях значительно большие концентрации АнV отмечены у 7 детей с иммунными заболеваниями почек (IgA-vasкулитом, системным васкулитом, системной красной волчанкой). В ряде других работ показано, что значительно выше концентрации АнV были отмечены в группах пациентов нефротическим синдромом, волчаночным нефритом, IgA-нефропатией по сравнению с другими нозологиями, при этом самый высокий уровень был выявлен у пациентов с нефротическим синдромом. Можно предположить, что выявленные изменения в экспрессии АнV в сыворотке крови у части детей с иммунными нефропатиями являются результатом реализации патофизиологического механизма, связанного с апоптозом и активацией циркулирующих клеточных элементов (лимфоцитов, тромбоцитов, лейкоцитов), участвующие в каскаде иммунопатологических реакций.

По биомаркерам эндотелиальной дисфункции (sVCAM-1, sICAM-1) установлено, что у 10 детей (40%) из подгруппы II отмечались колебания в концентрации белка sVCAM-1 (от 0 до 1,2 нг/мл) при нормальных значениях данного биомаркера для сыворотки крови, не превышающих 0,7-0,9 нг/мл. У 42 детей (80,7%) уровень анализируемого белка был в норме. При анализе концентрации другого биомаркера (sICAM-1) установлено, что уровень данного белка во всех анализируемых пробах соответствовал показателям нормы и не превышал значений 50-67 нг/мл.

Известно, что молекулы адгезии играют решающую роль в патогенезе некоторых форм нефропатий. Молекулы адгезии, которые принадлежат к семейству хемокинов (интерлейкин-18 и RANTES), и суперсемейству иммуноглобулинов (sICAM-1 и sVCAM-1), могут быть повышены при диабетической нефропатии, а также высоко экспрессируются при других нефропатиях, таких как волчаночный нефрит, IgA-нефропатия, подагрическая нефропатия, мембранозная нефропатия и болезнь минимальных изменений (БМИ) [8]. Предполагается, что их гиперэкспрессия указывает на грубые нарушения в трансэндотелиальном транспорте и нарушении прочности щелевидных контактов между эндотелиоцитами. Однако до сих пор имеется недостаточно сведений о роли этих и других молекул адгезии в качестве прогностических биомаркеров нефропатий.

Следует отметить, что в здоровом организме и при патологических процессах клеточная адгезия имеет жизненно важное значение в следующих процессах: рециркуляция и движение лейкоцитов, дифференциация клеток и организация ткани для поддержания структуры ткани, активация и связь между иммунными клетками, а также размножение и метастатическое распространение опухолевых клеток. В частности, адгезия лейкоцитов является фундаментальным явлением при воспалении, поскольку лейкоциты, как сообщается, являются жизненно важными медиаторами повреждения при некоторых типах гломерулонефрита, васкулита, тубулоинтерстициального нефрита и отторжения трансплантата. В проведенном исследовании отмечена высокая экспрессия фактора sVCAM-1 у детей с IgA-vasкулитом, фокально-сегментарным гломерулосклерозом, IgA-нефропатией и БМИ.

В ряде работ показано, что повышенная экспрессия ICAM-1 происходит в клубочках, клетках проксимальных канальцев и интерстициальных клетках при нескольких воспалительных заболеваниях почек, таких как активный гломерулонефрит с «полунетями», мезангиопролиферативный гломерулонефрит, IgA-нефропатия, васкулит Шенлейна-Геноха и волчаночный нефрит класса II и IV) [9, 10]. Однако уровни ICAM-1 могут

быть нормальными или сниженными при БМИ. Белковый фактор VCAM-1 изначально экспрессируется на клетках почечных канальцев у пациентов с васкулитом и «полулунным» нефритом, волчаночным нефритом (класс II, III, IV и V), IgA-нефропатией и острым интерстициальным нефритом, вызванным применением нестероидных противовоспалительных препаратов. Фактически, результаты наших исследований показывают, что повышенная экспрессия VCAM-1 в сыворотке крови у части пациентов с иммунными нефропатиями, вероятно, обусловлены тем, что циркулирующие в крови лейкоциты обеспечивают повышенную адгезию к почечной ткани, что вероятно опосредует их повреждение. Интересно, что уровни VCAM-1, как правило, являются самыми высокими у пациентов с системной красной волчанкой и васкулитом. В наших исследованиях гиперэкспрессия фактора VCAM-1 отмечена у 4 детей, имеющих в анамнезе системную красную волчанку и системный васкулит.

Заключение. По анализу биологических жидкостей (кровь, моча) организма выявлены клинические маркеры ренальной патологии. По результатам иммунобиохимического исследования установлено, что у детей с заболеваниями почек в крови выявляются в различных количественных соотношениях биомаркеры апоптоза, антифосфолипидного синдрома и молекулы межклеточной адгезии. Дальнейшая качественная и количественная оценка биомаркеров апоптоза и эндотелиальной дисфункции позволит получить важные сведения о тонких звеньях молекулярного повреждения структурных элементов 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. Jakubowska, A. Importance of Annexin V in kidney diseases / A. Jakubowska, K. Kiliś-Pstrusińska // *Postępy Hig. Med. Dosw.* – 2015. – Vol. 28. – P. 153-157.
5. Markoff, A. Expression and functions of annexins in the kidney / A. Markoff, V. Gerke // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2005. – Vol. 289. – P. 949-956.
6. Мельник, А. Диагностическая роль N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы как раннего маркера повреждения почек / А. Мельник // *Почки.* – 2016. – № 4. – С. 37-47.
7. Mohkam, M. The role of urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase in diagnosis of kidney diseases / M. Mohkam, A. Ghafari // *J. Ped. Nephrol.* – 2015. – Vol. 3. – P. 84-91.
8. Uwaezuoke, S. The role of adhesion molecules in nephropathies: The diagnostic applications / S. Uwaezuoke // *Integrative Molecular Medicine.* – 2019. – Vol. 6. – P. 1-5.
9. Danilewicz, M. Glomerular and tubulointerstitial expression of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and leucocyte function associated antigen-1 (LFA-1) in membranous glomerulopathy (MGN) and mesangial proliferative glomerulonephritis (MesProGN) / M. Danilewicz, M. Wagroska-Danilewicz // *Nefrologia.* – 1998. – Vol. 18. – P. 357-436.
10. Increased plasma sVCAM-1 is associated with severity in IgA nephropathy / L. Zhu [et al.] // *BMC Nephrol.* – 2013. – Vol. 14. – P. 1-7.

BIOMARKERS OF RENAL DAMAGE IN GLOMERULOPATHIES

¹Astashonok A.N., ²Kozyro I.A., ²Sukalo A.V., ¹Poleshchuk N.N., ²Kondratenko O.A.

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

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The article presents the results of the expression biomarkers of apoptosis, antiphospholipid syndrome (sAPO-1/FAS, annexin V) and endothelial dysfunction (sICAM-1, sVCAM-1,) in blood serum, obtained from 52 children (3-17 years old) with nonimmune (subgroup I, n=13), immune-mediated (subgroup II, n=25) kidney disorders in comparison with urinary tract infection group (n=14). In first subgroup (n=13, 100%) various concentration fluctuations of the sAPO-1/FAS factor (from 0,046 to 0,24 ng/ml) in comparison with normal level (0,023±0,002 ng/ml) were revealed. The AnV level in these children were corresponded the reference range. At the same time, in subgroup II, the concentration of sAPO-1/FAS was significantly exceeded (from 0,2 to 0,24 ng/ml) to the reference range. In 6 patients (24%) from this subgroup, the AnV quantitative values were exceeded the normal range to 7,5-8,49 ng/ml, and in 1 patient (4%) – a three-fold increase to 21,06 ng/ml. In comparison group, the concentration of these biomarkers were corresponded the reference range. Based on endothelial dysfunction biomarkers, it was found that in 10 children (40%) of subgroup II showed variations in the expression of sVCAM-1 (from 0 to 1,2 ng/ml) with the normal range (0,7-0,9 ng/ml). At the same time, the level of sICAM-1 in both analyzed subgroups and in comparison group was in the range (from 50 to 67 ng/ml).

Keywords: apoptosis, diagnostics, immunobiochemical analysis, nanomolecular biomarkers, endothelial dysfunction.

Поступила 11.11.2021

ДЕТЕКЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДИСФУНКЦИИ РЕСНИЧАТЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С РЕСПИРАТОРНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

¹Асташонок А.Н., ¹Полешук Н.Н., ²Петрученя А.В., ³Бобровничай В.И.

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

²Учреждение здравоохранения «Минская центральная районная больница», Минский район, Республика Беларусь

³Учреждение здравоохранения «3-я городская детская клиническая больница», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Описан цитоморфологический профиль соскобного эпителия носовой полости и в ряде случаев слизистой трахеи у детей с острыми и хроническими заболеваниями дыхательной системы в сравнении с контрольной группой. Констатировано перераспределение реснитчатых эпителиоцитов носовой полости в пользу слизь-секретирующих (бокаловидных) клеток (группа острых респираторных инфекций – соотношение 5:3; группа хронических заболеваний легких (ХЗЛ) – 1:2 при нормальных значениях данных показателей 5:1. С использованием атомно-силовой микроскопии выявлены отклонения в микрогеометрии фактора формы ресничек. На основании электронномикроскопического анализа у 5 пациентов идентифицирована патология наружных динеиновых ручек, что позволило установить наличие наследственно обусловленной аномалии аксонемы ресничек.

Ключевые слова: наноскопический анализ, реснитчатый эпителий, цилиарная дискинезия, электронная микроскопия.

Введение. Болезни органов дыхания являются важной проблемой современной педиатрии. В структуре общей заболеваемости детей и подростков они стабильно занимают лидирующее положение, составляя от 60% до 71% [1]. Частью патофизиологии всех болезней органов дыхания являются нарушения мукоцилиарной системы [2]. Для понимания природы и патогенеза болезней респираторной тракта, развития новых диагностических возможностей и лечения необходима информация о структуре и функционировании цилиарного эпителия. Применение флуоресцирующих моноклональных антител (к ацетилированному α -тубулину, динеинам DNAH 5, DNAH 11 и др.), позволяет выявлять различные дефекты реснитчатого аппарата эпителиоцитов. Тем не менее, иммунофлуоресцентный метод до сих пор не получил широкого применения из-за недостаточности проведенных исследований по валидации методики в больших когортных группах пациентов. В клинической практике для оценки двигательной активности ресничек и структуры мерцательного эпителия используется метод фазово-контрастной и темнопольной микроскопии щеточных биоптатов слизистой оболочки бронхов или носа. Однако применение данных методов не исключало появление диагностических ошибок. В этой связи актуальной задачей исследования является применение комбинированных подходов на основе как светооптического, так и высокоразрешающего наноскопического анализа, которые позволяют качественно и полуколичественно проводить морфометрическую оценку мерцательного эпителия с выявлением разнопрофильных нарушений его функции [3].

Цель исследования – с использованием комплекса иммуноцитологического, нано- и ультраструктурного анализов идентифицировать патогномичные биомаркеры нарушения структурно-функциональных параметров цилиарного эпителия у детей с заболеваниями респираторного тракта.

Материалы и методы исследования. Проведено взятие мазков-соскобов из носовой полости (69 образцов), слизистой трахеи (18 образцов), полученных от 69 пациентов и разделенных по клиническим критериям на две подгруппы. Первую подгруппу (I, n=51) составили пациенты с острыми и/или рецидивирующими заболеваниями респираторного тракта (фаринготрахеит, обструктивный бронхит, рецидивирующий трахеобронхит, интерстициальная и аспирационная пневмония). Во вторую подгруппу (II, n=18) вошли дети, имеющие в анамнезе хронические заболевания легких наследственной, врожденной и приобретенной природы (муковисцидоз, синдром Картагенера, бронхиальная астма, голопрозенцефалия, трахеомалиция средней трети трахеи, облитерирующий бронхиолит, линейный пневмофиброз, двусторонний мультифокальный пневмофиброз, бронхоэктатическая болезнь). Контролем являлись 35 детей без хронической респираторной патологии, у которых исследовался назальный эпителий цитологическим, иммуноцитохимическим и наноскопическим методом. Для светооптического анализа исследовали мазки из носовой полости, взятые с использованием специальных цитологических щеток. Мазки предварительно фиксировали 96% этиловым спиртом и окрашивали по методу Романовского-Гимза.

Для флуоресцентной микроскопии использовали первичные антитела к DNAH5 белку (polyclonal rabbit DNAH5 antibody (F1107D1, Cusabio) и α -тубулину (monoclonal anti-acetylated tubulin (Lys40) antibody (FNAb00082, FineTest), а также вторичные антитела Alexa Fluor 488-Goat Anti Rabbit IgG (FNSA-0056, FineTest), Alexa Fluor 488-Goat Anti Mouse IgG (FNSA-0056, FineTest). Учет результатов исследования осуществляли на флуоресцентном микроскопе Nikon E50i (Япония) в зеленом спектре при пиковой длине волны 495 нм / 519 нм.

Наноскопический анализ реснитчатых эпителиоцитов, бокаловидных клеток и других клеточных структур получали на микроскопе Nanoscope IIIa MultiMode (Bruker, США), оборудованном J-сканером. Обработку топографических изображений проводили с использованием программы Gwyddion 2.53, WSxM 5.0 Develop 9.1.

Для ультраструктурного анализа исследовали биоптаты (карины, главного бронха), полученных от 18 пациентов с хроническими заболеваниями легких (подгруппа II). Материал фиксировали 2,5% р-ром глутарового альдегида, приготовленного на 0,1 М р-ре фосфатно-солевого буфера (рН 7,3), далее постфиксировали 1% р-ром OsO₄ с последующим обезвоживанием в спиртах восходящей концентрации и заливкой в смолы марки Spurr. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Ultracut E (Reichert Jung, Австрия) и исследовали на микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при увеличениях x6000–200 000.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом учреждения здравоохранения «3-я городская детская клиническая больница г. Минска». Для участия в исследовании детей получено добровольное информированное согласие их родителей.

Результаты исследования и обсуждение.

Светооптический (цитологический) анализ. В группе контроля преобладали реснитчатые эпителиоциты с минимальным количеством бокаловидных клеток на фоне единичных лейкоцитов. Соотношение реснитчатых эпителиоцитов к слизь-продуцирующим (бокаловидным) клеткам было 5:1. В мазках-соскобах, взятых из носа детей двух анализируемых подгрупп отмечалась более гетерогенная картина. В подгруппе I наблюдалось увеличение количества бокаловидных клеток по сравнению с реснитчатыми клетками. Соотношение реснитчатых эпителиоцитов к бокаловидным клеткам было сдвинуто и составило 5:3. В подгруппе II отмечался более выраженный дисбаланс в сторону увеличения количества слизь-образующих клеток (до соотношения 1:2). Признаки лейкоцитар-

ной инфильтрации в назофарингиальных мазках регистрировались у пациентов всех анализируемых подгрупп. Превышение количества лейкоцитов (более 10-15 в полях зрения) с пенетрацией ими мукозального эпителия отмечалось у 62,8% детей подгруппы II.

Иммунофлуоресцентная микроскопия применялась для выявления дефектов подвижности ресничек. Благодаря тестированию первичных и вторичных антител в различном диапазоне разведений (1:100; 1:200; 1:500; 1:1000) подобраны оптимальные их концентрации для детекции сигнала от DNAH5 белка – моторного белка ресничек и α -ацетилированного тубулина – структурного белка микротрубочек. Установлено, что в образцах (мазках назального эпителия) у 5 пациентов подгруппы II не наблюдалось характерное свечение ресничек, свидетельствующее об экспрессии на их поверхности молекулярного белка DNAH5. Данный факт свидетельствовал о том, что имеется дисфункция в аппарате аксонемы цилиарных эпителиоцитов наружных динеиновых ручек. При этом возможна как их генетическая утрата, так и вследствие воздействия неблагоприятных факторов среды.

Наноскопический анализ цилиарного аппарата мерцательного эпителия носовой полости и трахеи. Патология реснитчатого аппарата эпителиоцитов идентифицирована у 34 детей из подгрупп I (n=16) и II (n=18). Выделено несколько типов наноструктурных нарушений: 1 – редуцированные реснички (в виде грибовидных бугорков или гребневидных выростов); 2 – короткие (до 2-4 мкм) реснички нормальной толщины (0,2 мкм); 3 – короткие (до 2-4 мкм) сильно утолщенные реснички (3-4 мкм). Совершенно иной уникальный тип наноструктурных нарушений установлен у 5 пациентов из подгруппы II. Здесь реснички располагались хаотично. Отмечалось нарушение их центра ветвления из центросомы клетки. Длина этих ресничек не соответствовала показателям нормы (8-10 мкм), а была достаточно укорочена и не превышала 3-4 мкм. Это может свидетельствовать о структурных нарушениях реснитчатого аппарата. Для уточнения этого использовали далее электронно-микроскопический анализ.

Электронная микроскопия биоптатов из нижних отделов респираторного тракта (карины трахеи, главного бронха). При проведении анализа оценивали состояние эпителиоцитов слизистой оболочки и подслизистой основы. В 4-х случаях выявлены нарушения тонкой внутренней организации ресничек. Констатировано, что на поперечных срезах ресничек (как в трахео-, так и бронхобиоптатах) регистрировалось отсутствие наружных динеиновых ручек. При этом центральные и периферические пары микротрубочек оставались не изменёнными и сохраняли нормальную структурную формулу 9+2.

Слизистая оболочка респираторного тракта обладает местным иммунитетом – MALT (Mucosal Associated Lymphoid Tissues). Известно, что уменьшение количества реснитчатых клеток респираторного тракта, структурные изменения в двигательном аппарате ресничек приводят к нарушению эффективности очистительной функции дыхательной системы. Мукоидный секрет, в состав которого входят группы высокогликозилированных протеинов, нейтральные и кислые гликопротеины, фосфолипиды, застаивается, а затем инфицируется патогенной микрофлорой [4]. Часто в патологический процесс вовлекаются латентные внутриклеточные вирусы (риновирусы, аденовирусы, РС-вирус и др.). Вирусные риносинуситы встречаются в 200 раз чаще бактериальных. Частые респираторные заболевания снижают устойчивость к основным компенсаторным механизмам (адекватный мукоцилиарный клиренс) и вследствие этого формируются рецидивирующие респираторные инфекции, что приводит к повышению риска развития осложнений и формированию раннего развития хронической патологии – хронический синусит, хронический средний отит, хронический бронхит, и др.

При воздействии патогена (вирусная частица или бактерия) на слизистую респираторного тракта происходит десквамация эпителия с полнокровием сосудов микроциркуляторного русла, что ведет к повышению проницаемости сосудистой стенки, нарастает

отек слизистого и подслизистого слоя. Вышеизложенный механизм нарушает правильную работу мукоцилиарного клиренса.

Особую группу составляют относительно редкое наследственное заболевание – первичная цилиарная дискинезия, характеризующаяся генетической гетерогенностью [5]. Распространённость по данным разных авторов может варьироваться от 1:150000 до 1:60000 новорожденных. Наиболее часто заболевание обусловлено отсутствием или дефектами строения наружных динеиновых ручек в структуре ресничек [6]. Могут обнаруживаться дефекты радиальных спиц и микротрубочек или их транспозиция. Ультраструктура ресничек может быть нормальной, но при этом имеется аномалия белка тяжелых цепей аксонемального динеина [7]. В некоторых случаях может отмечаться сочетание нескольких дефектов.

Проведенные исследования с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволили детально охарактеризовать патоморфоз ресничек по параметрам микропрофиля и пространственной организации. Электронно-микроскопический анализ позволил охарактеризовать не только внешний вид ресничек, но и их внутреннюю цитоархитектонику: микротрубочки и филаментозные структуры, а также наружные и внутренние динеиновые ручки. Использование данного подхода наиболее информативно для дифференциации наследственно-обусловленной патологии от хронических заболеваний, связанных с внешними факторами, включая влиянием бактериально-вирусных инфекций.

Перспективным диагностическим подходом выявления цилиарных дискинезий является иммунофлуоресцентный метод с использованием моноклональных антител к структурам двигательного аппарата ресничек: микротрубочкам и динеиновым ручкам. Метод позволил, с одной стороны, подтвердить полученные данные при электронной микроскопии о дефектах в структуре микротрубоччато-ассоциированных структур, а с другой – выявить не визуализируемые конформационные изменения на молекулярном уровне в структуре внутренних органелл, включая трубчатый аппарат.

Заключение. Цитологический анализ клеточных элементов назофарингиальных мазков у детей анализируемых групп показал наличие дистрофического процесса, при котором происходит перераспределение реснитчатых эпителиоцитов носовой полости в пользу слизь-секретирующих (бокаловидных) клеток до соотношения 5:3 (подгруппа I), 1:2 (подгруппа II) при норме 5:1.

С использованием флуоресцентной микроскопии проведен анализ образцов назального эпителия, полученных от пациентов с острыми и хроническими заболеваниями респираторного тракта. У 5 пациентов из подгруппы II характерное свечение ресничек, свидетельствующее об экспрессии на их поверхности белка DNAH5, не регистрировалось.

По результатам АСМ реснитчатого аппарата эпителиоцитов носовой полости и трахеи выявлен ряд наноструктурных нарушений, связанных с изменением фактора формы ресничек: 1 – редуцированные реснички (в виде грибовидных бугорков или гребневидных выростов); 2 – короткие (до 2-4 мкм) реснички нормальной толщины (0,2 мкм); 3 – короткие (до 2-4 мкм) сильно утолщенные реснички (3-4 мкм). Полученные данные позволили установить в 5 случаях тотальные дефекты всего реснитчатого аппарата эпителиоидных клеток. Таким образом, наноскопический анализ может быть использован для выявления аномалий цилиарного аппарата и оценки его структурно-функционального состояния.

На основании анализа структурно-функциональных элементов эпителиоцитов выявлены различные ультраструктурные изменения. У 4 пациентов идентифицирована патология наружных динеиновых ручек, что позволило установить наличие наследственно-обусловленной аномалии аксонемы ресничек.

Литература

1. Таточенко, В.К. Болезни органов дыхания у детей / В.К. Таточенко. – М.: Педиатрия, 2012. – 482 с.
2. Scherzad, A. Current understanding of nasal epithelial cell mis-differentiation / A. Scherzad, R. Hagen, S.J. Hackenberg // *Inflamm. Res.* – 2019. – Vol. 12. – P. 309-317.
3. Патоморфоз мерцательного эпителия респираторного тракта у детей с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей: ультраструктурный и наноскопический анализ / А. Асташонок [и др.] // *Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук.* – 2021. – Т. 18, № 1. – С. 69-79.
4. Лаберко, Е.Л. Современные представления о регуляции мукоцилиарного клиренса / Е.Л. Лаберко, М.Р. Богомильский // *Вестн. Рос. гос. мед. ун-та.* – 2015. – № 1. – С. 60-64.
5. Первичная цилиарная дискинезия у детей / А.А. Баранов [и др.] // *Педиатр. фармакол.* – 2018. – Т. 15, № 1. – С. 20-31.
6. Shapiro, A.J. Value of transmission electron microscopy for primary ciliary dyskinesia diagnosis in the era of molecular medicine: genetic defects with normal and non-diagnostic ciliary ultrastructure / A.J. Shapiro, M.W. Leigh // *Ultrastruct. Pathol.* – 2017. – Vol. 41, No. 6. – P. 373-385.
7. Primary ciliary dyskinesia (PCD): a genetic disorder of motile cilia / M.W. Leigh [et al.] // *Transl. Sci. Rare Dis.* – 2019. – Vol. 4, No. 1-2. – P. 51-75.

DETECTION AND DIFFERENTIATION OF MOLECULAR MARKERS OF CILIARY EPITHELIOCYTES DYSFUNCTION IN CHILDREN WITH RESPIRATORY PATHOLOGY

¹Astashonok A.N., ¹Poleshchuk N.N., ²Petruchenya A.V., ³Bobrovnichy V.I.

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

²*Minsk Central Regional Hospital, Minsk Region, Republic of Belarus*

³*3th City Children's Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus*

The cytomorphological profile of nasal epithelium in children with acute and chronic respiratory disorders was characterized. The redistribution of nasal ciliary epithelial cells in favor of the mucus-secreting (goblet) cells was observed (group with acute respiratory infection – ratio 5:3; group with chronic lung disease – 1:2) with normal values of these indicators 5:1 (control group). Atomic force microscopy revealed deviations in the microgeometry of the cilia shape factor. Based on the electron microscopic analysis, anomalies in external dynein arms of the cilia axoneme were revealed, which made it possible to confirmed in five patients the hereditary respiratory pathology.

Keywords: nanoscopic analysis, ciliated epithelium, ciliary dyskinesia, electron microscopy.

Поступила 04.11.2021

ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

Зверко В.В., Григорьева Е.Е., Фомина Е.Г.

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

Резюме. Крупнейшая пандемия, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, диктует необходимость проведения исследований по изучению механизмов и особенностей формирования клеточного иммунитета при COVID-19. В данной статье изложены результаты определения субпопуляций лейкоцитов (В-лимфоцитов (CD19⁺), активированных (CD3⁺HLA-DR⁺) и регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻)) в периферической крови пациентов с SARS-CoV-2 в сравнении со здоровыми добровольцами.

Ключевые слова: коронавирус SARS-CoV-2, клеточный иммунитет, иммунный статус.

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 2021 г. общее количество случаев с подтвержденным носительством SARS-CoV-2 в мире достигло более 241 208 402 человек; количество пациентов со смертельным исходом превысило 4 906 000.

Коронавирус SARS-CoV-2 принадлежит к роду бета-коронавирус в составе семейства *Coronaviridae*. Геном вируса SARS-CoV-2 представляет собой молекулу РНК положительной полярности, размером около 30 000 п.н. (один из самых больших геномов в мире РНК-вирусов) [1]. Он имеет 79,6% сходства нуклеотидной последовательности с коронавирусом SARS-CoV и 96% сходства с коронавирусом летучих мышей, что указывает на его зоонозное происхождение [2, 3].

Показано, что репликация вирусного генома в клетках организма-хозяина сопряжена с подавлением врожденного иммунитета [4]. 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) [5].

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 – тяжелое течение (одышка, частота дыхания 30 и более в минуту, сатурация крови 93% и менее, PaO₂/FiO₂ 50% в пределах 24-48 часов). Критическое течение заболевания (дыхательная недостаточность, септический шок и/или мультиорганная дисфункция) отмечается в 5% случаев [6]. Для SARS-CoV-2 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 [7]. Тяжесть течения заболевания обусловлена развитием тяжелого острого респираторного дистресс-синдрома и бактериальных осложнений (тяжелой пневмонии, сепсиса, септического шока).

Несмотря на активные противоэпидемические мероприятия, необходимы меры, направленные на поиск новых методов лечения этого опасного заболевания и разработку вакцин. В этой связи одной из важнейших задач является изучение состояния гумо-

рального и клеточного иммунитета в разные промежутки времени у пациентов после перенесённой инфекции разной степени тяжести, вызванной вирусом SARS-CoV-2, для установления и прогнозирования продолжительности иммунной защиты.

Целью настоящего исследования являлось изучение содержания субпопуляций В-лимфоцитов, активированных и регуляторных Т-клеток у пациентов с SARS-CoV-2-инфекцией.

Материалы и методы исследования. В исследовании использованы образцы периферической крови 42 иммунокомпетентных пациентов с подтвержденной SARS-CoV-2-инфекцией и 10 образцов крови здоровых добровольцев.

Наличие SARS-CoV-2-инфекции подтверждали в диагностических тестах по выявлению РНК в назофарингеальных мазках и наличию противовирусных антител в сыворотке крови.

Выделение генетического материала осуществляли с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Выделение РНК производили из 100 мкл назофарингеальных мазков. Постановку ПЦР осуществляли с использованием набора реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (SARS-CoV-2/SARS-CoV) «ДНК-Технология» (ООО ДНК-Технология, Россия).

Детекцию противовирусных антител в сыворотке крови проводили с помощью иммуноферментных наборов для выявления иммуноглобулинов М к коронавирусу SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ, и иммуноглобулинов G к коронавирусу SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ (Россия). Постановку ИФА и расчет коэффициента позитивности (КП) осуществляли в соответствии с инструкциями производителей.

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: CD19, CD45, HLA-DR, CD3, CD4 (Exbio, Чехия); CD25 (Elabscience, США) (таблица).

Таблица. – Панели антител

Панель	Канал флуоресценции			
	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>PerCP</i>	<i>APC</i>
1	CD19		CD45	
2	CD3	CD25	CD4	HLA-DR

Имунофенотип 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 перцентилей. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро-Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных использовали непара-

метрические методы. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$ [8].

Результаты исследования и обсуждение. Исследование показателей клеточного иммунитета включало определение В-лимфоцитов, активированных и регуляторных Т-клеток.

В-лимфоциты – функциональный тип лимфоцитов, играющих важную роль в обеспечении гуморального иммунитета. При контакте с антигеном или стимуляции со стороны Т-клеток некоторые В-лимфоциты трансформируются в плазматические клетки, способные к продукции антител. Другие активированные В-лимфоциты превращаются в В-клетки памяти. Фенотипически В-лимфоциты можно представить в виде CD19+.

В результате проведенного иммунофенотипирования был определен процент содержания В-лимфоцитов (CD19+) у пациентов с SARS-Cov-2-инфекцией и контрольной группы. Полученные данные представлены на рисунке 1.

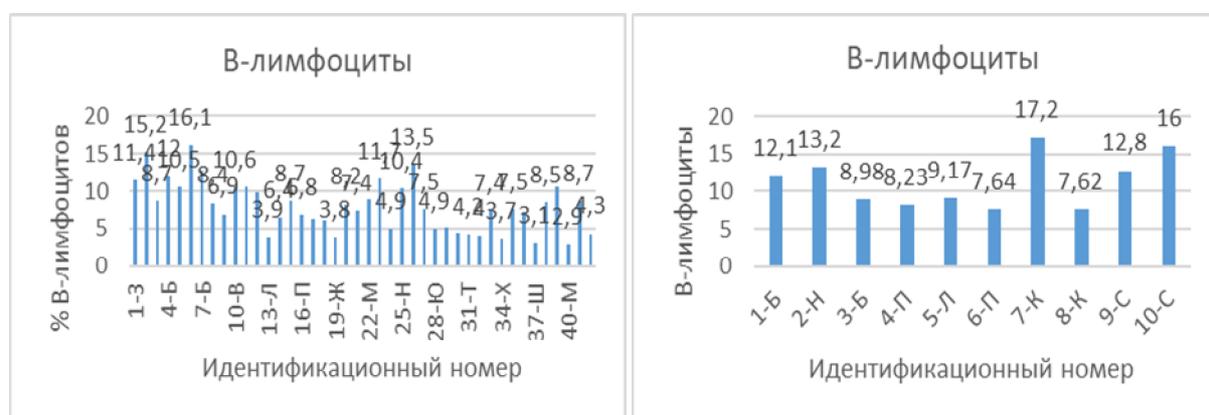


Рисунок 1. – Содержание В-лимфоцитов (CD19+) в венозной крови у исследованных пациентов с SARS-Cov-2-инфекцией (слева) и контрольной группы (справа), представленное в % от лимфоцитов

Анализ содержания В-лимфоцитов (CD19+) в крови пациентов с SARS-Cov-2-инфекцией показал их уменьшение в 1,4 раза ($p < 0,001$) по сравнению с группой здоровых добровольцев (медианы показателей составили 7,5 (4,95; 10,478) и 10,6 (8,42; 13,1), соответственно), что в последующем может приводить к дисфункции гуморального иммунитета.

Фенотипически активированные Т-лимфоциты можно представить в виде CD3+HLA-DR+CD45+. После проведения иммунофенотипирования у исследованных пациентов наблюдался следующий процент активированных Т-клеток, отображённый на рисунке 2.

Анализ содержания активированных Т-клеток (CD3+HLA-DR+) в образцах периферической крови пациентов с SARS-Cov-2-инфекцией показал их уменьшение в 2,4 раза ($p < 0,001$) по отношению к условно здоровым пациентам (медианы показателей: 1,95 (1,4; 2,7) и 4,68 (3,39; 5,25) соответственно).

Т-регуляторные клетки – основные клетки периферической крови, выполняющие регуляторную функцию и опосредующие периферическую иммунологическую толерантность. Эти клетки способны подавлять аутоиммунные и аллергические реакции, отторжение трансплантата, но, вместе с тем, существенно уменьшают резервы противоопухолевого и противои инфекционного 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 мо-

лекулы 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⁺.

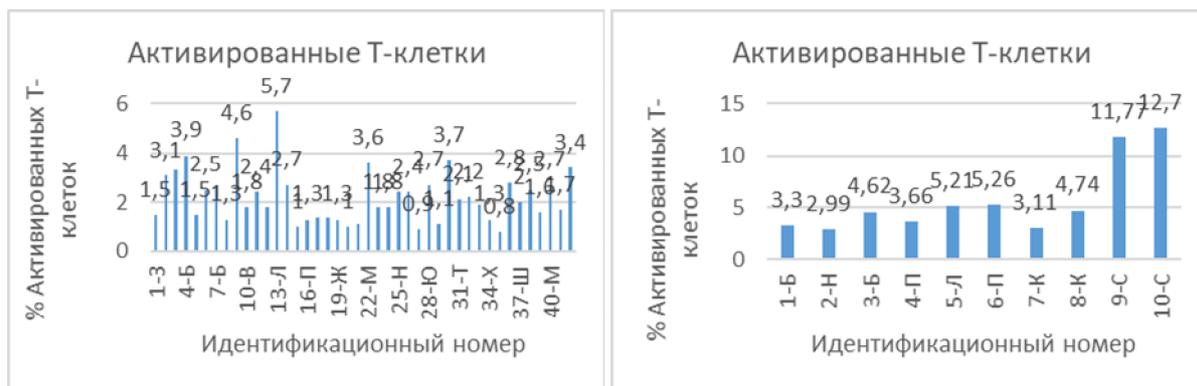


Рисунок 2. – Содержание активированных Т-клеток (CD3⁺HLA-DR⁺) в венозной крови у пациентов с SARS-Cov-2-инфекцией (А) и контрольной группы (Б), выраженное в % от лимфоцитов

Для оценки содержания Т-регуляторных клеток у пациентов с SARS-Cov-2-инфекцией использовали моноклональные антитела к антигену CD 25 и CD 4. Полученные результаты представлены на рисунке 3.



Рисунок 3. – Содержание Т-регуляторных клеток в венозной крови у пациентов с SARS-Cov-2 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 SARS-Cov-2-инфекцией показал их уменьшение в 1,5 раза (p<0,001) по сравнению с группой здоровых добровольцев (медианы показателей: 1,68 (1,04; 2,18) и 2,45 (2,005; 3,845), соответственно), что может свидетельствовать о подавлении противовирусного иммунного ответа.

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлены статистически значимые различия содержания В-лимфоцитов (CD19⁺), активированных (CD3⁺HLA-DR⁺) и регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻) в образцах крови в группе пациентов с SARS-Cov-2-инфекцией и контрольной группе (рисунок 4).

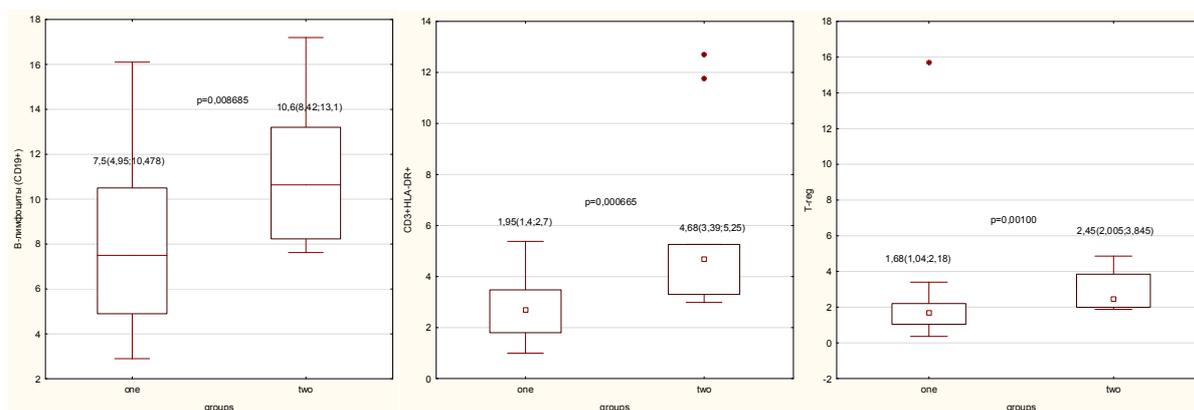


Рисунок 4. – Содержание В-лимфоцитов (CD19⁺), активированных Т-клеток (CD3⁺HLA-DR⁺), регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25^{hi}CD127) в образцах периферической крови пациентов с SARS-Cov-2-инфекцией (one) и условно здоровых добровольцев (two)

Заключение. В результате проведенных исследований выявлены разнонаправленные иммунологические нарушения, однако можно выделить следующие тенденции: дисфункция как гуморального иммунитета в виде снижения уровня В-лимфоцитов, так и клеточного иммунитета (в частности, уменьшение количества активированных и регуляторных Т-клеток).

Изучение иммунного ответа на SARS-CoV-2 имеет решающее значение для прогноза и контроля коронавирусной инфекции, диагностики и формирования индивидуального и популяционного иммунитета, разработки показаний и оценки эффективности вакцинаций и, в конечном итоге, научного прогноза течения пандемии. 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. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention / M.Z. Tay [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2020. – Vol. 20. – P. 363-374.
2. 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.
3. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding / R. Lu [et al.] // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395. – P. 565-574.
4. 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.
5. 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.
6. Wu, Z. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID19) 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.
7. 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.
8. 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.

FEATURES OF LYMPHOCYTES SUBPOPULATION COMPOSITION IN PATIENTS WITH COVID-19

Zverko V.V., Grigorieva E.E., Fomina E.G.

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

The largest pandemic caused by the SARS-CoV-2 coronavirus dictates the need for research to study the mechanisms and characteristics of the cell immunity formation in COVID-19. The article presents the results of determining the leukocyte subpopulations (B-lymphocytes (CD19⁺), activated (CD3⁺HLA-DR⁺) and regulatory T cells (CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻)) in the peripheral blood of patients with COVID-19 in comparison with healthy volunteers.

Keywords: SARS-CoV-2 coronavirus, COVID-19, cellular immunity, immune status.

Поступила 27.10.2021

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО ОТВЕТА К СПЕКТРУ ВИРУСНЫХ АНТИГЕНОВ SARS-COV-2 В ДИНАМИКЕ

¹Русина В.В., ²Бобрукевич Д.В., ²Антоневич Н.Г., ²Гончаров А.Е.,
¹Фомина Е.Г., ¹Владыко А.С., ¹Колтунова Ю.Б.

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

²Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Исследовано наличие антител к спектру антигенов (S-, N-, M-белкам) вируса SARS-CoV-2 в сыворотках пациентов, перенесших COVID-19 в разной степени тяжести. Показано, что выработка антител к различным вирусным антигенам происходит с разной эффективностью и положительно коррелирует с тяжестью заболевания. Ни в одной из исследованных групп не выявлены респонденты, серопозитивные в отношении N-белка и отрицательные в отношении S-белка. Из трёх изученных антигенов наиболее длительно (по крайней мере через 6 месяцев после перенесённой инфекции) сохраняются антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2. Необходимо отметить, что в контрольной группе (респонденты на момент начала исследований имели отрицательный ПЦР тест и серонегативный статус по антителам к SARS-CoV-2) определяются пациенты, серопозитивные в отношении всех трех белков после 3 и 6 месяцев наблюдения. Этот факт может свидетельствовать о том, что данные респонденты перенесли коронавирусную инфекцию в бессимптомной форме, либо со стертыми симптомами инфекции SARS-CoV-2.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, структурные белки, иммунный ответ, лиа-тест.

Введение. В конце декабря 2019 г. несколько медицинских учреждений в Ухане, провинция Хубэй в Китае, сообщили о поступлении пациентов с пневмонией неизвестной этиологии. Как и у пациентов с ранее обнаруженными инфекциями SARS (severe acute respiratory syndrome, 2003 г.) и MERS (middle East respiratory syndrome, 2012 г.) основными симптомами были лихорадка, кашель, дискомфорт в груди, а в тяжелых случаях – одышка и двусторонняя инфильтрация легких. Однако новое коронавирусное заболевание быстро распространилось по всему миру и значительно превзошло SARS и MERS как по количеству инфицированных, так и по пространственному диапазону эпидемических зон.

Вирусная частица SARS-CoV-2 построена из 4 структурных белков: гликопротеин оболочки S (spike) образует шипы короны на поверхности частицы, которые выступают из оболочки; трансмембранные гликопротеины: оболочечный E (envelope) и мембранный M (membrane protein). Внутри вирусной оболочки находится спиральный нуклеокапсид, образованный молекулой РНК и белком нуклеокапсиды N (nucleocapsid) [1]. Потенциально каждый из четырёх структурных белков может выступать в качестве антигена для выработки специфических антител. Антитела против S-белка, особенно RBD (receptor-binding domain) SARS-CoV-2, служат мишенью для разработки вакцин и антивирусной терапии [1].

Согласно литературным данным, антитела к нуклеокапсидному белку появляются раньше, чем к «spike» белку. Доля выявления серопозитивных пациентов с использованием рекомбинантного антигена N в иммуноферментном анализе составляет около 68,2% для IgM; 70,1% – IgG; 80,4% – при совместной детекции IgM и IgG. Использование рекомбинантного антигена S увеличивает процент выявляемости положительных проб, который

составляет: 77,1%, 74,3% и 82,2% соответственно для IgM; IgG и суммарных IgM и IgG [2-4].

Основная проблема кинетики нарастания/снижения титра антител к SARS-CoV-2 – обеспечение надежной защиты. На основании полученных многочисленных научных данных еще предстоит определить, ослабевает ли иммунный ответ с течением времени и достаточно ли остаточного количества антител для эффективной нейтрализации вируса [5].

Материалы и методы исследования. В исследование были включены пациенты, перенёвшие инфекцию COVID-19 в разной степени тяжести: лёгкой, среднетяжёлой, тяжёлой.

Забор материала у респондентов осуществлялся на базе ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси». Биологический материал использовался только с информированного согласия пациента.

Идентификация IgG к S-, N-, M-белкам вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови респондентов осуществлялась с применением иммуноферментного лия-теста (рекомбинантные белки, кодирующие вирусные антигены наносились на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировались с сывороткой крови). Интерпретация полученных результатов проводилась на основании наличия/отсутствия полосы преципитации в области нанесения соответствующих антигенов вируса SARS-CoV-2.

В исследовании использовались рекомбинантные белки: S-белок (BEI Resources, США), M-белок (Fitzgerald, США), N-белок (РНПЦЭМ, Беларусь).

Результаты исследования и обсуждение. В настоящее время разработан широкий ассортимент иммуноферментных тест-систем для выявления антител к SARS-CoV-2, которые характеризуются разными уровнями чувствительности и специфичности. Основными антигенами в этих тест-системах, как правило, являются фрагменты рекомбинантных S-, N-белков, экспрессируемых в различных системах (*E. coli*, дрожжи, клетки насекомых и др.). Тест-системы для выявления M антигена коммерчески малодоступны. Для стандартизации оценки наличия антител одновременно к трём вирусным антигенам использовали «home-made» лия-тест, основанный на выявлении полосы преципитации антиген-антитело на нитроцеллюлозной мембране с предварительно нанесёнными рекомбинантными вирусными белками.

Динамика изменения антител к спектру вирусных антигенов SARS-CoV-2 исследовалась в следующие временные диапазоны: 3 месяца после перенесенной коронавирусной инфекции, 6 месяцев после перенесенной коронавирусной инфекции.

На первоначальном этапе в исследовании приняло участие 211 респондентов, у которых материал был взят через 3 месяца после перенесенной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Из них, на момент настоящего исследования только у 103 пациентов материал был взят повторно еще через 3 месяца. В статистическом анализе использованы только респонденты, принявшие участие в 2 этапах забора крови. Респонденты были разделены на 5 групп: в группу лиц, перенесших COVID-19 в легкой форме, включено 30 человек (29,1%), в среднетяжелой форме – 31 человек (30,1%), в тяжелой форме – 19 человек (18,5%). В группу контроля были включены 9 добровольцев (8,7%), у которых в течение анализируемого периода не было признаков острых респираторных инфекций и других заболеваний, а лабораторная диагностика COVID-19 не проводилась или результат ПЦР-теста был отрицательный. Также была выделена дополнительная группа лиц, получивших вакцину против вируса SARS-CoV-2 – 14 человек (13,6%).

У респондентов, образцы сыворотки крови которых были взяты через 3 месяца после перенесенной коронавирусной инфекции, отмечается высокий процент лиц, серопозитив-

ных к S-белку. При этом, если у респондентов, перенесших инфекцию, вызванную вирусом SARS-CoV-2 в легкой степени, процент положительных результатов составил 96,7%, то в случае средней и тяжелой формы антитела к S-белку были выявлены у 100% респондентов. Высокий процент положительных результатов был и в группе лиц, получивших вакцину против вируса SARS-CoV-2 (71,4%). В контрольной группе у трети респондентов (33,3%) результаты также были положительны, что может свидетельствовать о том, что инфекция протекала в бессимптомной форме. В динамике, через 6 месяцев, антитела к S-белку сохранялись практически у всех добровольцев (легкая степень 96,4%, средняя и тяжелая степень – 100%, у вакцинированных лиц антитела к S-белку определялись у 92,9% (рисунок 1).

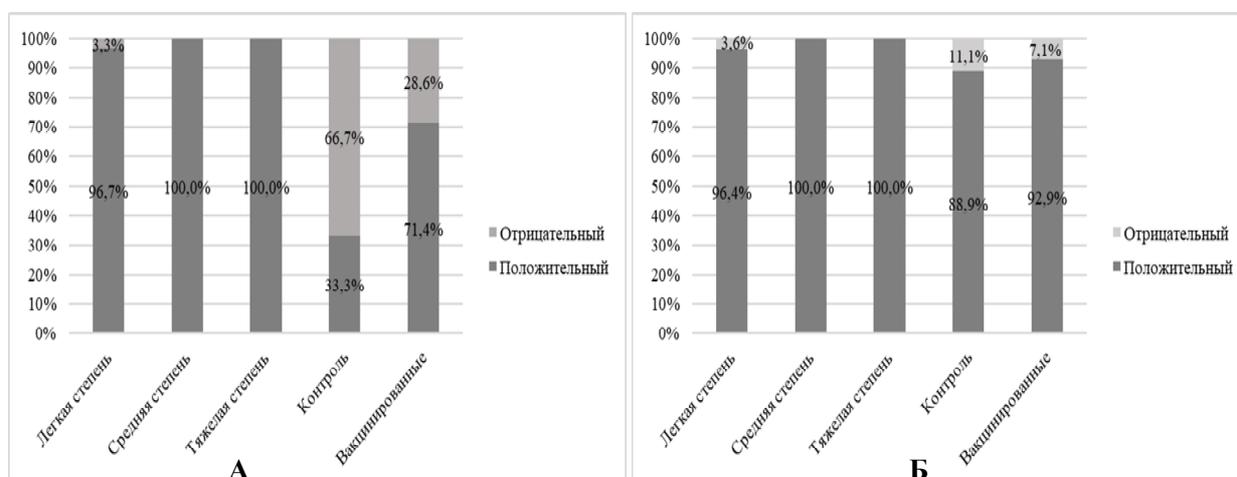


Рисунок 1. – Динамика выявления антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 у пациентов через 3 (А) и 6 (Б) месяцев после перенесенной коронавирусной инфекции

Динамика антител к вирусному N-белку у пациентов через 3 и через 6 месяцев с момента перенесенной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, характеризуется снижением процента положительных образцов. А именно: у респондентов, перенесших коронавирусную инфекцию в легкой форме процент положительных проб составлял 60,0% через 3 месяца после выздоровления, и 42,9% через 6 месяцев. Аналогичная ситуация наблюдалась и в группе респондентов со средним (71,0% через 3 месяца и 48,4% через 6 месяцев) и тяжелым (84,2% и 57,9% через 3 и 6 месяцев соответственно) течением инфекции (рисунок 2).

Динамика выявляемости антител к M-белку вируса SARS-CoV-2 имеет схожую тенденцию, как и к N-белку. Так стоит отметить, что во всех группах через 3 месяца с момента первого забора наблюдается снижение количество положительных проб, при этом, снижение происходит более интенсивно (так, в группе лиц легкой степени тяжести через 3 месяца после выздоровления процент положительных результатов составил 53,3%, еще через 3 месяца этот показатель составил 42,9%, в группах средней и тяжелой степени количество положительных проб уменьшилось на 25% (рисунок 3).

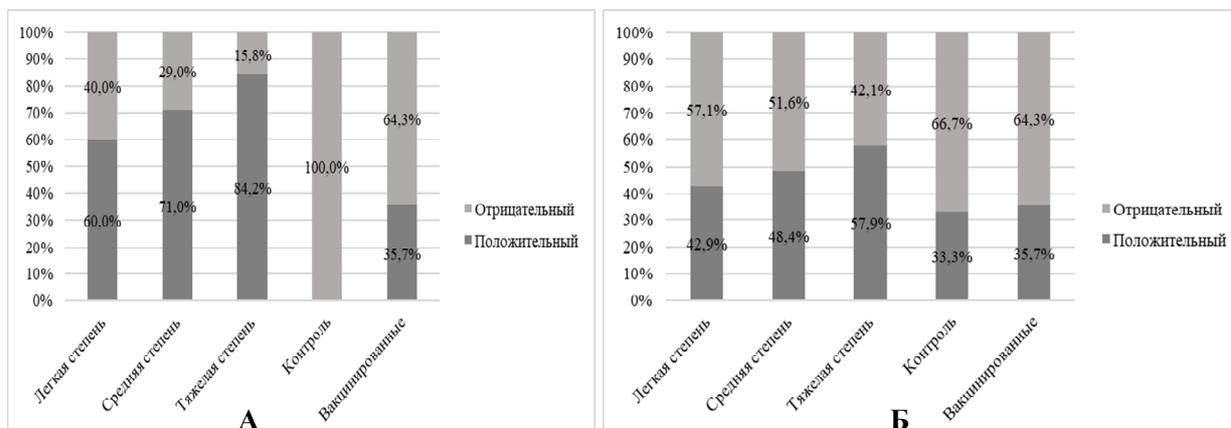


Рисунок 2. – Динамика выявления антител к N-белку вируса SARS-CoV-2 у пациентов через 3 (А) и 6 (Б) месяцев после перенесенной коронавирусной инфекции

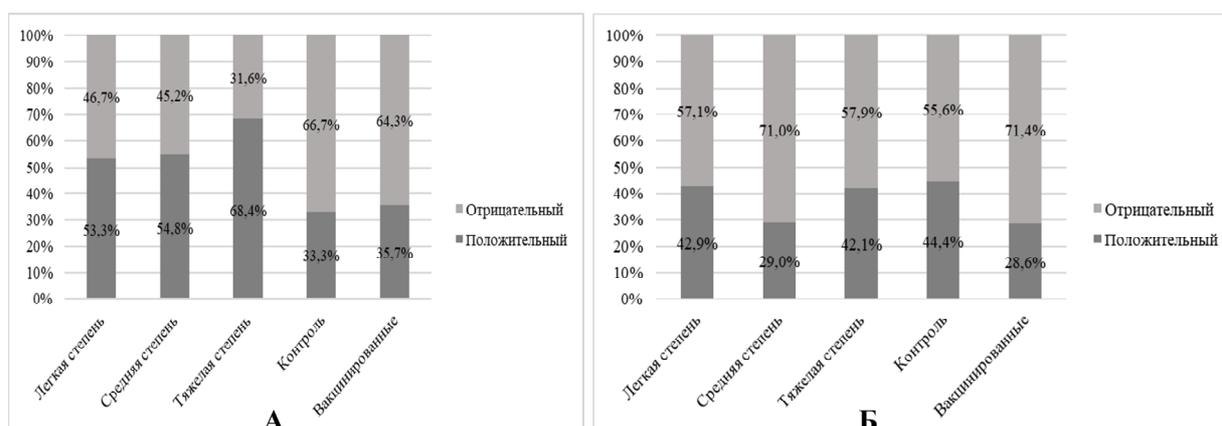


Рисунок 3. – Динамика выявления антител к М-белку вируса SARS-CoV-2 у пациентов через 3 (А) и 6 (Б) месяцев после перенесенной коронавирусной инфекции

Заключение. В результате проведенных исследований, установлено, что у лиц, перенёвших коронавирусную инфекцию, выработка антител к различным структурным вирусным антигенам (S-, N-, М-белкам) происходит с разной эффективностью и положительно коррелирует с тяжестью заболевания. Изучение динамики сохранения антител к разнообразным антигенам в группах, показало, что на протяжении 6 месяцев происходит незначительное снижение количества пациентов, серопозитивных к S-белку, в отличие от положительного статуса к N- и М-белкам. Так же необходимо отметить, что в контрольной группе отмечены респонденты, серопозитивные в отношении всех трех белков. Этот факт может свидетельствовать о том, что данные респонденты перенесли коронавирусную инфекцию в бессимптомной форме, либо со стертыми симптомами инфекции SARS-CoV-2.

Исходя из вышесказанного можно сделать вывод о том, что из трёх изученных антигенов наиболее длительно (по крайней мере через 6 месяцев после перенесённой инфекции) персистируют антитела к S- белку вируса SARS-CoV-2.

Літэратура

1. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention / M.Z. Tay [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2020. – Vol. 20. – P. 363-374.
2. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 / Q. Long [et al.] // *Nat. Med.* – 2020. – Vol. 26. – P. 845-848.
3. COVID-19: Immunology and treatment options / S. Felsenstein [et al.] // *Clin. Immunol.* – 2020. – Vol. 215. – P. 108448.
4. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV 2 / W. Liu [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2020. – Vol. 58, No. 6. – e00461-20.
5. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses / S. Su [et al.] // *Trends Microbiol.* – 2016. – Vol. 24. – P. 490-502.
6. Chen, Y. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis / Y. Chen, Q. Liu, D. Guo // *J. Med. Virol.* – 2020. – Vol. 92. – P. 418-423.
7. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / C. Huang [et al.] // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395. – P. 497-506.
8. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study / F. Zhou [et al.] // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395. – P. 1054-1062.
9. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19 / H. Ma [et al.] // *Cell. Mol. Immunol.* – 2020. – Vol. 17, No. 7. – P. 773-775.

CHARACTERISTIC OF IMMUNE RESPONSE TO SARS-COV-2 ANTIGEN SPECTRUM IN DYNAMICS

¹Rusina V.V., ²Bobrukevich D.V., ²Antonevich N.G., ²Goncharov A.E.,
¹Fomina E.G., ¹Vladyko A.S., ¹Koltunova Yu. B.

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

²*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

The presence of antibodies to the spectrum of antigens (S-, N-, M-proteins) of the SARS-CoV-2 virus in the sera of patients undergoing COVID-19 in varying degrees of severity was investigated. It has been shown that the production of antibodies to various viral antigens occurs with different efficiency and positively correlates with the severity of the disease. There were no respondents in any of the groups studied; they were seropositive for the N-protein and negative for the S-protein. Of the three studied antigens, antibodies to the S-protein of the SARS-CoV-2 virus persist for the longest time (at least 6 months after the infection). It should be noted that in the control group (the respondents had a negative PCR test and seronegative status for antibodies to SARS-CoV-2 at the start of the study), patients were determined who were seropositive for all three proteins after 3 and 6 months of observation. This fact may indicate that these respondents suffered from COVID-19 in asymptomatic form, or with erased symptoms.

Keywords: SARS-CoV-2, structural proteins, immune response, lea-test.

Поступила 25.11.2021

ОДНОВРЕМЕННОЕ ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СУБКУЛЬТУР МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ И ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ (СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ) КЛЕТОК ЛИМБА РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА

¹Шумский В.А., ²Квачева З.Б., ²Бутенко А.В., ¹Асташонок А.Н.,
²Василевич И.Б., ³Марченко Л.Н.

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

²Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

³Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Из аутопсийного фрагмента лимба роговицы человека получили моно-слойные культуры эпителиальных и мезенхимальных (стволовых и прогениторных) клеток (ЭСПК и МСПК) и поддерживали в течение 7 пассажей. Определение фенотипического состава культур и степени дифференцировки клеток осуществлялось путем выявления маркеров, характерных для ЭСПК и МСПК, с применением цитофлуориметрии, флуоресцентной и атомно-силовой микроскопии. Показано, что скомпонованные ростовые среды на основе DMEM/F12 позволяют получить культуры с преимущественным содержанием клеток как первого, так и второго типа. Полученные сведения важны для контроля состава и качества культур при изготовлении биомедицинских клеточных продуктов.

Ключевые слова: культура стволовых и прогениторных клеток лимба роговицы, фенотип, пролиферативная активность, идентификация.

Введение. Культуры эпителиальных и мезенхимальных стволовых и прогениторных клеток (ЭСПК и МСПК) в настоящее время используются для создания биомедицинских клеточных продуктов (БМКП). Трансплантация стволовых клеток лимба роговицы показала себя как наиболее перспективный метод репарации роговицы, позволяющий восстановить функции глаза [1]. Однако, для создания БМКП на основе ЭСПК и МСПК лимба необходимо исследование и контроль стабильности свойств культивируемых клеток. Охарактеризованные культуры стволовых и прогениторных клеток лимба роговицы перспективны для изготовления БМКП на их основе.

Цель исследования: получение культур эпителиальных и мезенхимальных стволовых и прогениторных клеток лимба роговицы человека со стабильными свойствами и выявление их основных идентификационных маркеров.

Материалы и методы исследования. В качестве источника клеток использовали аутопсийный фрагмент ткани лимба роговицы (~15 мм²) человека. Для приготовления первичных монослойных культур эпителиальных и мезенхимальных стволовых клеток лимба использовали метод эксплантов [2] в нашей модификации. Образец ткани промывали в физиологическом растворе с антибиотиками, разрезали на фрагменты (экспланты), которые помещали на дно пластиковых чашек Петри диаметром 2,5 см. Для избирательной миграции ЭСПК из эксплантов и дальнейшего их культивирования добавляли ростовую среду следующего состава (среда № 1): питательная среда DMEM/F12 (Life Technologies, США) с добавками: 5% эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС, Nu-Clone, США), инсулин-трансферрин-селенит (ITS, Sigma-Aldrich, США), антибиотики (пенициллин – 100 мкг/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл, амфотерицин В – 10 мкг/мл), эпидермальный фактор роста (ЭФР) (Stem Cell Technology, США) в концентрации

5 нг/мл. Для миграции из эксплантов МСПК и их дальнейшего культивирования применяли ростовую среду следующего состава (среда № 2): питательная среда DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС, антибиотиков.

После формирования монослоя клеток осуществляли их пересев с использованием 0,25% раствора трипсина в течение 5-7 пассажей. Посевная доза для ЭСПК составляла 5 тыс/см², а для МСПК – 10 тыс/см². Культивирование клеток производили в СО₂-инкубаторе при температуре 37°С и 5% СО₂. При пересеве культур клеток контролировали отсутствие морфологических изменений культуры (цитодеструкции), свидетельствующих о ее контаминации.

Жизнеспособность клеток определяли окрашиванием клеточной суспензии трипановым синим с последующим подсчетом доли живых (неокрашенных) клеток. Индекс пролиферации клеток при культивировании в пассажах выражали как отношение количества выросших клеток к посеянным.

Для изучения морфологии клеток *in situ* использовали фазово-контрастную микроскопию (Motic AE2000, Китай), и светооптический анализ (Nikon Eclipse E100, Япония) препаратов клеток, окрашенных по Романовскому-Гимзе, с последующей компьютерной обработкой полученных изображений.

Иммунофенотип МСПК лимба определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием меченых антител к поверхностным маркерам: CD105, CD73, CD44, CD34, CD90, CD45, в разведении согласно инструкции фирмы-производителя (Thermo Fisher Scientific, RD Systems). Аналитическую цитометрию проводили на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (Becton Dickinson, США), используя программу DIVA-6,0 (Becton Dickinson, США). Популяции клеток оценивали после выделения логического «гейта» в Dot/Plot по их линейному (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию. В качестве отрицательного контроля использовали клетки без добавления антител.

Анализ иммунофенотипов как ЭСПК, так и МСПК лимба проводили также прямым методом флуоресцирующих антител с использованием флуоресцентного микроскопа Olympus IX71 (Япония) и программного обеспечения Cell F (Olympus, Япония). Для этого клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали в охлажденном 96° спирте, после чего наносили антитела, меченные флуорохромами (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647 и FITC), к следующим белкам: цитокератин-19 (K19), нестин, виментин, фибронектин, р63. Микроскопию производили с использованием куба для флуоресценции в зеленой области с параметрами возбуждения флуоресценции 420-495 нм, регистрации флуоресценции 505-560 нм; куба для флуоресценции в красной области с параметрами возбуждения флуоресценции 520-580 нм, регистрации 620-720 нм. Флуоресценцию регистрировали цифровой камерой DP72.

Анализ рельефа поверхности клеток проводили по критерию оценки средней шероховатости (R_a) наружной цитоплазматической мембраны клетки с использованием атомно-силового микроскопа (Nanoscope III MultiMode, (Bruker, США), оборудованного J-сканером. Для этого клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали в охлажденном 96° спирте. В работе использовали контактные кантилеверы CSC38/AIBS (константа жесткости – 0,03-0,09 Н/м, резонансная частота – 6-32 кГц). Обработку полученных топографических микроизображений и их анализ проводили с использованием программного обеспечения Gwyddion 2.53.

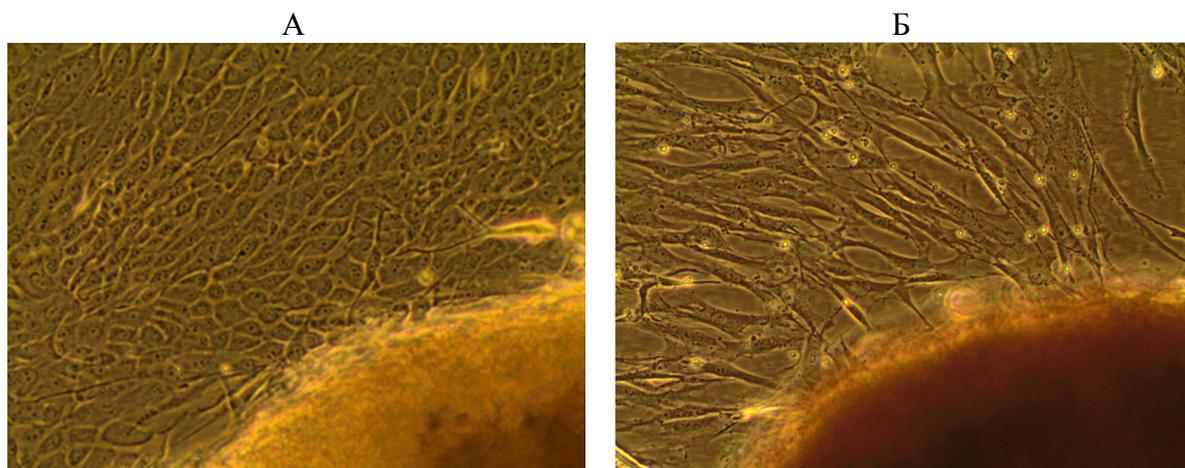
Статистический анализ полученных данных производили при помощи программного обеспечения Microsoft Excel 2010. Полученные результаты выражали в виде средних значений и ошибок среднего.

Результаты исследования и обсуждение.

Характеристика первичных культур. Для одновременного избирательного получения двух видов первичных монослойных культур ЭСПК и МСПК из одного фрагмента

ткани лимба был использован эксплантный метод для получения ЭСПК [3] в нашей модификации. Преимущество данного метода заключалось в том, что он обеспечивал сохранность основного пула клеток на фоне увеличения скорости формирования монослоя. Образец ткани лимба разделяли на фрагменты (экспланты), помещали их в отдельные флаконы, в которые добавляли две различные по составу ростовые среды. Для культивирования ЭСПК использовали ростовую среду № 1, содержащую добавки, рекомендуемые для избирательного роста эпителиальных клеток [3]. Среда № 2 – одна из рекомендованных сред для культивирования МСПК [4].

Миграция клеток из эксплантов начиналась на 5-7 день. В дальнейшем клетки образовывали очаги (колонии) и формировали монослой через 14-20 дней. Морфология клеток в колониях отличалась в зависимости от состава ростовой среды, в которой производилось культивирование. Клетки, культивируемые в среде № 1, имели преимущественно кубовидную полигональную форму с короткими отростками, небольшим ядром (рисунок 1, А). В то же время клетки, культивируемые в среде № 2, имели удлиненную веретеновидную форму с двумя длинными ветвящимися отростками (рисунок 1, Б).

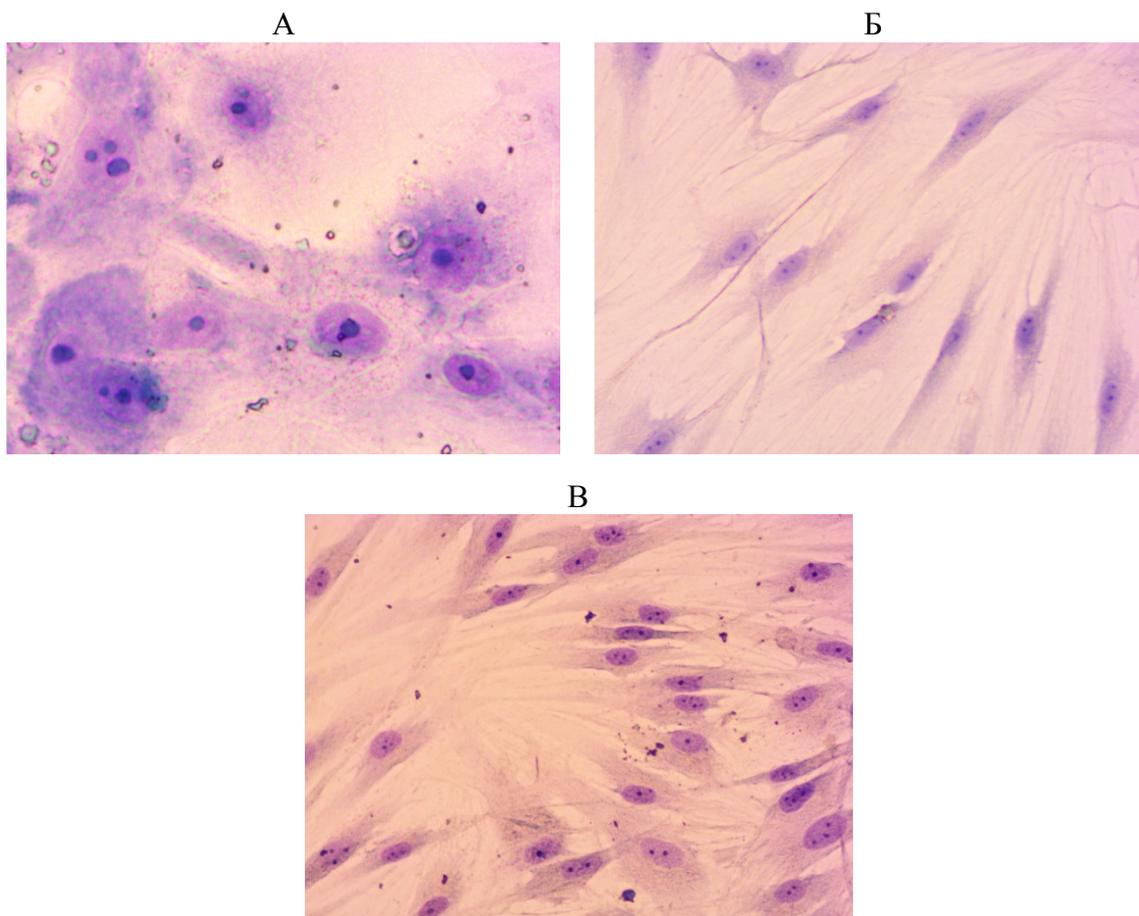


А – эпителиоидные клетки, среда № 1; Б – фибробластоподобные клетки, среда № 2.
Фазово-контрастная микроскопия. Ув. x100

Рисунок 1. – Морфология клеток в первичных монослойных культурах, выращиваемых на разных питательных средах

Для изучения возможности наращивания биомассы эпителиальных и мезенхимальных клеток (стволовых и прогениторных) в субпассажах и сохранения ими первоначального морфо- и фенотипического состава, осуществляли пересев культур в другие флаконы.

Характеристика культур ЭСПК в пассажах. Формирование монослоя происходило в течение 5 дней, индекс пролиферации в среднем составлял $3,4 \pm 0,3$, жизнеспособность клеток – $96 \pm 2\%$. Популяция ЭСПК лимба при субпассировании в течение 2-3 пассажей была представлена несколькими морфотипами: преимущественно крупными клетками кубовидной (полигональной) формы, клетками такой же формы, но меньших размеров и округлыми клетками без отростков. Кроме эпителиоподобных клеток, в культуре ЭСПК выявлялось до $13 \pm 3\%$ удлиненных фибробластоподобных клеток с отростками, которые были идентифицированы как мезенхимальные клетки лимба роговицы (рисунок 2). На стадии логарифмического роста культуры наблюдалось большое количество симметрично делящихся клеток (прогениторы), однако были обнаружены и клетки, проходящие асимметричное деление (стволовые).



А – 1-й пассаж, ув. x400; Б – 5-й пассаж, ув. x200; В – 7-й пассаж, ув. x200.
Световая микроскопия, окраска по Романовскому-Гимзе

Рисунок 2. – Морфология культуры ЭСПК в пассажах

Начиная с 2-3 пассажей при субпассировании наблюдалось увеличение доли мезенхимальных клеток.

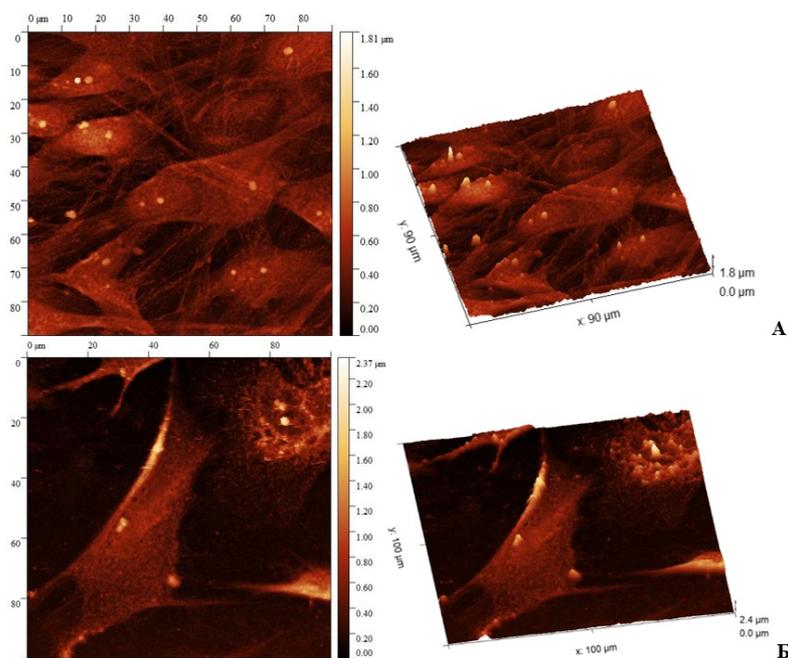
При изучении принадлежности клеток к эпителиальному или мезенхимальному фенотипу было установлено следующее: на первых двух пассажах они преимущественно экспрессировали белок промежуточных филаментов эпителиальных клеток цитokerатин 19 (K19) ($77\pm 8\%$), а также небольшое количество клеток (3-5%) экспрессировали белки стволовых клеток (нестин и транскрипционный ядерный фактор p63). Обнаруживались также МСПК (10-13%), экспрессирующие белки виментин и фибронектин, содержание которых увеличивалось в субпассажах (3-7 пассаж) и составляло $85\pm 6\%$ к седьмому пассажу. Тем не менее, на поздних пассажах сохранялся эпителиальный морфотип клеток ($12\pm 4\%$). Представляло интерес провести сравнительный анализ поверхности эпителиальных клеток из 3, 5 и 7 пассажей культур ЭСПК, используя среднюю шероховатость их мембраны в качестве критерия для исследования степени их дифференцировки.

Результаты исследования показали наличие в препаратах эпителиальных клеток с разной степенью шероховатости (рисунок 3). Клетки с шероховатостью 35 ± 10 нм отнесли к клеткам «со сглаженной поверхностью», в то время как клетки с шероховатостью 75 ± 15 нм отнесли к клеткам «с шероховатой поверхностью».

Как клетки со сглаженной, так и клетки с шероховатой поверхностями встречались в культурах на протяжении всего культивирования в пассажах.

На ранних пассажах доля более сглаженных эпителиальных клеток составляла порядка $70\pm 6\%$ от всех эпителиальных клеток. К 7 пассажию помимо общего уменьшения

числа эпителиальных клеток, доля сглаженных из них снизилась до $25\pm 4\%$. На основании данных других авторов [5] о том, что признак степени шероховатости клеток может свидетельствовать об уровне их дифференцировки можем предположить, что обнаруженные нами эпителиальные клетки с высокой степенью шероховатости можно отнести к более дифференцированным.



А – клетки со сглаженной поверхностью; размер скана – 90:90 мкм;
 Б – клетка с шероховатой поверхностью; размер скана – 100:100 мкм

Рисунок 3. – АСМ микрофотографии эпителиальных клеток 5-го пассажа с разной степенью шероховатости

Характеристика культур МСПК в пассажах. Формирование монослоя клеток происходило в течение 5 дней. Индекс пролиферации в среднем равнялся $2,7\pm 0,2$. Жизнеспособность клеток на протяжении культивирования в субпассажах оставалась на уровне $97\pm 2\%$. При культивировании МСПК в течение 1-7 пассажей культура была представлена преимущественно морфологически однородной популяцией клеток, а именно доминировали клетки вытянутой биполярной формы $87\pm 6\%$. Их принадлежность к мезенхимальному фенотипу была подтверждена наличием поверхностных маркеров, процентное содержание которых было следующее: CD90 – 98,3%, CD44 – 100%, CD105 – 88,5% и CD29 – 99,9%, и незначительным содержанием маркеров гемопоэтических стволовых клеток (CD34 – 0,2%, CD45 – 0,1%). Исследовали культивированные клетки на экспрессию виментина, нестина и фибронектина. До $79\pm 6\%$ клеток экспрессировали виментин, $46\pm 4\%$ – нестин, $77\pm 5\%$ – фибронектин на протяжении 1-7 пассажей. Кроме того, в культурах МСПК на ранних пассажах отмечали небольшие группы кубовидных клеток, относящихся к ЭСПК. Доля таких клеток составляла $13\pm 2\%$. Процентное содержание клеток кубовидной формы уменьшалось к 5-7 пассажу и составляло $4\pm 1\%$. Была выявлена экспрессия данными клетками белков K19 и p63, что подтверждает сохранение и поддержание в культуре МСПК небольшого пула эпителиальных клеток при субпассировании.

Заключение. Разработана технология получения культур разных типов клеток (ЭСПК и МСПК) методом эксплантов с подбором ростовых сред для их избирательного роста.

На протяжении культивирования в субпассажах не было выявлено морфологических признаков контаминации культур МСПК и ЭСПК микроорганизмами.

Культура ЭСПК на ранних пассажах представлена морфологически гетерогенной популяцией клеток. Большинство клеток имело кубовидную форму разных размеров и фенотипически соответствовало ЭСПК. Кроме того, содержался небольшой процент фибробластоподобных клеток, принадлежащих к мезенхимальному фенотипу. При дальнейшем культивировании происходила эпителиально-мезенхимальная трансформация клеток. На поздних пассажах доля ЭСПК в культуре снижалась до $12\pm 4\%$. В процессе пассирования культур ЭСПК происходило повышение степени дифференцировки эпителиальных клеток. При культивировании ЭСПК лимба роговицы в течение 7 пассажей стабильность их морфо- и фенотипа была отмечена только на первых двух пассажах.

Культура МСПК на ранних пассажах представляла собой морфологически однородную популяцию клеток. Доминировали клетки вытянутой биполярной формы ($87\pm 6\%$), принадлежавшие к мезенхимальному фенотипу. Кроме того, в популяции клеток содержится небольшой процент ЭСПК (от $13\pm 2\%$ на ранних пассажах до $4\pm 1\%$ на более поздних пассажах), что свидетельствовало об относительной стабильности мезенхимального фенотипа в культуре МСПК в субпассажах.

Полученные сведения важны для контроля состава и качества культур при изготовлении биомедицинских клеточных продуктов.

Литература

1. Ljubimov, A.V. Progress in corneal wound healing / A.V. Ljubimov, M. Saghizadeh // *Progr. Retinal Eye Res.* – 2015. – Vol. 49. – P. 17-45.
2. A simple and efficient method for cultivation of limbal explant stem cells with clinically safe potential / G.C. Dereli [et al.] // *Cytotherapy.* – 2019. – Vol. 21. – P. 83-95.
3. Сравнительный анализ методов получения культур стволовых клеток эпителия роговицы человека и создание биосовместимого композита со стволовыми клетками / З.Б. Квачева [и др.] // *Гены & Клетки.* – 2019. – Т. 14, № 4. – С. 29-34.
4. The effect of culture media on large-scale expansion and characteristic of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells / J. Czaplá [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1-11.
5. Atomic force microscopy analysis of progenitor corneal epithelial cells fractionated by a rapid centrifugation isolation technique / W. Zhang [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8, No. 3. – P. 1-7.

SIMULTANEOUS PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF SUBCULTURES OF MESENCHYMAL AND EPITHELIAL (STEM AND PROGENITOR) CELLS OF HUMAN CORNEA LIMBUS

¹Shumskiy V.A., ²Kvacheva Z.B., ²Butenko A.V., ¹Astashonok A.N.,
²Vasilevich I.B., ³Marchenko L.N.

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

²*Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

³*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

Monolayer cultures of epithelial and mesenchymal (stem and progenitor) cells (ESPCs and MSPCs) were obtained from an autopsy fragment of the human corneal limbus and maintained for 7 passages. Determination of the phenotypic composition of cultures and the degree of cell differentiation was done by identifying markers characteristic of ESPCs and MSPCs using cytofluorimetry, fluorescence and atomic force microscopy (AFM). It has been shown that the composed growth media based on DMEM/F12 made it possible to obtain cultures with a predominant content of cells of both the first and second types. The information obtained is important for controlling the composition and quality of cultures during the manufacture of biomedical cell products.

Keywords: cell culture, stem and progenitor cells, corneal limbus, phenotype, proliferative activity, identification.

Поступила 27.10.2021

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Тезисы республиканской научно-практической конференции с международным участием «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии», 12 ноября 2021 г. (в режиме онлайн)

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ СРЕДИ ИЗОЛЯТОВ САЛЬМОНЕЛЛ ОТ ПАЦИЕНТОВ И ИЗ ОБРАЗЦОВ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Бакаева Т.Н., Титов Л.П.

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

Введение. Сальмонеллы – одни из наиболее распространенных возбудителей острых кишечных инфекций. Частота сальмонеллезной инфекции в Республике Беларусь в последние годы возрастает. *Salmonella enterica* несут разнообразный набор генов вирулентности, кодирующих белки, участвующие в процессах адгезии, инвазии, внутриклеточного выживания и репликации. Эти гены расположены на различных элементах генома, включая хромосому, плазмиды, интегрированную ДНК бактериофага, острова патогенности сальмонелл (SPI) и острова генома сальмонелл (SGI) [1]. Некоторые из этих элементов являются консервативными для всех видов, такие как SPI-1 (кодирующие факторы, важные для клеточной адгезии) и SPI-2 (кодирующие факторы, необходимые для внутриклеточного выживания и репликации); в то время как другие элементы являются сероварспецифичными [2].

В последние годы анализ присутствия генов вирулентности и их участия в механизмах патогенности используется в качестве инструмента для характеристики изолятов сальмонелл, что дополняет информацию и знания о циркулирующих штаммах сальмонелл и позволяет типировать их не только по антигенным свойствам, но и по патогенному потенциалу. Кроме того, вирулентность бактерий ассоциируется не только с наличием генов вирулентности, но также и с их устойчивостью к противомикробным средствам [3].

Цель исследования – определить частоту носительства генов вирулентности у изолятов сальмонелл, выделенных в 2020-2021 гг. от пациентов и из продуктов питания в Республике Беларусь.

Материал и методы исследования. В исследование были включены 130 изолятов сальмонелл, в том числе 30 (23%) *Salmonella typhimurium*, 92 (71%) *Salmonella enteritidis* и 8 (6,0%) других видов (*Salmonella brandenburg* – 2, *Salmonella chester* – 2, *Salmonella panama* – 2, *Salmonella gallinarium* – 1, *Salmonella newport* – 1), предоставленные микробиологическими лабораториями областных ЦГЭиОЗ Республики Беларусь. Было изучено наличие генов вирулентности *avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *sopB*, *spi4D*, *spiC*, расположенных на островах патогенности сальмонелл SPI 1-5, энтеротоксина *sth*, а также генов *refA*, *spvC*, *spvA*, расположенных на плазмиде вирулентности. Методом ПЦР в режиме реального времени осуществляли детекцию генов *spvC*, *spi4D*, *mgtC*, *ssaQ*. Для выявления *sopB*, *spiC*, *refA*, *sth*, *avrA*, *spvA* использовали метод ПЦР с электрофоретической детекцией.

Результаты исследования и обсуждение. Результаты определения генов вирулентности представлены в таблице. Все исследуемые изоляты сальмонелл были положительными на наличие хромосомно-кодируемых вирулентных генов *spi4D*, *mgtC*, *ssaQ*. Подавляющее большинство изолятов несут гены *sopB* (97%), *avrA* (98%), *spiC* (99%), *sth* (98%). Ген *spvC* присутствовал в 83% изолятов. Продукт этого гена способен подавлять активацию макрофагов и инициировать их апоптоз. Анализ наличия гена *spvA* в нашем исследовании показал, что он присутствовал у 84% изолятов, причем все изоляты, имеющие резистентность к 3 и более классам антибиотиков являлись носителями гена *spvA*. Ген *refA* кодирует белок фимбрий и является важным фактором прикрепления сальмонелл к эпителиальным клеткам. Результаты исследований показали наличие гена *refA* у 81% изолятов.

Нами также проанализирована возможная ассоциация присутствия генов вирулентности с устойчивостью к антибактериальным препаратам у изолятов с МЛУ. В нашем исследовании 11 изолятов, что составило 37% среди изолятов с МЛУ, являлись носителями гена *refA*. Ген *spvC* не определялся у 3 (10%) изолятов с МЛУ, напротив, *spvA* присутствовал у всех изолятов.

Таблица. – Частота встречаемости анализируемых генов вирулентности у исследуемых изолятов сальмонелл

Изоляты	<i>spvC</i>	<i>spvA</i>	<i>avrA</i>	<i>ssaQ</i>	<i>mgtC</i>	<i>Spi4D</i>	<i>spiC</i>	<i>sopB</i>	<i>stn</i>	<i>pefA</i>
<i>S. enteritidis</i>	82	82	91	92	92	92	91	90	91	77
<i>S. typhimurium</i>	24	25	30	30	30	30	30	29	30	23
<i>S. goma</i>	-	-	1	1	1	1	1	1	1	-
<i>S. panama</i>	-	-	1	1	1	1	1	1	1	-
<i>S. gallinarium</i>	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>S. newport</i>	1	-	-	1	1	1	1	1	-	1
<i>S. brandenburg</i>	-	1	1	2	2	2	2	1	1	1
<i>S. chester</i>	-	1	2	2	2	2	2	2	2	2
Всего n/%	109/ 83	110/ 84	127/ 98	130/ 100	130/ 100	130/ 100	129/ 99	126/ 97	127/ 98	105/ 81

Заключение. Большинство исследованных изолятов *S. enterica* несут гены островов патогенности сальмонелл SPI 1-5. Гены, расположенные в фимбриальном кластере и плазмиде вирулентности, показали изменчивость. Носительство гена *spvA* у изолятов с МЛУ указывает на связь этого гена и устойчивости к антибактериальным препаратам.

Ключевые слова: гены вирулентности, сальмонелла, устойчивость к антибактериальным препаратам.

Выражаем благодарность за предоставление изолятов сальмонелл для проведения молекулярно-генетических исследований сотрудникам микробиологических лабораторий областных ЦГЭиОЗ Республики Беларусь.

Литература

1. World Health Organization. *Salmonella* (Non-typhoidal) 2018 [Electronic resource]. – Mode of access: [https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). – Date of access: 12.04.2019.
2. Ferrari, R.G. Phenotypic and genotypic eligible methods for *Salmonella typhimurium* source tracking / R.G. Ferrari, P.H.N. Panzenhagen, C.A. ConteJunior // Front. Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – P. 2587.

3. Antimicrobial resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from animals, retail meats, and humans in the United States and Canada / L.M. Glenn [et al.] // Microbial Drug Resistance. – 2013. – Vol. 19. – P. 175-184.

FREQUENCY OF VIRULENCE GENES DETECTION IN *SALMONELLA* ISOLATED FROM PATIENTS AND FOOD SAMPLES

Bakaeva T.N., Titov L.P.

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

The analysis of virulence genes presence in salmonella isolates was carried out. The acquisition of antibiotic resistance along with the presence of certain virulence genes enhances the salmonella pathogenic potential. Studies of the possible association of multidrug resistance and the presence of virulence genes are useful for assessing the risk and improving the salmonellosis control.

Keywords: virulence genes, salmonella, resistance to antibacterial drugs.

Поступили 28.10.2021

СКРИНИНГ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В NS5A УЧАСТКЕ ГЕНОМА ВИРУСА ГЕПАТИТА С 3А И 1В ПОДГЕНОТИПОВ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Гасич Е.Л., Кабанькова А.Н.

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

Введение. Вирусный гепатит С (ВГС) представляет собой серьезную проблему для общественного здравоохранения во всем мире. Медико-социальная значимость возбудителя определяется различными факторами, такими как пути передачи, клинические формы проявления, высокая частота хронизации процесса и высокий риск формирования цирроза печени и развития гепатоцеллюлярной карциномы [1]. Ввиду того, что в 2016 г. Всемирная ассамблея здравоохранения одобрила стратегию по элиминации вирусного гепатита С, Министерством здравоохранения Республики Беларусь принято решение о проведении контролируемого лечения пациентов с использованием лекарственных средств прямого противовирусного действия (ЛСППД). В связи с этим возникла острая необходимость проведения скрининга мутаций лекарственной устойчивости к ЛСППД, который играет ключевую роль в подборе индивидуальной схемы лечения и повышении вероятности полной элиминации вируса у ВГС-инфицированных пациентов.

В мировой практике используются лекарственные средства (ЛС), ингибирующие протеазу NS3A, белок системы репликации NS5A и полимеразу NS5B. Несмотря на высокую эффективность ЛС в популяции вируса возникают устойчивые варианты, которые способны реплицироваться в условиях действия ингибиторов. Это связано с высокой скоростью репликации вируса и отсутствием корректирующей активности у NS5B-полимеразы ВГС, приводящих к появлению мутаций. Белок NS5A отвечает за формирование репликативного комплекса ВГС. Ингибиторы белка NS5A блокируют процесс репликации вирусного генома, тем самым препятствуют увеличению числа копий вирусных частиц в гепатоцитах [2]. Снижение чувствительности к данной группе ЛС может наблюдаться как у пациентов с опытом лечения, так и наивных. Наличие мутаций у пациентов, не принимающих ЛС, определяет важность проведения скрининга перед подбором схемы лечения.

Цель исследования: определить спектр и распространенность мутаций устойчивости ВГС к ингибиторам белка NS5A у пациентов, инфицированных ВГС *1b* и *3a* субтипами ВГС, с опытом и без опыта лечения.

Материалы и методы исследования. Исследование включало 104 образца плазмы крови пациентов, инфицированных ВГС *1b* ($n=34$, $32,69\pm 4,6\%$) и *3a* ($n=70$, $67,31\pm 4,6\%$) субтипов, собранных за период 2020-2021 гг. Участок NS5A генома ВГС амплифицировали методом «гнездовой» in house ПЦР. Секвенирование амплифицированных фрагментов осуществляли на автоматическом генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Биоинформационный анализ последовательностей ДНК проводили с помощью программ «SeqScape®Software v.3.0», «BioEdit v.7.2.5», «SeqA6», Clustal W. Мутации устойчивости анализировали с помощью on line сервера <https://hcv.geno2pheno.org/>.

Результаты исследования и обсуждение. Анализ половозрастной структуры исследуемой выборки пациентов показал, что 23 пробы были получены от лиц женского пола ($22,12\pm 4,1\%$), 81 пробы – от лиц мужского пола ($22,12\pm 4,1\%$), а средний возраст пациентов составил $44,09\pm 9,16$. Наибольшее количество образцов было получено от пациентов, проживающих на территории г. Минска и Минской области ($n=66$, $63,46\pm 4,7\%$).

Распределение по другим областям имеет следующий вид: из Гомельской области поступил 21 образец (20,19±3,9%), из Могилевской – 6 (5,77±2,3%), из Витебской – 5 (4,81±2,1%), из Брестской и Гродненской – по 2 образца (1,92±1,3%), а также 2 образца поступило от пациентов, прибывших из Украины и проживающих на территории Республики Беларусь (1,92±1,3%).

Среди 70 пациентов, инфицированных ВГС 3a субтипа, было 63 с опытом лечения (90,00±3,6%) и 7 без (10,00±3,6%). Только у одного пациента, не проходившего курс терапии, отметили наличие аминокислотной замены Q30K+E62T, снижающей чувствительность ко всем ЛС данной группы. У пациентов с опытом лечения клинически значимые аминокислотные замены в участке NS5A генома ВГС были определены у 35 пациентов из 63 обследованных, что составило 55,56±6,3%. При этом встречались как одиночные замены, так и мультирезистентные варианты вируса. Наиболее часто встречаемую замену – замену в аминокислотной позиции 93 тирозина (Y) на гистидин (H), связывают с высоким уровнем устойчивости к даклтасвиру, эльбасвиру, ледипасвиру и велпатасвиру. Данная замена представлена двумя вариантами: одиночная Y93H замена у 26 пациентов (41,27±6,2%) и двойная Y93H+E/A62S/L/T/W также у 26 пациентов (41,27±6,2%). В единичных случаях встречались такие варианты, как A30K, Q30K, Q30T, A30K+A62L/T, Q30T+E62T, Q30K+E/A62V/S/T. Замена в позиции A/Q30K/T, обладающая высоким генетическим барьером, определяет устойчивость к таким лекарственным средствам, как даклтасвиру, ледипасвиру и эльбасвиру.

Выборка пациентов, инфицированных ВГС 1b субтипа, включала в себя 30 пациентов (88,24±5,5%), прошедших курс терапии, и 4 пациента до лечения (11,76±5,5%). После анализа образцов на наличие аминокислотных замен в белке NS5A у наивных пациентов замен, снижающих чувствительность к ингибиторам, обнаружено не было. Среди пациентов с опытом лечения в 24 (80,00±7,3%) случаях было отмечено наличие мутаций, снижающих чувствительность к ингибиторам белка системы репликации NS5A. Чаще всего встречалась двойная мутация L31M+Y93H, которая определяет устойчивость (от умеренной до высокой) ко всем ингибиторам данной группы, кроме пибрентасвира. Также в небольшом количестве встречались следующие замены: 30Q+L31M+Y93H (20,00±7,3%), L31M (16,67±7,3%), R30Q+L31M (13,33±6,2%), Y93H (6,67±4,6%), P58T+L31M+Y93H (3,33±3,3%), H58S+Y93H (3,33±3,3%), L31M+A92T+Y93H (3,33±3,3%). Появление варианта L31M при инфицировании пациента 1b субтипом ВГС обеспечивает вирусу низкую или умеренную устойчивость к даклтасвиру и ледипасвиру. Мутации Y93H и L31M являются основными, а все остальные, детектируемые совместно с ними – компенсаторные.

Заключение. Полученные результаты исследований свидетельствуют о высокой частоте встречаемости мутаций устойчивости к ЛСПИД особенно среди пациентов, находящихся на этапе лечения либо прошедших полный курс терапии. Так как для лечения пациентов чаще всего используют безинтерфероновую схему, необходим постоянный скрининг образцов для своевременного выявления мутаций и подбора эффективной схемы.

Ключевые слова: вирус гепатита С, мутации устойчивости, препараты прямого противовирусного действия.

Литература

1. Характеристика эпидемического процесса гепатита С на территории Республики Беларусь / В.С. Высоцкая [и др.] // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2020. – Т. 19, № 6. – С. 48-55.
2. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C / J.M. Pawlotsky [et al.] // J. Hepatol. – 2013. – Vol. 59, No. 11. – P. 375-382.

**SCREENING OF DRUG RESISTANCE MUTATIONS IN NS5A REGION
OF HEPATITIS C VIRUS OF 3A AND 1B SUBGENOTYPES
IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BELARUS**

Gasich E.L., Kabankova A.N.

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

Viral hepatitis C is a major public health problem worldwide. In recent years have been developed drugs that provide a direct antiviral action. In some cases, we can observe reduce of susceptibility to direct-acting antivirals (DAA) which caused by resistance associated substitutions. The results of the study indicate a high frequency of resistance mutations to DAA, especially among patients at the stage of treatment or undergoing a full course of therapy. Since an interferon-free regimen is most often used to treat patients, continuous screening is required for the timely use of mutations and the selection of an effective regimen.

Keywords: hepatitis C virus, resistance mutations, direct-acting antivirals.

Поступили 29.10.2022

ИНФЕКЦИОННЫЙ КОНТРОЛЬ В ЦЕНТРЕ ДЕТСКОЙ ОНКОЛОГИИ, ГЕМАТОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

Громыко И.Н., Кондаурова С.Л.

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

Введение. Согласно официальным данным в США один из 25 госпитализированных в стационар пациентов заражается по крайней мере одной инфекцией, связанной с оказанием медицинской помощи (ИСМП). ИСМП часто вызываются мультирезистентными штаммами микроорганизмов, в результате чего увеличиваются сроки пребывания пациентов в стационаре, затраты на антибактериальную терапию, использование дорогостоящих методик оказания медицинской помощи, что в конечном итоге приводит к значительным финансовым расходам. Проблема наличия антибиотикорезистентной микрофлоры в соматическом стационаре является актуальной для большинства организаций здравоохранения.

Цель – проанализировать эффективность проведенных отделением инфекционного контроля профилактических и противоэпидемических мероприятий с января 2016 г. по декабрь 2020 г.

Материалы и методы исследования. В исследовании использованы методы статистического анализа. Заболеваемость ИСМП оценивали по частоте впервые выявленного носительства госпитального штамма *Acinetobacter baumannii* (на 100 использованных больных); показателю количества впервые выявленных носителей (на 100 использованных больных) мультирезистентных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*; общей длительности носительства госпитального штамма *A. baumannii* (на 1000 койко-дней).

Результаты исследования. Частота впервые выявленного носительства госпитального штамма *A. baumannii* по стационару на 100 использованных больных достоверно снизилась (с 0,42 до 0,14 на 100 использованных больных по стационару в целом и с 5,04 до 3,0 по отделению реанимации, $p=0,0002$), что создает положительную тенденцию ограничения возможности пациентам-носителям являться источником инфекции для других лиц. Снизилась общая длительность носительства *A. baumannii* по отделению реанимации (с 319,6 дней до 137,6) и по стационару в целом (с 15,1 дня до 7,2 дня). Достигнута нулевая летальность от инфекций кровотока, вызванных *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* (в 2017 г. летальность доходила до 33,3%).

Заключение. Внедрение в практику системы инфекционного контроля в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии путем проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий отделением инфекционного контроля позволило достоверно снизить частоту носительства госпитального штамма *A. baumannii* по стационару; достоверно снизить число случаев инфекции кровотока. Достигнута нулевая летальность от инфекций кровотока; снизилась доля пациентов с инфекцией кровотока, нуждающихся в госпитализации в отделение реанимации; имеет место тенденция к снижению количества сепсисов.

Ключевые слова: инфекционный контроль, мультирезистентные штаммы.

INFECTIOUS CONTROL AT THE CENTER FOR PEDIATRIC ONCOLOGY, HEMATOLOGY AND IMMUNOLOGY

Hramyka I., Kandaurova S.

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Republic of Belarus

The problem of the presence of antibiotic resistant microflora in a somatic hospital is relevant for most healthcare organizations. The study goal was to analyze the effectiveness of preventive and anti-epidemic measures carried out by the the Infection Control Department from January 2016 to December 2020. Statistical analysis methods used in the study. The frequency of newly diagnosed carriage of the hospital strain *A. baumannii* in the hospital per 100 used patients significantly decreased (from 0.42 to 0.14 per 100 used patients in the hospital as a whole, and from 5.04 to 3.0 in the intensive care unit, $p=0,0002$). The total duration of *A. baumannii* carriage decreased in the intensive care unit (from 319.6 days to 137.6) and in the hospital as a whole (from 15.1 days to 7.2 days). Achieved zero mortality from bloodstream infections caused by *K. pneumoniae*, *E. faecium* (in 2017 the mortality rate reached 33.3%). The introduction into practice of the infection control system at the Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology through the implementation of preventive and antiepidemic measures by the Infection Control Department made it possible to reliably reduce the frequency of carriage of the hospital strain of *A. baumannii* in the hospital; number of cases of bloodstream infection. Achieved zero mortality from bloodstream infections, decreased the proportion of patients with bloodstream infections requiring hospitalization in the intensive care unit; there is a tendency to a decrease in the number of sepsis.

Keywords: infection control, multiresistant strains.

Поступили 15.10.2021

ВЫЯВЛЕНИЕ НЕИММУННОЙ ВОДЯНКИ ПЛОДА, ВЫЗВАННОЙ ПАРВОВИРУСОМ В19, В ПЕРИОД НИЗКОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

¹Ермолович М.А., ¹Самойлович Е.О., ²Белуга М.В.

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

²Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Республика Беларусь

Введение. Парвовирусная инфекция человека распространена во всех регионах мира и имеет циклическое течение с длительностью эпидемического цикла от 3 до 8 лет. Заболевание преимущественно встречается в детском возрасте, однако ранее проведенные исследования, в том числе и в Республике Беларусь, показали, что среди лиц 18 лет лишь половина имеет специфические антитела, свидетельствующие о предшествующем инфицировании парвовирусом В19. Наибольшая доля иммунных (80% и более) выявляется среди лиц старше 50 лет, что свидетельствует об активном вовлечении взрослых в эпидемический процесс и инфицировании значительной части населения в период основного детородного возраста. Парвовирусная инфекция человека характеризуется широким спектром клинических проявлений, но также может протекать в субклинической форме. Наиболее распространенной формой заболевания является инфекционная эритема, которая у взрослых нередко сопровождается артропатиями. При инфицировании женщины в период беременности возбудитель способен передаваться трансплацентарно и приводить к развитию неиммунной водянки плода, при этом известно, что вероятность поражения плода не зависит от наличия и выраженности клинических проявлений заболевания у женщины.

В Республике Беларусь диагностика парвовирусной инфекции у лиц с инфекционной эритемой проводится с 2005 г., что позволило установить ее эпидемиологические характеристики на территории страны. За период наблюдения было выявлено два эпидемических подъема заболеваемости, в 2006 г. и 2015-2016 гг. С 2012 г. верификация парвовирусной инфекции также проводится в случаях неиммунной водянки плода и включает лабораторное обследование как женщины, так и новорожденного или плода. В период 2012-2018 гг. лабораторно было подтверждено 12 случаев водянки плода парвовирусной этиологии: ежегодно, за исключением 2017 г., регистрировалось от 1 до 3 случаев.

Целью настоящего исследования являлась лабораторная верификация парвовирусной этиологии в случаях неиммунной водянки плода в 2019-2020 гг., и установление связи с периодом эпидемического цикла парвовирусной инфекции.

Материалы и методы исследования. Верификацию парвовирусной инфекции проводили на основании выявления специфических IgM антител или вирусной ДНК в сыворотке крови. IgM антитела к парвовирусу В19 выявляли с использованием коммерческих наборов для иммуноферментного анализа производства Euroimmun (Германия). Детекцию ДНК парвовируса В19 осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора реагентов производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Беларусь).

Результаты исследования и обсуждение. В 2019-2020 гг. с целью лабораторной верификации парвовирусной инфекции были исследованы биологические образцы от 11 случаев неиммунной водянки плода. В 7 случаях была обследована только женщина, в 4 – женщина и ребенок или плод.

Лабораторное подтверждение парвовирусной этиологии водянки плода было получено в 5 случаях, в том числе в 2 случаях в 2019 г. и 3 – в 2020 г. При обследовании женщин у 5 из них в сыворотке крови была выявлена ДНК парвовируса В19, что явилось основным критерием диагностики парвовирусной инфекции. В двух из этих случаев, когда кроме женщины был обследован и ребенок или плод, в его сыворотке крови также обнаружена вирусная ДНК, свидетельствующая о внутриутробном инфицировании. Специфические IgM антитела выявлены в сыворотке крови лишь у трех из пяти женщин и ни у одного из обследованных детей. Наличие IgM антител к парвовирусу В19 является диагностическим критерием при наиболее распространенной форме парвовирусной инфекции – инфекционной эритеме, однако у женщин с водянкой плода они во многих случаях не обнаруживаются, что обусловлено длительным периодом от инфицирования до проведения исследования. У новорожденных с внутриутробной парвовирусной инфекцией IgM к парвовирусу В19 практически не выявляются.

Как в 2019 г., так и в 2020 г. случаи парвовирусной водянки плода были выявлены в период с февраля по июль. В 2019 г. по одному случаю были выявлены в г. Минске и Витебской области, в 2020 г. – один случай выявлен в Гродненской области и два – в Могилевской. Все женщины с водянкой плода были в возрасте 29-32 лет, ни одна из них не имела эпизодов острой экзантемы в период беременности. У всех пяти женщин водянка плода была обнаружена в сроке гестации 19-22 недель, что согласуется с наибольшей подверженностью плода воздействию парвовируса В19 во втором триместре гестации.

В Республике Беларусь после эпидемического подъема заболеваемости парвовирусной инфекцией в 2015-2016 гг. (показатель заболеваемости 1,9 на 100 000 населения) произошло ее резкое снижение. В 2017 г. показатель заболеваемости составил 0,5 на 100 000 населения, и в 2019-2020 гг. она сохранялась на таком же уровне. Тем не менее, число выявленных случаев водянки плода, обусловленных парвовирусом В19, в период низкой заболеваемости не отличалось от их числа в период подъема заболеваемости. Поскольку подъемы заболеваемости преимущественно обусловлены распространением парвовируса В19 среди детей, можно предположить, что циркуляция возбудителя среди неиммунных взрослых происходила со сходной интенсивностью как в периоды эпидемического неблагополучия, так и благополучия. Вместе с тем, нельзя исключить улучшение качества выявления и вирусологического обследования пациентов с неиммунной водянкой плода в последние годы.

Для установления истинной распространённости водянки плода парвовирусной этиологии необходимо обеспечить постоянную надежную молекулярно-генетическую диагностику выявленных случаев во всех регионах страны.

Ключевые слова: парвовирусная инфекция, неиммунная водянка плода, диагностика.

DETECTION OF NON-IMMUNE HYDROPS FETALIS CAUSED BY PARVOVIRUS B19 DURING A TIME OF LOW INCIDENCE OF PARVOVIRUS INFECTION

¹Yermolovich M. A., ¹Samoilovich E. O.,² Beluga M.V.

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

²*Republican Research & Practical Center "Mother and Child", Minsk, Republic of Belarus*

In total 12 cases of hydrops fetalis caused by parvovirus B19 were detected during 2012-2018 in Belarus with 1 to 3 cases revealed annually. In epidemic cycle of B19 infection, 2015-2016 were characterized by an increase in the incidence with a subsequent decline in morbidity. The aim of this study was laboratory verification of parvovirus B19 etiology in non-immune hydrops fetalis in 2019-2020 and establishing connection with the epidemic cycle of infection. Two cases of hydrops fetalis caused by parvovirus B19 were confirmed in 2019 and 3 cases in 2020. For all cases conformation was based on detection virus DNA in blood serum of woman and child. The women with parvovirus B19 hydrops fetalis were 29-32 years old, none of them had acute exanthema during pregnancy. In all 5 cases hydrops fetal was detected at 19-22 weeks of gestation, which is consistent with the greatest fetal exposure to parvovirus B19 in the second trimester of gestation. No relationship has been established between the rise and decline in the incidence of parvovirus B19 infection and the incidence of hydrops fetalis caused by this pathogen.

Keywords: parvovirus infection, non-immune hydrops fetalis, diagnostics.

Поступили 02.12.2021

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ОСТРОГО СИАЛАДЕНИТА В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОГО ОХВАТА ВАКЦИНАЦИЕЙ ПРОТИВ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА

Ермолович М.А., Семейко Г.В., Михаленко А.О., Самойлович Е.О.

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

Введение. Наличие одностороннего или двустороннего воспаления околоушных слюнных желёз (или сиаладенита) является основным проявлением эпидемического паротита. Однако опухание желёз также могут обусловить и другие факторы, в том числе другие инфекционные агенты, медикаментозная и немедикаментозная аллергия, системные заболевания, поэтому для подтверждения диагноза необходимым является проведение специфического лабораторного обследования.

С целью серологического подтверждения диагноза эпидемического паротита проводится выявление специфических IgM антител, которое наиболее эффективно, если с момента появления симптомов прошло более трех дней. Использование методов молекулярной диагностики предоставляет возможность детекции возбудителей непосредственно при исследовании клинического материала. Выявление генетического материала вируса паротита может проводиться с первого дня появления симптомов, при этом считается, что у невакцинированных лиц вирус может быть изолирован вплоть до 11-14 дней после развития паротита, у вакцинированных лиц важно получить клинические образцы не позднее 1-3 дней после появления симптомов. Лучший результат выявления вируса паротита дает исследование содержимого околоушного протока, а также мазков со слизистой полости рта и носоглотки. Эти образцы также могут быть использованы с целью выявления других этиологических агентов сиаладенита.

Целью настоящего исследования являлось выявление генетического материала различных вирусных агентов в образцах носоглоточных мазков с целью этиологической расшифровки острого сиаладенита.

Материалы и методы исследования. Выделение нуклеиновой кислоты из носоглоточных мазков проводили методом сорбции на силикагелевой мембране с использованием набора АртРНК (АртБиоТех, Беларусь), согласно прилагаемой инструкции. Для выделения использовали 100 мкл образца с элюцией в 50 мкл буфера. Кратковременное хранение нуклеиновых кислот осуществляли при -20°C.

Серологическую верификацию диагноза эпидемического паротита проводили на основании выявления специфических сывороточных IgM антител методом ИФА с использованием коммерческих наборов (Вектор Бест, Россия). Выявление вируса паротита в биологических образцах проводили методом гнездовой ОТ-ПЦР согласно инструкции по применению от 02.06.2014 № 022-1213. Детекцию генетического материала Эпштейна-Барр, цитомегало-, парагриппа 1-4, рино-, бока-, метапневмо-, аденовирусов проводили методом ПЦР или ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов: ЭБАРПОЛ (Литех, Россия), «АмплиСенс CMV-FL» (АмплиСенс, Россия), ОРВИ-ген (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь). РНК энтеровирусов выявляли методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени согласно инструкции по применению от 23.04.2019 № 001-0419.

Результаты исследования. В период с октября 2019 г. по октябрь 2021 г. для лабораторной верификации эпидемического паротита поступили биологические образцы 92 пациентов, в том числе 92 сыворотки крови и 43 носоглоточных мазка. Ни у одного из пациентов специфические IgM антитела или РНК вируса паротита выявлены не были, на основании чего диагноз эпидемического паротита был исключен.

Все 43 образца носоглоточных мазков были исследованы на наличие РНК или ДНК других вирусов, возможных возбудителей сialаденита. Положительный результат, свидетельствующий о наличии генетического материала вирусов, был получен для 8 (18,6%) из 43 образцов. Среди положительных образцов РНК энтеровирусов была выявлена у 2 пациентов, ДНК вируса Эпштейна-Барр – у 3, ДНК цитомегаловируса – у 3. Генетический материал таких возбудителей как вирусы парагриппа 1-4, адено-, бока-, метапневмо-, респираторно-синцитиальный вирусы не были выявлены ни в одном случае. Поскольку в литературе есть лишь единичные указания о роли этих вирусов в этиологии сialаденита, нельзя исключить, что отрицательный результат в нашем исследовании был обусловлен ограниченным количеством проанализированных образцов. Рутинное тестирование образцов носоглоточных мазков от пациентов с исключенным диагнозом эпидемического паротита на наличие широкого спектра вирусных патогенов позволит получить более полное представление о роли вирусов в этиологии сialаденита.

Заключение. Проведенное исследование показывает, что в условиях резкого снижения циркуляции вирусов эпидемического паротита, достигнутого благодаря успешной вакцинопрофилактике, другие вирусные инфекции не играют существенной роли в возникновении случаев сialаденита, и являются редкой находкой при исследовании носоглоточных мазков пациентов. Вместе с тем, включение в исследование широкого спектра вирусных патогенов позволяет расшифровать до 20% случаев сialаденита неустановленной этиологии.

Ключевые слова: сialаденит, этиология, паротит, вакцинопрофилактика.

ETIOLOGY OF ACUTE SIALADENITIS IN POPULATION WITH HIGH MUMPS VACCINATION COVERAGE

Yermolovich M.A., Semeiko G.V., Samoilovich E.O., Mikhalenko A.O.

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

Unilateral or bilateral swelling of the salivary glands (or sialadenitis) is the main manifestation of mumps, but can be the result of other infectious and non-infectious causes. The aim of this study was to identify the genetic material of various viral agents in nasopharyngeal swabs with the aim of etiological interpretation of acute sialadenitis. Laboratory verification of mumps was based on detection of the specific IgM using commercial kits (Vector Best, Russia) or detection of mumps virus RNA in nasopharyngeal swabs using the nested RT-PCR according to the national manual (02.06.2014 No. 022-1213). Enteroviruses' RNA was detected by real-time RT-PCR in accordance with the national manual (23.04. 2019 No. 001-0419). Detection of other viruses was carried out by real time PCR or RT-PCR using commercial kits: EBARPOL (Litekh, Russia), CMV-FL (AmpliSens, Russia), ARVI-gene (Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Belarus). Between October 2019 – October 2021, biological samples of 92 patients, including 92 blood serum and 43 nasopharyngeal swabs, were received for laboratory verification of mumps. In all cases mumps was excluded. All 43 nasopharyngeal swabs were examined for the presence of RNA or DNA of other possible viral causative agents. A positive result was obtained in 8 (18.6%) samples: 2 for Enteroviruses, 3 for Epstein-Barr virus, 3 for Cytomegalovirus. Parainfluenza 1-4, adeno-, boka-, metapneumo-, respiratory-syncytial viruses were not detected. It cannot be ruled out that the negative result was due to the limited number of samples analyzed in our study. In conditions of a significant decrease the circulation of mumps viruses, achieved thanks to the successful vaccination, other viruses are a rare finding in the nasopharyngeal swabs of patients. At the same time, testing a wide range of viral pathogens allows to establish the cause in up to 20% of sialoadenitis of unknown etiology.

Keywords: sialadenitis, etiology, mumps, vaccination.

Поступили 19.11.2021

СПОСОБНОСТЬ СЫВОРОТОК КРОВИ ЛИЦ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В СРАВНЕНИИ С СЫВОРОТКАМИ ДОНОРОВ ПОДАВЛЯТЬ НАТИВНУЮ БИОПЛЕНКУ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Лептеева Т.Н., Сенькович С.А., Жолудева А.А., Зубарева И.В.

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

Введение. Вопреки тому, что современная медицина обладает огромным спектром методов диагностики, лечения и профилактики, в число которых входят новые антибактериальные и иммунологические препараты, на сегодняшний день не наблюдается тенденции к снижению количества гнойно-воспалительных заболеваний [1].

Отмечается увеличение числа случаев выделения высоко резистентных изолятов бактерий и их распространение в лечебных учреждениях, что заканчивается развитием у пациентов фатальных заболеваний [2]. Среди факторов, способствующих формированию антибактериальной устойчивости большое значение имеет способность ряда микроорганизмов к образованию биопленки [3]. Установлено, что с образованием биопленки протекает около 80% бактериальных инфекций у человека [4].

Для разработки новых методов терапии гнойно-воспалительных заболеваний необходимо иметь представление о механизмах воздействия системы иммунитета на биопленку.

Цель работы – оценить способность сывороток крови пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями разрушать нативную микробную биопленку *Staphylococcus aureus*.

Материалы и методы исследования. Для оценки способности сывороток крови пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями разрушать нативную микробную биопленку *S. aureus* использовали разработанный нами планшетный метод, основанный на изменении цвета биопленки. После инкубации в контрольные лунки планшета добавляли по 0,15 мл 0,05% раствора ТТХ (трифенилтетразолий хлорид), разведенного на бульоне Мюллера-Хинтона. Восстановление ТТХ происходит только в живых бактериях с активными метаболическими процессами, что приводит к изменению цвета биопленки, интенсивность которого обратно пропорциональна количеству активных живых бактерий.

Нами были исследованы 22 сыворотки крови лиц с гнойно-воспалительными процессами, находившимися на лечении в Витебской клинической больнице скорой медицинской помощи, 10 сывороток крови лиц с тяжелыми бактериальными пневмониями в сравнении с 16 сыворотками лиц без гнойно-воспалительных заболеваний. Пациенты с гнойно-воспалительными процессами были разделены на 2 группы: с хроническими гнойно-воспалительными процессами (трофические язвы нижних конечностей, хронический остеомиелит); лица с острыми гнойно-воспалительными процессами (флегмоны и абсцессы мягких тканей различной локализации).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакета прикладных программ «Statistica». Поскольку тип распределения данных отличался от нормального, для описания количественных признаков вычисляли медиану, нижний 25-й и верхний 75-й процентиля. Для сравнения достоверности отличия данных в несвязанных группах использовали критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования и обсуждение. В результате исследования было установлено, что самая высокая способность подавлять активность бактерий в нативной биопленке оказалась у сывороток пациентов с острыми гнойно-воспалительными процессами (медиана – 0,56; 25-75 перцентили – 0,45 и 0,74, n=14) и достоверно отличалась от активности в группе лиц без гнойных процессов. В группах пациентов с тяжелыми пневмониями и хроническими гнойно-воспалительными процессами активность сывороток крови в отношении биопленки занимала промежуточное положение и не отличалась достоверно ($p>0,05$) от других групп (таблица). Возможно, при увеличении количества исследованных сывороток отличия станут статистически значимыми.

Таблица. – Способность сывороток крови подавлять нативную бактериальную биопленку *Staphylococcus aureus*

Группа	N	Медиана 25-75 перцентили	Достоверность отличий
1. Хронические гнойно-воспалительные процессы	8	0,47 0,29-0,56	P ₂₋₄ <0,005
2. Острые гнойно-воспалительные процессы	14	0,56 0,45-0,74	
3. Тяжелые пневмонии	10	0,43 0,31-0,59	
4. Лица без гнойно-воспалительных процессов	16	0,36 0,28-0,45	

Полученные данные позволяют предположить, что острый инфекционный процесс приводит к существенному росту факторов системы иммунитета, подавляющих биопленку. При хронических гнойно-воспалительных процессах этого не происходит, что, возможно, связано с недостаточно интенсивной стимуляцией системы иммунитета. Не исключена и обратная ситуация: недостаточно выраженная антибиопленочная активность системы иммунитета способствовала хронизации инфекционного процесса.

Выводы:

1. Предложен метод оценки способности сыворотка крови подавлять сформированную нативную микробную биопленку.
2. Показано, что сыворотки крови пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями и здоровых лиц подавляют активность бактерий нативной биопленки *S. aureus*.
3. Наибольшая активность обнаружена у сывороток крови лиц с острыми гнойно-воспалительными заболеваниями.

Ключевые слова: микробная биопленка, *Staphylococcus aureus*, трифенилтетразолий хлорид.

Литература

1. Aslam, S. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections / S. Aslam, R.O. Darouiche // Int. J. Artif. Organs. – 2010 Sep. – Vol. 34, No. 9. – P. 752-758.
2. Проблема внутрибольничных инфекций в Республике Беларусь: основные направления, перспективы борьбы и профилактики / Е.И. Гудкова [и др.] // Белорусский медицинский журнал. – 2005. – № 2. – С. 4-7.
3. Глушанова, Н.А. Бактериальные биопленки в инфекционной патологии человека / Н.А. Глушанова, А.И. Блинов, Н.Б. Алексеева // Медицина в Кузбассе. – 2015. – Спецвып. 2. – С. 30-35.
4. Современные представления о механизмах взаимодействия биопленки и факторов клеточного иммунитета (обзор) / Н.М. Шлепотина [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2020. – Т. 97, № 1. – С. 83-90.

**ESTIMATION OF ABILITY OF SERUM RECEIVED FROM PATIENTS
WITH PYOINFLAMMATORY DISEASES TO SUPPRESS
NATIVE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BIOFILM GROWTH**

Lepteeva T.N., Senkovich S.A., Zholudzeva A.A., Zubareva I.V.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

The research proposes usage of triphenyltetrazolium chloride for determination of the blood serum ability to suppress native *Staphylococcus aureus* biofilm growth. The ability of serum, received from patients with pyoinflammatory diseases and healthy individuals, to suppress the native bacterial biofilm growth was evaluated. The ability of the majority of blood serum species to inhibit *S. aureus* biofilm growth has been established. The greatest activity was observed in individuals with acute pyoinflammatory diseases who were influenced by blood serum. No statistically significant differences was found between the biofilm bacteria growth suppression by healthy individuals' serum and serum received from patients who have chronic pyoinflammatory processes.

Keywords: microbial biofilm, *Staphylococcus aureus*, triphenyltetrazolium chloride.

Поступили 29.10.2021

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИКРОКРИСТАЛЛИЗАЦИИ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ВИРУСНОЙ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Максимович Е.В., Саид Омар Абдулрахман Саид, Кузнецова А.Я.

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

Введение. В последние годы наблюдается тенденция к увеличению числа инфекционно-воспалительных заболеваний, которые этиологически достоверно связаны с вирусами, в том числе в стоматологии. Ротовая жидкость является биологической жидкостью, в которой кроме секрета слюнных желез, содержится микрофлора полости рта с продуктами ее жизнедеятельности, десневая жидкость, десквамированный эпителий, содержимое пародонтальных карманов, лейкоциты и т.д. Ротовая жидкость является маркером гомеостаза и в полной мере отражает процессы, протекающие в организме, что используется в лабораторной диагностике, дополняя или заменяя классические исследования, обладая неинвазивностью, доступностью получения, простотой забора проб, возможностью повторного взятия биоматериала, безопасностью для здоровья пациента и медперсонала [1].

Цель исследования – провести сравнительную оценку показателей микрокристаллизации ротовой жидкости у пациентов с вирусной и бактериальной инфекцией.

Материалы и методы исследования. Предметом исследования являлся показатель микрокристаллизации двух групп пациентов. Группа 1 включала 11 лиц, обратившихся за медицинской помощью в связи с острой респираторной вирусной инфекцией, в том числе Covid-19, забор ротовой жидкости осуществлялся при первичном обращении. 10 пациентов группы 2 обратились к врачу-стоматологу-хирургу в связи с острым гнойным одонтогенным периоститом челюстей, при проведении первичной хирургической обработки которого был получен гнойный экссудат, забор исследуемого материала осуществлялся до проведения оперативного вмешательства. Исследования проводились в учреждении здравоохранения «5-я городская клиническая поликлиника».

Ротовую жидкость собирали в стерильные пробирки, далее разделяли на осадочную и надосадочную фракции с помощью центрифугирования при 3000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре, используя в исследовании надосадочную фракцию. Затем три капли ротовой жидкости стерильной пипеткой наносили из пробирок на чистое предметное стекло и высушивали при комнатной температуре, затем исследовали в световом микроскопе с увеличением $\times 10$. Показатель микрокристаллизации ротовой жидкости определяли способом И.О. Походенько-Чудаковой и соавторов [2].

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке с использованием пакета прикладных программ «Statistica 10.0». Применяли непараметрические методы статистического анализа, вычисляли медиану (Me), нижний 25-й (LQ) и верхний 75-й квартили (UQ).

Результаты исследования и обсуждение. У пациентов группы 1 среднее значение показателя микрокристаллизации ротовой жидкости составило 2,0 (1,75-2,25). У пациентов группы 2 среднее значение показателя микрокристаллизации ротовой жидкости составило 2,0 (2,0-2,75). Соответственно различий по медиане показателей микрокристаллизации не выявлено. Однако при анализе таблицы показателей определено, что у пациентов группы 1 минимальное значение показателя микрокристаллизации – 1,5, максимальное – 2,5, а у пациентов группы 2 минимальный показатель микрокристаллизации

ротовой жидкости составляет 2,0, максимальный – 3,0. Для выявления достоверных различий и определения возможности использования показателя микрокристаллизации для дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных инфекций, определения вирусного компонента при инфекционно-воспалительных заболеваниях челюстно-лицевой области необходимо проведение дополнительных исследований.

Заключение. В результате проведенной сравнительной оценки показателей микрокристаллизации ротовой жидкости у пациентов с острыми респираторными вирусными заболеваниями и с острым одонтогенным гнойным периоститом челюстей бактериального генеза выявлено отсутствие различий средних значений показателей микрокристаллизации ротовой жидкости, исследуемый показатель не является достоверным при дифференциальной диагностике вирусного компонента в этиологии одонтогенных инфекционно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области.

Ключевые слова: ротовая жидкость, показатель микрокристаллизации, вирусная инфекция.

Литература

1. Клиническое руководство: диагностика, прогнозирование и лечение тяжелых осложнений инфекционно-воспалительных процессов челюстно-лицевой области и шеи: монография / И.О. Походенько-Чудакова [и др.]; под ред. И.О. Походенько-Чудаковой. – Минск: Изд. Центр БГУ, 2016. – 398 с.

2. Походенько-Чудакова, И.О. Сравнительное сопоставление микрокристаллизации биологических сред у пациентов с хроническим одонтогенным синуситом верхнечелюстной пазухи / И.О. Походенько-Чудакова, А.В. Сурин // Новости хирургии. – 2013. – Т. 21, № 3. – С. 79-83.

COMPARATIVE EVALUATION OF MICROCRYSTALLIZATION INDEX OF ORAL FLUID IN PATIENTS WITH VIRAL AND BACTERIAL INFECTION

Maksimovich E.V., Said Omar Abdulrahman Said, Kuznetsova A.Ya.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Oral fluid is a marker of homeostasis and fully reflects the processes occurring in the organism, that is used widely in laboratory diagnostics. A comparative assessment of the indicators of microcrystallization of the oral fluid in patients with viral and bacterial infections was carried out. The absence of differences in the indicators of microcrystallization of the oral fluid was revealed in patients with acute respiratory viral diseases and with acute odontogenic purulent periostitis of the jaws of bacterial origin. The indicator of microcrystallization of the oral fluid is not reliable in the differential diagnosis of the viral component of odontogenic infectious and inflammatory diseases of the maxillofacial region.

Keywords: oral fluid, microcrystallization index, viral infection.

Поступили 22.10.2021

МУТАЦИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К КОЛИСТИНУ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

¹Петровская Т.А., ¹Тапальский Д.В., ¹Карпова Е.В., ²Баранов О.Ю.

¹Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь

²Государственное научное учреждение «Институт леса Национальной академии наук Беларуси», Гомель, Республика Беларусь

Ведение. Из-за возросшего потребления колистина, длительное время оставшегося препаратом «последнего резерва» для лечения больных с тяжелыми внутрибольничными инфекциями, в Беларуси стали отмечать появление устойчивых к нему штаммов *Klebsiella pneumoniae* [1]. Известно, что появление колистинорезистентных внутрибольничных штаммов грамотрицательных бактерий напрямую связаны с предыдущим употреблением колистина [2].

Молекулярные механизмы, ответственные за устойчивость к колистину, основаны на мутациях в генах двухкомпонентных систем PmrAB, PhoQP, CtrBA, которые реагируют на различные параметры окружающей среды (низкий pH, концентрация ионов Mg²⁺, катионные антимикробные пептиды и др.), а также в генах mgrB, udg, uscM, IpxM [3, 4].

Цель работы: с использованием методов высокопроизводительного секвенирования определить молекулярные механизмы устойчивости к колистину у клинических изолятов *K. pneumoniae*.

Материалы и методы исследования. Было отобрано 13 клинических изолятов *K. pneumoniae* с множественной (MDR – multidrug resistance) и экстремальной (XDR – extensively drug resistance) антибиотикорезистентностью, выделенных от госпитализированных пациентов в стационарах Витебска (4 штамма), Гомеля (4 штамма), Гомельской области (3 штамма), Минска (2 штамма). Полупроводниковое секвенирование выполнено в геномном секвенаторе Ion PGM System (Thermo Fisher Scientific, США) на основе использования микрочипов Ion 314 Chip v2, Ion 318 Chip v2 и набора Ion PGM Hi-Q Sequencing 200 Kit. Обработка полученных нуклеотидных последовательностей проводилась при помощи программ Unipro UGENE v.1.29.0, CLC Sequence Viewer v.8.0 (QIAGEN), а также с использованием веб-ресурсов Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>), Protein BLAST, Protein 3D structure SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), PROVEAN (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php).

Результаты исследования. Выявлен ряд однонуклеотидных замен в гене *pmrB*, присутствующих только у колистинорезистентных штаммов и маркированных программой PROVEAN как функционально значимые. Среди них замена D150Y у штамма *K. pneumoniae* БК-167 с МПК колистина 64 мг/л, замена T157P у штамма *K. pneumoniae* 37999 с МПК колистина 64 мг/л, замена G207S у штаммов *K. pneumoniae* МК-07 (МПК колистина 64 мг/л) и *K. pneumoniae* БК-045 (МПК колистина 64 мг/л).

При сравнении последовательностей генов *pmrA*, *pmrB*, *phoP* и *phoQ* исследуемых изолятов с референсным штаммом *K. pneumoniae* ATCC 700603 выявлены несинонимичные однонуклеотидные замены, не приводящие к нарушению структуры белка. Например, в гене *phoP* у всех штаммов была выявлена одна несинонимичная замена, приводящая к замене лизина на аргинин (K34R). В гене *pmrA* у всех штаммов была выявлена замена Q140L, влияющая на функциональную активность белка, однако она присутствовала как у колистиночувствительных, так и колистинорезистентных штаммов.

У штамма *K. pneumoniae* БК-168 (МПК колистина 128 мг/л) в гене *mgrB* присутствовала функционально значимая замена W20R. У 4 резистентных штаммов была выявлена инсерционная инактивация гена *mgrB* транспозонами семейств IS1, IS4 и IS5. Еще у 2 устойчивых к колистину штаммов не было выявлено значимых мутаций во всех проанализированных генах.

Выводы. С использованием методов высокопроизводительного секвенирования и биоинформатического анализа выявлены значимые молекулярно-генетические механизмы резистентности к колистину (замены D150Y, T157P и G207S в гене *pmrB*, инсерционная инактивация и делеция гена *mgrB*) у штаммов *K. pneumoniae*.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, колистин, антибиотикорезистентность.

Литература

1. Тапальский, Д.В. Бактерицидная активность комбинаций антибиотиков в отношении экстремально-антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* с устойчивостью к колистину / Д.В. Тапальский, Т.А. Петровская // Медицинские новости. – 2020. – № 2. – С. 63-66.
2. Ah, Y.M. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* / Y.M. Ah, A.J. Kim, J.Y. Lee // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2014. – Vol. 44. – P. 8-15.
3. Resistome of carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates / S. Lomonaco [et al.] // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, No. 6. – Art. e0198526.
4. Molecular epidemiology of colistin-resistant Enterobacteriaceae in inpatient and avian isolates from China: high prevalence of mcr-negative *Klebsiella pneumoniae* / X. Wang [et al.] // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2017. – Vol. 50. – P. 536–541.

MUTATIONAL MECHANISMS OF RESISTANCE TO COLISTIN IN CLINICAL ISOLATES OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

¹Petrovskaya T.A., ¹Tapalsky D.V., ¹Karpova E.V., ²Baranov O.Yu.

¹Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

²The Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

Significant molecular genetic mechanisms of colistin resistance (D150Y, T157P and G207S substitutions in the *pmrB* gene, insertional inactivation and deletion of the *mgrB* gene) in *K. pneumoniae* strains were identified using high-throughput sequencing and bioinformatics analysis.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, colistin, resistance.

Поступили 22.10.2021

COVID-19 ИНФЕКЦИЯ У ПАЦИЕНТОВ С КОМОРБИДНЫМ ФОНОМ И УГРОЗОЙ РАЗВИТИЯ ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА

Селицкая О.П., Доценко М.Л., Грачев С.С.

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

Введение. В свете самого сложного кризиса общественного здравоохранения в современной истории смертность от COVID-19 продолжает расти тревожными темпами. Растущий объем клинических данных свидетельствует о том, что цитокиновый шторм является одним из критериев тяжести течения COVID-19, а также одной из основных причин смерти [1].

Пациенты с сопутствующей патологией, такой как сердечно-сосудистые заболевания и сахарный диабет 2 типа, более склонны к тяжелому течению COVID-19 и могут иметь более высокий риск летального исхода. Ухудшенный прогноз у пациентов с COVID-19, имеющих в анамнезе сахарный диабет 2 типа, может быть объяснен облегченным поглощением вируса, которому способствует рецептор ангиотензинпревращающего фермента 2. Это также может быть связано с более высоким базальным уровнем провоспалительных цитокинов, присутствующих у пациентов с диабетом, что обеспечивает гиперинфляционную «цитокиновую бурю» в ответ на вирус [2, 3]. Хроническое воспаление, сопровождающее ожирение и метаболический синдром, также приводит к аномальной продукции цитокинов и увеличению реактивов острой фазы [4].

Таким образом, течение COVID-19 инфекции у пациентов с сопутствующей патологией имеет клинические особенности, обусловленные взаимным отягощением патологических процессов, что определяет актуальность их изучения в целях разработки комплексных подходов к лечению данных пациентов в условиях интенсивной терапии.

Цель исследования: оценить влияние наличия сахарного диабета 2 типа у пациентов с тяжелым течением COVID-19 на исход заболевания.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на базе УЗ «5-я городская клиническая больница» г. Минска. В исследовании участвовало 63 пациента (36 мужчин и 27 женщин) с тяжелым течением COVID-19, находившихся на лечении в отделении анестезиологии и реанимации № 3 в период с апреля по октябрь 2020 г. Средний возраст всех пациентов, выбранных для проведения исследования, составил $58,2 \pm 1,42$ года. В целях исследования все пациенты были разделены на две группы: исследуемая группа ($n=19$) – пациенты с сахарным диабетом 2 типа, контрольная группа ($n=44$) – пациенты без сахарного диабета. Пациенты обеих групп имели синдром высвобождения цитокинов и получали таргетную терапию в виде тоцилозумаба с режимом дозирования 4–8 мг/кг (при массе тела 100 кг и менее – 400 мг, при массе тела более 100 кг – 800 мг).

Статистическая обработка и анализ проводились с использованием статистических пакетов программы Statistica 10. Для анализа соответствия вида распределения закону нормального распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Центральные тенденции и дисперсии количественных признаков, имеющих распределение, приближенное к нормальному, описывали средним значением и ошибкой среднего в формате $M \pm m$. Для относительных показателей рассчитывали ошибку и 95% доверительный интервал – P (95% ДИ). Расчет доверительных интервалов для интенсивных показателей произведен по методу Уилсона. Для сравнения двух независимых групп по количественным признакам, распределение которых приближено к нормальному использовали критерий t Стьюдента. Значимость различий данных, характеризующих качественные при-

знаки определяли на основании величины критерия соответствия (χ^2). Результаты исследования считали достоверными, различия между показателями значимыми при вероятности безошибочного прогноза не менее 95,5% ($p < 0,05$).

Результаты исследования и обсуждение. Анализ возраста пациентов обеих групп, сформированных для проведения исследования, показал, что средний возраст пациентов исследуемой группы составил $62,2 \pm 2,15$ года, а возраст пациентов группы контроля – $56,5 \pm 1,75$ лет. В сравниваемых группах различия в возрасте отсутствуют ($t=1,88$, $p=0,07$). Сравнение групп по полу также не выявило различий: в исследуемой группе доля мужчин составила 52,6 % (95% ДИ 31,7-72,7), в группе контроля – 59,1% (95% ДИ 44,4-72,3) ($\chi^2=0,06$, $p=0,802$).

Анализ вероятности летального исхода в группах показал, что наличие сахарного диабета 2 типа статистически значимо увеличивает количество летальных исходов в исследуемой группе. Так, среди пациентов исследуемой группы течение заболевания завершилось летальным исходом в 63,2% (95% ДИ 41,0-80,9) случаев ($n=12$), тогда как в группе контроля – в 37,5% (95% ДИ 22,9-54,8) случаев ($n=12$) ($\chi^2=7,25$, $p=0,007$) (рисунок).

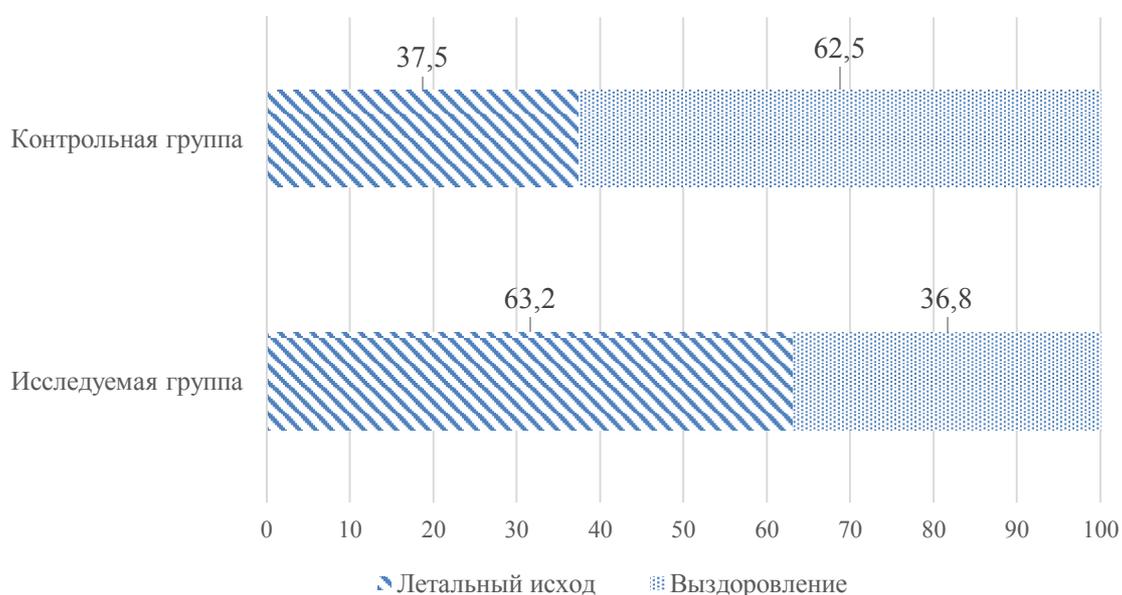


Рисунок. – Структура исходов заболевания в исследуемой и контрольной группах пациентов (%)

Заключение. Наличие сахарного диабета 2 типа является фактором риска летального исхода у пациентов с тяжелым течением COVID-19 и развитием цитокинового шторма.

Литература

1. Early identification of COVID-19 cytokine storm and treatment with anakinra or tocilizumab / A. Langer-Gould [et al.] // *Int. J. Infect. Dis.* – 2020. – Vol. 99. – P. 291-297.
2. COVID-19 and diabetes mellitus: how one pandemic worsens the other / W. Azar [et al.] // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* – 2020. – Vol. 21. – P. 451-463.
3. Erener, S. Diabetes, infection risk and COVID-19 / S. Erener // *Mol. Metab.* – 2020. – Vol. 39. – 101044. doi:10.1016/j.molmet.2020.101044.
4. COVID-19 and the role of chronic inflammation in patients with obesity / S. Chiappetta [et al.] // *Int. J. Obes. (Lond).* – 2020. – Vol. 44, No. 8. – P. 1790-1792.

COVID-19 IN PATIENTS WITH COMORBID BACKGROUND AND CYTOKINE STORM THREAT

Selitskaya O.P., Docenko M.L., Gratchev S.S.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The study results of assessing the impact of type 2 diabetes mellitus in patients with severe COVID-19 who received targeted therapy on the disease outcome presented. The analysis was carried out in the study (n=19) and control groups (n=44). It was found that the presence of type 2 diabetes in patients with a severe course of COVID-19 and the threat of a cytokine storm is a risk factor and a lethal outcome ($\chi^2=7.25$, $p=0.007$). The results obtained indicate that the presence of a comorbid background in patients with COVID-19 affects the course and prognosis of the disease, which must be taken into account when conducting intensive care and choosing tactics for managing such patients.

Keywords: COVID-19, cytokine storm, type 2 diabetes, risk of mortality.

Поступили 04.11.2021

ТЕНДЕНЦИИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В Г. МИНСКЕ

Шилова М.А., Вальчук И.Н.

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

Введение. Распространение ВИЧ-инфекции в регионе Восточной Европы и Центральной Азии остается активным, в особенности среди ключевых групп риска и их половых партнеров, на которые, по оценкам экспертов, приходится до 99% новых случаев ВИЧ-инфекции [1]. Так, риск передачи ВИЧ среди лиц, употребляющих инъекционные наркотики (ЛУИН), выше в 29 раз по сравнению с рисками передачи возбудителя в совокупной популяции [2-4].

Цель: выявить особенности и закономерности развития эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в г. Минске.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования явились эпидемиологические данные пациентов с установленным диагнозом ВИЧ-инфекции, выявленных на территории г. Минска в 2000-2019 гг., ЛУИН, состоящих на учете в УЗ «Городской клинический наркологический диспансер» (УЗ «ГКНД») в 2010-2019 гг., демографические показатели. Составление баз данных и их статистическая обработка производилась при помощи стандартных пакетов статистических программ Microsoft Excel 10, STATISTICA 10.

Для анализа данных был применен метод сплошного динамического аналитического исследования, описательно-оценочные, прогностические и статистические методы исследования. Оценка достоверности эпидемической тенденции определялась путем расчета критерия «t» Стьюдента. Для расчета доверительных интервалов к показателям удельного веса использовался метод Клоппера-Пирсона ($p < 0,05$).

Результаты исследования и обсуждение. Инцидентность ВИЧ-инфекции в г. Минске в 2010-2019 гг. распределялась по годам неравномерно, варьировала в пределах 4,93‰ (2005 г.)-41,00‰ (2015 г.) и характеризовалась достоверной выраженной тенденцией к росту со средним темпом прироста 12,62%, $p < 0,05$. Среднегодовалый показатель заболеваемости составлял 22,42 случая на 100 000 населения.

Для анализируемого временного интервала характерно постепенное увеличение доли лиц в возрасте 35-39 лет и старше 40 лет, удельный вес которых достигал 24,13% (ДИ95% 20,51-28,05) и 34,17% (ДИ95% 30,09-38,43) в 2019 г. соответственно. В социальной структуре отмечалось нарастание удельного веса рабочих и служащих (50,97% (ДИ95% 46,57-55,35) в 2019 г.). Доля лиц мужского пола среди ВИЧ-инфицированных в г. Минске возросла до 72,39% (ДИ95% 68,79-75,79) в 2016 г. и оставалась высокой – в 2019 г. она составляла 71,24% (ДИ95% 67,13-75,10).

Между инцидентностью ВИЧ-инфекции населения г. Минска и заболеваемостью ВИЧ-инфекцией ЛУИН выявлена прямая линейная зависимость ($r=0,96$; $R^2=0,92$, $p < 0,01$). Наличие автокорреляции в имеющихся рядах данных (0,52 и 0,43 соответственно) свидетельствуют о высокой потенциальной эффективности профилактических программ среди ЛУИН и населения Минска.

Заключение. Заболеваемость ВИЧ-инфекцией населения г. Минска в период 2010-2019 гг. характеризовалась достоверной выраженной тенденцией к росту ($T_{пр.}=12,62\%$, $p < 0,05$). В половой структуре пациентов, инфицированных ВИЧ, отмечается преобладание мужчин, а в возрастной структуре – увеличение доли лиц старших возрастных групп.

Полагаем, что увеличение доли рабочих и служащих в социальной структуре выявленных случаев ВИЧ-инфекции вызвано процессами социализации ВИЧ-инфицированных лиц. Заболеваемость ВИЧ-инфекцией населения г. Минска имеет выраженную взаимосвязь с инцидентностью данного заболевания среди ЛУИН, находящихся на учете в УЗ «ГКНД».

Ключевые слова: инцидентность, ВИЧ-инфекция, эпидемический процесс, ЛУИН.

Литература

1. Информационный бюллетень. Глобальная статистика по ВИЧ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.unaids.org/ru/resources/fact-sheet>. – Дата доступа: 12.03.2021.
2. HIV, HBV and HCV in people who inject drugs and are placed on methadone maintenance therapy / N.S. Aye [et al.] // Public Health Action. – 2018. – Vol. 8, No. 4. – P. 202-210.
3. Mitigating the risk of HIV infection with opioid substitution treatment. Bulletin of the World Health Organization 2012 [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.who.int/bulletin/volumes/91/2/12-109553/en/>. – Date of access: 20.02.2021.
4. The impact of methadone maintenance treatment on HIV risk behaviors among high-risk injection drug users: a systematic review / P. Karki [et al.] // Evid. Based Med. Public Health. – 2016. – Vol. 2 – P. 1-11.

EPIDEMIC PROCESS TENDENCIES FOR HIV INFECTION IN MINSK

Shylava M.A., Valchuk I.N.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The HIV infection incidence of the Minsk population (2010-2019) was characterized by a significant upward trend (rate of increase = 12.62%, $p < 0.05$). There was a predominance of men in the gender structure of patients infected with HIV. In the age structure There was an increase in the proportion of people in older age groups (older than 35 y.o.). We propose that the increase in the share of workers and employees in the social structure of identified cases of HIV infection is caused by the processes of socialization of HIV-infected people. The HIV incidence of the Minsk population has a correlation with the incidence of this disease among PWID registered in the City Clinical Narcological Dispensary.

Keywords: incidence, HIV infection, epidemic process, PWID.

Поступили 27.10.2021

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 выравниванием по центру без точек в конце и включает:

1) **НАЗВАНИЕ СТАТЬИ – ПЕЧАТАЕТСЯ ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ БЕЗ СОКРАЩЕНИЙ ЖИРНЫМ ШРИФТОМ;**

2) **фамилии и инициалы авторов – указываются ниже строчными буквами жирным шрифтом;**

3) *название учреждения, город, страна – указываются на следующей строке курсивом нежирным шрифтом.*

6. После заглавия (на языке текста публикуемого материала) 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, заклучение 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 приводится на русском языке). Буквального соответствия русского и английского рефератов не требуется.

13. В конце статьи должны быть подписи всех авторов.

14. К статье прилагаются сведения об авторах (Ф.И.О., звание, ученая степень, должность, учреждение, город, адрес электронной почты и контактный телефон).

15. Обязательно предоставление материалов в электронном виде с соблюдением вышеуказанных правил. Файл должен иметь формат MS Word (*.DOC, *.RTF). Название файла должно содержать фамилию и инициалы первого автора и первые два слова названия статьи на русском языке (например, Сидров ИИ_Способ получения.doc).

16. Статья должна быть тщательно отредактирована и выверена автором. Обязательна виза руководителя подразделения. К статье прилагается экспертное заключение о возможности опубликования в открытой печати, и письмо-ходатайство организации, в которой выполнялась работа с обязательным указанием, что направляемые материалы ранее не были опубликованы или не приняты к печати другими изданиями (авторы несут за это полную ответственность).

17. Один автор имеет право на публикацию не более трех научных статей с учетом соавторства.

18. Лицам, осуществляющим послевузовское обучение (аспирантура, докторантура, соискательство) в год завершения обучения предоставляется первоочередная возможность опубликования представленных статей.

19. Поступившие в редакцию статьи направляются на рецензирование профильным специалистам. Основным критерием целесообразности публикации является новизна и информативность статьи. Если по рекомендации рецензента статья возвращается на доработку, то переработанная рукопись вновь рассматривается редакционной коллегией, при этом датой поступления считается день получения редакцией ее окончательного варианта.

20. Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать статьи без искажения основного содержания статьи.

21. При нарушении указанных правил статьи не рассматриваются. Рукописи не возвращаются.

Плата за опубликование научных статей не взимается со всех авторов.

Адрес и контактная информация редакции:

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, ул. Филимонова, 23, г. Минск, 220114, Республика Беларусь, тел.: (+375-17)3770439/3746979, факс: (+375-17)3773093, E-mail: rrpcem@belriem.by или belriem@gmail.com <http://www.belriem.by/>

СОДЕРЖАНИЕ

ПАМЯТИ АКАДЕМИКА ВЕНИАМИНА ИОСИФОВИЧА ВОТЯКОВА (к 100-летию со дня рождения)	3
ЭПИДЕМИОЛОГИЯ	7
<i>Оригинальные исследования</i>	7
ИНФЕКЦИЯ COVID-19 В СТРУКТУРЕ ОРВИ У ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2020-2021 гг. <i>Аношко О.Н., Лапо Т.П., Кищенко Е.Н., Сивец Н.В., Шмелёва Н.П.</i>	7
РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПЕРВИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1 СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ БЕЗ ОПЫТА ЛЕЧЕНИЯ И ПАЦИЕНТОВ С НЕУДАЧЕЙ ЛЕЧЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Гасич Е.Л., Бунас А.С.</i>	13
ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ВИРУСА ГЕПАТИТА Е НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ <i>Давыдов В.В., Жаворонок С.В., Красочко П.А., Борисовец Д.С., Анисько Л.А., Гасич Е.Л., Марчук С.И.</i>	18
РЕЗУЛЬТАТЫ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА РАКА ШЕЙКИ МАТКИ В ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ <i>Логинова О.П., Шевченко Н.И., Веялкин И.В.</i>	29
ОПИСТОРХОЗ: АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ, ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ <i>Мамчиц Л.П., Кривостаненко Т.Д., Гандьши Е.В., Чайковская М.А.</i>	35
КОРЬ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2020-2021 гг. <i>Семейко Г.В., Самойлович Е.О., Ермолович М.А.</i>	42
СПЕКТР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СЕПСИСА У ДЕТЕЙ В ИНФЕКЦИОННОМ СТАЦИОНАРЕ <i>Сергиенко Е.Н.</i>	48
ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ГРИППА С В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: РЕТРОСПЕКТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ В РАМКАХ ДОЗОРНОГО НАДЗОРА ЗА ГРИППОМ <i>Сивец Т.С., Сивец Н.В., Шмелева Н.П.</i>	52
МИКРОБИОЛОГИЯ	56
<i>Оригинальные исследования</i>	56
ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ <i>Голубович Е.Л., Шишторенок Ю.А., Гудков В.Г.</i>	56

ДЕТЕКЦИЯ МИКОПЛАЗМЕННОЙ КОНТАМИНАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ПРОБОПОДГОТОВКИ <i>Григорьева Е.Е., Фомина Е.Г., Корень С.В., Зверко В.В.</i>	62
ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ЭТАЛОННЫЕ ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ, КАК СРЕДСТВО СТАНДАРТИЗАЦИИ, ОБЕСПЕЧЕНИЯ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ <i>Гудков В.Г., Пугач В.В., Горбунов В.А., Красько А.Г., Шишпоренок Ю.А., Анискович Е.Д., Молочкова Я.В., Тимофеева Е.В.</i>	68
РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕНОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АМИНОГЛИКОЗИДАМ У <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> <i>Дубовик П.И., Титов Л.П.</i>	75
АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ СРЕДСТВ В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДЕРМАТОФИТИЙ <i>Звягинцева К.Б., Пугач В.В., Канашкова Т.А., Дронина А.М., Буткевич В.В.</i>	82
РАЗРАБОТКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ГЕНОДИАГНОСТИКИ <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> « <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> -ПЦР/РВ» <i>Капустина Ю.М., Рубаник Л.В., Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е.</i>	86
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К КОМБИНАЦИЯМ АНТИБИОТИКОВ ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> НА ФОНЕ ПАНДЕМИИ COVID-19 <i>Карпова Е.В., Тапальский Д.В.</i>	93
ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЙ ФРАГМЕНТ ГЕНОМА <i>WADDLIA CHONDROPHILA</i> , С ЦЕЛЬЮ КОНТРОЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ <i>Рубаник Л.В., Григорьева Е.Е.</i>	99
АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> К МЕТРОНИДАЗОЛУ НА ОСНОВАНИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ГИДРОГЕНОСОМ ПРОСТЕЙШЕГО <i>Рубаник Л.В., Жукова Ю.С., Полещук Н.Н.</i>	104
АССОЦИАЦИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ 23S рРНК <i>HELICOBACTER PYLORI</i> , СВЯЗАННЫХ С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К КЛАРИТРОМИЦИНУ, С АКТИВНОСТЬЮ ВОСПАЛЕНИЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА <i>Янович О.О., Титов Л.П., Дорошко М.В.</i>	109
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> И ИХ СПОСОБНОСТЬ К ФОРМИРОВАНИЮ БИОПЛЕНКИ <i>Ярец Ю.И.</i>	114
ВИРУСОЛОГИЯ	119
Обзорные сообщения	119
ИНГИБИТОРЫ РЕПРОДУКЦИИ КОРОНАВИРУСОВ: НАСТОЯЩЕЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ <i>Бореко Е.И.</i>	119

Оригинальные исследования	131
ВЛИЯНИЕ ЛЕЧЕНИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ SARS-COV-2, НА ТЕЧЕНИЕ СОПУТСТВУЮЩЕЙ ПАТОЛОГИИ <i>Антонович М.Н., Пожарицкий А.М., Головацкий А.П.</i>	131
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО» ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ N501Y В ГЕНОМЕ ВИРУСА SARS-COV-2 <i>Булда К.Ю., Гасич Е.Л., Дрозд А.М., Кабанькова А.Н.</i>	136
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕДКИХ КОДОНОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ВИРУСНЫХ НУКЛЕОКАПСИДНЫХ БЕЛКОВ И ИХ ФРАГМЕНТОВ <i>Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е., Зверко В.В., Русина В.В.</i>	141
ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ПАРВОВИРУСА В19 <i>Хрусталёв В.В., Хрусталёва Т.А., Побойнев В.В., Стожаров А.Н., Шалыго Н.В., Самойлович Е.О., Ермолович М.А., Семейко Г.В.</i>	150
ДИЗАЙН СИНТЕТИЧЕСКОГО ВАКЦИННОГО ПЕПТИДА, СООТВЕТСТВУЮЩЕГО ФОСФОЛИПАЗНОМУ ДОМЕНУ КАПСИДНОГО БЕЛКА ПАРВОВИРУСА В19 <i>Хрусталёв В.В., Хрусталёва Т.А., Побойнев В.В., Стожаров А.Н., Шалыго Н.В., Самойлович Е.О., Ермолович М.А., Семейко Г.В.</i>	157
МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСА КАРДИОЛИПИНА И ДОМЕНА КАПСИДНОГО БЕЛКА ПАРВОВИРУСА В19, ОБЛАДАЮЩЕГО ФОСФОЛИПАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ <i>Хрусталёв В.В., Хрусталёва Т.А., Побойнев В.В., Стожаров А.Н., Шалыго Н.В., Самойлович Е.О., Ермолович М.А., Семейко Г.В.</i>	164
ИММУНОЛОГИЯ	171
Обзорные сообщения	171
ИММУНОПАТОГЕНЕЗ И ЛЕЧЕНИЕ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (COVID-19): ПОЗИЦИЯ КЛИНИЧЕСКОГО ФАРМАКОЛОГА <i>Василевский И.В.</i>	171
ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ ПОЛЛИНОЗА: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ <i>Пархомчук О.Ю., Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е.</i>	175
Оригинальные исследования	182
ПОСТИНФЕКЦИОННЫЙ И ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ К ВОЗБУДИТЕЛЮ COVID-19 У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧКИ <i>Амвросьева Т.В., Бельская И.В., Богуш З.Ф., Поклонская Н.В., Юденкова Т.В., Калачик О.В., Чеботарева Т.К.</i>	182
БИОМАРКЕРЫ ПОЧЕЧНОГО ПОРАЖЕНИЯ ПРИ ГЛОМЕРУЛОПАТИЯХ <i>Асташонок А.Н., Козыро И.А., Сукало А.В., Полецук Н.Н., Кондратенко О.А.</i>	192

ДЕТЕКЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДИСФУНКЦИИ РЕСНИЧАТЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С РЕСПИРАТОРНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ <i>Асташинок А.Н., Полещук Н.Н., Петрученя А.В., Бобровнический В.И.</i>	197
ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 <i>Зверко В.В., Григорьева Е.Е., Фомина Е.Г.</i>	202
ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО ОТВЕТА К СПЕКТРУ ВИРУСНЫХ АНТИГЕНОВ SARS-COV-2 В ДИНАМИКЕ <i>Русина В.В., Бобрукевич Д.В., Антонец Н.Г., Гончаров А.Е., Фомина Е.Г., Владыко А.С., Колтунова Ю.Б.</i>	208
ОДНОВРЕМЕННОЕ ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СУБКУЛЬТУР МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ И ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ (СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ) КЛЕТОК ЛИМФА РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА <i>Шумский В.А., Квачева З.Б., Бутенко А.В., Асташинок А.Н., Василевич И.Б., Марченко Л.Н.</i>	213
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ	219
Тезисы республиканской научно-практической конференции с международным участием «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии», 12 ноября 2021 г. (в режиме онлайн)	219
ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ СРЕДИ ИЗОЛЯТОВ САЛЬМОНЕЛЛ ОТ ПАЦИЕНТОВ И ИЗ ОБРАЗЦОВ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ <i>Бакаева Т.Н., Титов Л.П.</i>	219
СКРИНИНГ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В NS5A УЧАСТКЕ ГЕНОМА ВИРУСА ГЕПАТИТА С 3А И 1В ПОДГЕНОТИПОВ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ <i>Гасич Е.Л., Кабанькова А.Н.</i>	222
ИНФЕКЦИОННЫЙ КОНТРОЛЬ В ЦЕНТРЕ ДЕТСКОЙ ОНКОЛОГИИ, ГЕМАТОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ <i>Громыко И.Н., Кондаурова С.Л.</i>	225
ВЫЯВЛЕНИЕ НЕИММУННОЙ ВОДЯНКИ ПЛОДА, ВЫЗВАННОЙ ПАРВОВИРУСОМ V19, В ПЕРИОД НИЗКОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ <i>Ермолович М.А., Самойлович Е.О., Белуга М.В.</i>	227
ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ОСТРОГО СИАЛАДЕНИТА В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОГО ОХВАТА ВАКЦИНАЦИЕЙ ПРОТИВ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА <i>Ермолович М.А., Семейко Г.В., Михаленко А.О., Самойлович Е.О.</i>	230
СПОСОБНОСТЬ СЫВОРОТОК КРОВИ ЛИЦ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В СРАВНЕНИИ С СЫВОРОТКАМИ ДОНОРОВ ПОДАВЛЯТЬ НАТИВНУЮ БИОПЛЕНКУ <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> <i>Лептеева Т.Н., Сенькович С.А., Жолудева А.А., Зубарева И.В.</i>	232
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИКРОКРИСТАЛЛИЗАЦИИ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ВИРУСНОЙ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ <i>Максимович Е.В., Саид Омар Абдулрахман Саид, Кузнецова А.Я.</i>	235

МУТАЦИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К КОЛИСТИНУ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> <i>Петровская Т.А., Тапальский Д.В., Карпова Е.В., Баранов О.Ю.</i>	237
ИНФЕКЦИЯ COVID-19 У ПАЦИЕНТОВ С КОМОРБИДНЫМ ФОНОМ И УГРОЗОЙ РАЗВИТИЯ ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА <i>Селицкая О.П., Доценко М.Л., Грачев С.С.</i>	239
ТЕНДЕНЦИИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В г. МИНСКЕ <i>Шилова М.А., Вальчук И.Н.</i>	242
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ	244

Для заметок

Научное издание

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ
ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА**

Сборник научных трудов

Выпуск 14

Подписано в печать 25.05.2022. Формат 60×84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.

Цифровая печать. Усл. печ. л. 14,42. Уч.-изд. л. 15,57.

Тираж 60 экз. Заказ 153.

Отпечатано с оригинала-макета заказчика
в республиканском унитарном предприятии
«Издательский центр Белорусского государственного университета».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.