

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

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

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ  
ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА**

**Сборник научных трудов**

**выпуск 5**

Минск

2012

УДК 616.9(082)  
ББК 55.14  
С 56

*Сборник научных трудов  
Основан в 2008 г.*

*Редакционная коллегия:*

*Т.В. Амвросьева, д.м.н., проф.; В.А. Горбунов, к.м.н., доц.; В.Г. Гудков, к.м.н., доц.;  
В.Ф. Ерёмин, д.м.н., доц.; Н.П. Мишаева, д.б.н., доц.; С.В. Орлова, к.м.н.;  
А.С. Петкевич, к.м.н., доц.; Н.Н. Полещук, д.м.н., проф.; Т.И. Самойлова, д.б.н., доц.;  
Е.О. Самойлович, д.м.н., доц. (Беларусь); А.Н. Алексеев, д.м.н., проф. (Россия);  
М. Муrowsка, д.м.н., проф. (Латвия); Д. Феби, проф. (Великобритания)*

Рецензенты:

д-р мед. наук, проф. *Н.Д. Коломиец*  
д-р мед. наук *Е.И. Бореко*

Главный редактор:

член-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. *Л.П. Титов*

С 56 **Современные проблемы инфекционной патологии человека:** сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л. П. Титова [и др.]. — Минск : ГУ РНМБ, 2012. — Вып. 5. — 330 с.: 69 ил., 71 табл.

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.

ISBN 978-985-7044-02-3

УДК 616.9 (082)  
ББК 55.14

© Составление. ГУ РНПЦЭМ, 2012  
© Оформление. ГУ «Республиканская  
научная медицинская библиотека», 2012

## **ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ И ИТОГИ НАУЧНО-ПРИКЛАДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ**

**Горбунов В.А., Гаевский И.В., Федоров Ю.Е., Филонюк В.А., Карабан И.А.  
Шмелева Н.П., Петкевич А.С., Азарова И.А.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

В настоящее время инфекционные заболевания занимают доминирующее положение в структуре общей заболеваемости человека. По данным ВОЗ, ежегодно 2 млрд людей болеет инфекционными заболеваниями, из которых 17 млн умирает. Особенности инфекций XXI в.: наряду с резким снижением или ликвидацией детских инфекций, контролируемых средствами иммунопрофилактики (корь, краснуха, дифтерия, коклюш, эпидемический паротит, полиомиелит) появляются инфекции, приобретающие черты глобального распространения в виде эпидемий и пандемий (вирусные гепатиты В и С, ВИЧ); возникают новые возбудители (новые варианты вируса гриппа, Западного Нила, вирусов геморрагических лихорадок — Ласса, Эбола, Марбург, корона-вирусы, всего более 30 новых возбудителей); наблюдается возврат к эпидемическому распространению, более тяжелому течению и высокой летальности известных ранее инфекций (туберкулез, дифтерия, грипп и др.). Установлена роль инфекционных агентов в патогенезе заболеваний, которые ранее не считались, а соответственно, и не лечились как инфекционные (онкологические, аутоиммунные, аллергические, неврологические, психиатрические и др.). Глобальное значение приобрела проблема развития лекарственной резистентности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам и резкое снижение эффективности этиотропной терапии (на 70–90%) [1, 2].

Резкое обострение террористической деятельности в мире на первый план выдвинуло проблему биотерроризма и биобезопасности населения каждой страны. Следует отметить негативную роль неблагоприятных изменений в мире и окружающей среде: резкое увеличение трансконтинентальной миграции населения, глобализация экономики, рост плотности населения, глобальное потепление, ухудшение санитарно-гигиенической обстановки и др.

Все это ставит перед здравоохранением новые задачи и требует разработки высокочувствительных экспрессных методов индикации и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний, эффективных средств профилактики и лечения, основанных на последних достижениях науки и техники.

На протяжении последних лет в Республике Беларусь поддерживается устойчивое санитарно-эпидемиологическое благополучие: не допущены крупные вспышки инфекционных заболеваний, зарегистрировано снижение заболеваемости по 41 нозологической форме инфекций, не регистрируется заболеваемость по 19. В этом большая заслуга наряду с другими учреждениями, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (далее — центр), который является ведущим, координирующим научно-исследовательским учреждением страны в области контроля инфекционных заболеваний [1, 3]. Основными направлениями деятельности центра являются:

- поддержание санитарно-эпидемиологического благополучия страны, санитарная охрана ее населения и территории от основных инфекционных и паразитарных заболеваний;
- развитие фундаментальных исследований, прежде всего в области нанотехнологий как основы решения научных и прикладных задач, так и для поддержания и развития приоритетных научных направлений в области вирусологии, бактериологии и иммунологии;
- координация усилий ученых, практиков страны, направленных на эффективное внедрение результатов научных исследований и отечественных разработок и технологий в практику здравоохранения с целью импортозамещения и валютосбережения;
- развитие системы оказания платных медицинских услуг населению и учреждениям здравоохранения в области диагностики актуальных инфекционных заболеваний;

- совершенствование и развитие системы контроля качества иммунобиологических препаратов;
- подготовка научных кадров высшей квалификации в области вирусологии, микробиологии, иммунологии и эпидемиологии, а также повышение квалификации специалистов практического здравоохранения;
- международное сотрудничество.

Все поставленные перед центром задачи реализуются в рамках практически всех существующих в стране форм организации научных исследований: государственных (ГП), государственных научно-технических программ (ГНТП), отраслевых программ (ОНТП), межгосударственных целевых программ (МЦП) и др. Так, с 2011 г. в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (РНПЦЭМ) выполняется 68 заданий НИР в рамках 12 научных программ: ГНТП «Инфекции и микробиологические нанотехнологии»; ГНТП «Новые технологии диагностики и лечения», п/п «Трансплантология и регенеративная медицина»; ГНТП «Лечебные и диагностические технологии», п/п «Онкология»; ГНТП «Новые лекарственные средства», п/п «Фармсустанции и готовые лекарственные средства»; ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация»; ГП «Инновационные биотехнологии», п/п «Медицинские биотехнологии»; ОНТП «Здоровье женщины и ребенка — благополучие семьи и государства»; ОНТП «Здоровье и окружающая среда»; Задания, направленные на научно-техническое обеспечение деятельности Минздрава Республики Беларусь; Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований (БРФФИ); МЦП ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии», п/п «Инновационные биотехнологии в Республике Беларусь»; Союзная программа «Разработка новых методов и технологий восстановительной терапии патологически измененных тканей и органов с использованием стволовых клеток», шифр «Стволовые клетки». В 2012 г. в связи с плановым завершением ряда заданий НИР в центре выполняется 64 задания НИР. РНПЦЭМ является одним из инициаторов создания программы МЦП ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии», п/п «Инновационные биотехнологии в Республике Беларусь», выполняет 6 заданий НИР.

Центр участвует также в выполнении Государственных программ, направленных на обеспечение биологической, демографической безопасности страны, повышение рейтинга человеческого потенциала: Государственная программа социально-экономического развития Республики Беларусь 2011–2015 гг.; Государственная программа инновационного развития Республики Беларусь 2011–2015 гг.; Национальная программа развития экспорта Республики Беларусь 2011–2015 гг.; Государственная программа развития рейтинга человеческого потенциала Республики Беларусь 2011–2015 гг.; Программа развития санитарно-эпидемиологического нормирования в Республике Беларусь 2011–2012 гг.

С 2011 г. сформирована новая ГНТП «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» (2011–2015 гг.), головной организацией-исполнителем которой является РНПЦЭМ.

**Цель программы:** развитие отечественной инновационной нанотехнологии для создания эффективных средств специфической профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекционных заболеваний; повышение эффективности эпидемиологического надзора за инфекциями; максимальное обеспечение потребности лечебно-профилактических учреждений в диагностических препаратах.

Всего в рамках ГНТП «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» выполнялось 43 задания, из них 35 — сотрудниками центра и 8 — сторонними организациями. В ходе выполнения заданий программы проводится и совершенствуется молекулярно-эпидемиологический мониторинг широко распространенных острых респираторных, кишечных вирусных инфекций, ВИЧ/СПИД, гепатита С, вакциноуправляемых заболеваний и др. Выделены изоляты и штаммы вирусов и бактерий, патогенных для человека, выполняются молекулярно-генетические исследования. Проводится разработка технологий новых диагностических препаратов и др.

С целью совершенствования научно-практической и инновационной деятельности, в 2012 г. в центре проведена реорганизация научно-исследовательских подразделений: упразднены отделы, структурные подразделения преобразованы в 11 самостоятельных лабораторий: клинической и экспериментальной микробиологии; вакциноуправляемых инфекций; диагностики сочетанных бактериально-вирусных инфекций; гриппа и гриппоподобных заболеваний; диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций; инфекций с природным резервуаром; биотехнологии культур клеток; доклинического изучения специфической активности ингибиторов вирусов; биотехнологии и иммунодиагностики особо опасных инфекций; биобезопасности с коллекцией патогенных микроорганизмов; научно-инновационная лаборатория, клиничко-диагностическая лаборатория; группа экологии и эпидемиологии арбовирусных инфекций. В центре работают высококвалифицированные специалисты, из них: 15 докторов наук, 35 кандидатов наук, один член-корреспондент НАН Беларуси, один заслуженный деятель науки.

В 2012 г. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии прошел аккредитацию в Государственном комитете по науке и технологиям Республики Беларусь и Национальной академии наук Беларуси в качестве научной организации (свидетельство об аккредитации от 06.03.2012 № 117).

РНПЦЭМ имеет современную научно-исследовательскую и материально-техническую базу (новый уникальный лабораторный корпус, соответствующий высокому классу биологической безопасности (P3-P4) и международным стандартам GLP и GMP), оснащен современным медицинским и лабораторным оборудованием. Это позволяет осуществлять комплексные научные исследования, обеспечивать качественное выполнение научных исследований и разработок, готовить научных работников высшей квалификации. Материально-техническая база лабораторий центра ежегодно обновляется и пополняется. Так, в 2011 г. приобретено оборудование на общую сумму 852 012,0 тыс. руб., из них за собственные средства — на 156900,8 тыс.руб., по линии гуманитарной помощи ВОЗ — на 695 111,2 тыс.руб.

В РНПЦЭМ успешно функционируют референс-центры: Национальный центр по гриппу (НЦГ); Национальный референс-центр по полиомиелиту; Референс-центр мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов; Республиканская референс-лаборатория по диагностике кори и краснухи; Региональная лаборатория по ротавирусной инфекции. Они осуществляют научно-методическое руководство выполнением на территории Беларуси программ эпидемиологического надзора за соответствующими инфекциями, являются национальными корреспондентами ВОЗ, работают в тесном сотрудничестве с региональными центрами ВОЗ (обмен информацией, биологическими материалами, стажировки аспирантов, подготовка совместных документов и т.д. В своей деятельности национальные референс-центры подотчетны Министерству здравоохранения Республики Беларусь и Европейскому региональному бюро (ЕРБ) ВОЗ и предоставляют в установленном порядке отчеты о результатах проведенных исследований, обзоры по эпидситуации, заключения о выполнении программ эпидемиологического надзора в республике и др.

В 2012 г. приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 14.05.2012 № 546 на базе лаборатории диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций создана Республиканская референс-лаборатория генодиагностики ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов В и С, по определению генотипов/субтипов и резистентности к противовирусным препаратам ВИЧ, гепатитов В и С.

Успешно продолжает работу НЦГ, сотрудничающий с ЕРБ ВОЗ в рамках Глобальной сети наблюдения за гриппом: еженедельно в эпидемический сезон по гриппу вводит результаты мониторинга в базу данных ВОЗ; принимает участие в программе ВОЗ по Внешнему контролю качества исследований; сотрудничает с центром ВОЗ в Лондоне

по изучению эпидемических штаммов вирусов гриппа: депонировано 18 эпидемических штаммов вирусов гриппа, где подтверждена их типовая принадлежность. Центр постоянно отслеживает информацию о состоянии эпидемической ситуации по гриппу в мире и Беларуси, а также заболеваемости и смертности от гриппа в мире. В эпидсезон информация по гриппу еженедельно размещается на сайте центра — <http://www.belriem.by>.

В НЦГ изучен опыт европейских стран по эпидемиологическому надзору за гриппом. Система дозорного надзора апробирована в стране и включена в СанПин «Требования к проведению эпидемиологического надзора за острыми респираторными инфекциями в Республике Беларусь». На базе НЦГ проведен мониторинг вирусов гриппа, циркулировавших на территории Республики Беларусь в эпидемический сезон 2010–2011 гг., включающий молекулярно-биологическое исследование клинического материала от 1440 больных с респираторной симптоматикой и тяжелыми пневмониями, закончившимися летальным исходом. За 10 недель эпидемии в НЦГ поступило 550 клинических и секционных образцов. В 118 образцах была выявлена РНК вирусов гриппа А и В. Частота выявления вирусов гриппа в период эпидемии в анализируемых образцах составляла 21,9%. Среди положительных образцов преобладали вирусы гриппа А, аналогичные пандемическим вирусам гриппа А/California/7/2009(H1N1) (83 случая, 70,3%) и 35 случаев, ассоциированных с вирусом гриппа В (29,7%). Выделено 39 изолятов: 24 изолята вирусов гриппа А и 15 изолятов вирусов гриппа В. В специализированную коллекцию вирусов и бактерий, патогенных для человека, НЦГ депонированы 12 эпидемических штаммов вирусов гриппа А и 6 штаммов вирусов гриппа В. Определена чувствительность изолятов вирусов гриппа А к озелтамивиру [4].

Изучена этиологическая структура постгриппозных пневмоний бактериальной природы, резистентность и вирулентность доминирующих в Беларуси возбудителей. Проведен анализ клинического материала, выделенного от 1273 пациентов с диагнозом постгриппозная пневмония. Исследовано 233 образца аутопсийных материалов, забранных от пациентов, умерших от постгриппозных пневмоний. Основными возбудителями фатальной постгриппозной пневмонии на фоне подтвержденного гриппа А/California/7/2009(H1N1) являлись бактерии *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii* в 39,4% и *Enterococcus faecium* — 22,6% с 100% уровнем резистентности. Создана коллекция клинических изолятов бактерий — возбудителей постгриппозных пневмоний (130 штаммов). Проводится постоянное информирование Минздрава об этиологии возбудителей пневмоний. Подготовлена Инструкция о лабораторной диагностике бактериальных постгриппозных пневмоний. Разрабатывается диагностический набор для типирования вирусов гриппа методом РТГА, набор для дифференциальной диагностики ОРВИ на основе метода ПЦР. Впервые в республике будет разработан комплекс препаратов для лабораторной диагностики ОРВИ: парагриппа 1–3 типов, адено- и респираторно-синцитиального (РС).

Разработаны и подготовлены: приказ Минздрава Республики Беларусь от 06.09.2011 № 866 «Об оптимизации проведения эпидемиологического надзора за острыми респираторными инфекциями; информационная справка «Заключение об эпидемии гриппа 2010/11 гг.» от 24.06.2011 № 10-2/1275.

Проводилась проверка качества лабораторных исследований в базовых лабораториях НЦГ методом ПЦР. Оценена готовность микробиологических лабораторий к диагностике гриппа в эпидемический сезон 2010/2011 гг. Еженедельно для Минздрава центр представляет аналитические справки по гриппу.

На базе лаборатории вакциноуправляемых инфекций успешно функционируют Национальный референс-центр по полиомиелиту, Республиканская референс-лаборатория по кори и краснухе, референс-лаборатория по дифтерии, региональная лаборатория ЕРБ ВОЗ по ротавирусной инфекции, аккредитованные комиссией экспертов ВОЗ.

В рамках выполнения программы по поддержанию статуса Беларуси как страны, свободной от полиомиелита, во всех регионах страны проводится надзор за заболеваниями с синдромом острого вялого паралича (ОВП) у детей до 15 лет и мониторинг циркуляции полиовирусов. В 2011 г. на базе референс-центра проведено вирусологическое обследование 47 детей с синдромом ОВП. С целью выделения вируса исследовано 94 образца стула с использованием перевиваемых культур клеток: L20В, RD, HEp2С. Изолятов полиовирусов или других энтеровирусов от больных с синдромом ОВП выделено не было, что свидетельствует об отсутствии этиологической связи паралича с полиовирусной инфекцией [5].

Проведено исследование популяционного иммунитета к вирусу полиомиелита. Уровень популяционного иммунитета к полиовирусам 1, 2 и 3 составил 97,8, 97,5 и 88,6%, соответственно и являлся достаточно высоким, превышающим пороговый уровень (80–85%), во всех регионах страны. Сравнение полученных результатов с данными 2000 г. подтверждает, что переход на комбинированную схему вакцинации (3 дозы инактивированной вакцины, далее 3 дозы живой оральной вакцины) положительно отразился на уровне популяционного иммунитета. В целях дальнейшего укрепления поствакцинального иммунитета целесообразно полностью перейти на использование инактивированной вакцины. О результатах молекулярного мониторинга циркуляции полиовирусов еженедельно сообщается в ЕРБ ВОЗ, а также на сайте центра — <http://www.belriem.by>. По приглашению ЕРБ ВОЗ руководитель референс-центра д-р мед. наук Е.О. Самойлович как эксперт регулярно работает в комиссии по оказанию консультативной помощи национальным лабораториям по полиомиелиту, кори и краснухе, дифтерии.

Успешно выполняется разработанная ЕРБ ВОЗ программа элиминации кори и краснухи. Установлено прекращение эндемичной циркуляции вируса кори на территории страны. На основании эпидемиологических данных и генетической характеристики вируса доказано, что начиная с 2003 г. регистрируемые в стране случаи кори являются преимущественно завозными или связанными с завозными. В 2004 г. зафиксирован завоз вируса кори из Армении (генотип вируса D6, вариант Турция), в 2006 г. — множественные завозы из Украины (генотип D6, вариант Украина), в 2007 г. — из Таиланда (генотип вируса D5), 2010 — из Индии (генотип D8), 2011 — из Германии (генотипы D4 и D8).

Установлен высокий уровень генетического многообразия вирусов краснухи, циркулировавших в стране в 2004–2006 гг. Обоснована необходимость внесения изменений в Международную классификацию диких вирусов краснухи 2004 г. — выделение двух новых генотипов (1h и 1i) и изменение статуса предварительного генотипа 1g на действующий (что учтено в экспертной комиссии ВОЗ при утверждении новой классификации 2007 г.). Два выделенных в Республике Беларусь вируса краснухи определены в качестве референс-штаммов: генотипа 1G — RVi/Minsk.BLR/29.04/1, генотипа 1h — RVi/Minsk.BLR/28.05/2. Доказано существование в Республике Беларусь в 2004–2006 гг. эндемичной циркуляции вирусов краснухи генотипов 1E, 1G, 1h.

На основании результатов лабораторной диагностики краснухи и мониторинга циркуляции возбудителя обоснована целесообразность дополнительных мероприятий по иммунизации против краснухи. Проведенные мероприятия (в 2005–2006 гг. привито 1022247 человек) способствовали снижению заболеваемости краснухой в 2007–2010 гг. до уровня менее 1 случая на 1 млн населения и предотвращению развития случаев СВК.

С целью совершенствования системы эпиднадзора за коклюшем разработан молекулярный метод диагностики на основе ПЦР в режиме реального времени, позволяющий выявлять и дифференцировать ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. Bronchiseptica*. Продолжалась работа по осуществлению молекулярно-эпидемиологического мониторинга за дифтерийной инфекцией. В 2011 г. в стране не было зарегистрировано ни одного случая дифтерии. Такие результаты достигнуты благодаря высокому охвату иммунизацией

декретированных контингентов детского и взрослого населения страны в установленные Национальным календарем сроки и успешно проведенным кампаниям массовой иммунизации в 1996 г. и дополнительной иммунизации взрослых в 2005–2006 гг.

В настоящее время в условиях элиминации кори и краснухи существенную роль как этиологический агент острых экзантем начинает играть парвовирус. В связи с этим требуется обязательное лабораторное обследование на данную инфекцию пациентов с сыпью и температурой. В республике отсутствуют тест-системы для выявления парвовируса и диагностика проводится недостаточно. В настоящее время разрабатывается ПЦР-тест-система для выявления парвовируса В19 в клиническом материале, что позволит совершенствовать молекулярно-эпидемиологический надзор за инфекцией.

Успешно продолжала работу региональная референс-лаборатория по ротавирусной инфекции, обслуживающая 6 стран СНГ. Основные функции субрегиональной лаборатории: координация деятельности национальных лабораторий, входящих в состав лабораторной сети по ротавирусам (лаборатории Армении, Азербайджана, Грузии, Молдовы, Таджикистана и Украины), проведение внешней оценки качества работы национальных лабораторий по результатам повторного проверочного тестирования клинического материала; генотипирование ротавирусов, циркулирующих в странах субрегиона; регулярная отчетность перед ЕРБ ВОЗ о проведенной работе. В 2011 г. проведено исследование клинического материала (1254 пробы стула), собранного в рамках дозорного надзора в Азербайджане, Армении, Грузии, Молдове, Таджикистане, Украине. Выполнено ретестирование ИФА образцов стула, исследованных в национальных лабораториях стран, входящих в субрегиональную лабораторную сеть. Проведено генотипирование 1075 ротавирусов из стран субрегиона. Доминирующими генотипами в субрегионе являлись G1P (31%) и G4P (25%). Доля редко встречающихся генотипов не превышала 8%.

На базе лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии успешно работает референс-центр мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов. Референс-центр является национальным корреспондентом ВОЗ, Межгосударственного Координационного совета по проблемам внутрибольничных инфекций, мониторингу антибиотикорезистентности микроорганизмов.

В 2011 г. референс-центр продолжал проводить динамический анализ данных деятельности учреждений здравоохранения по борьбе с полирезистентными штаммами микроорганизмов. Проведено анкетирование 217 опорных баз учреждений здравоохранения во всех регионах республики. Получено и обработано 144 ответа, верифицирована множественная устойчивость к антимикробным препаратам более чем у 800 изолятов. Изучены молекулярно-биологические свойства возбудителей: уровни и спектры антибиотикорезистентности, факторы патогенности, молекулярно-генетические характеристики. Выявлено наличие генов резистентности у *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*. Дана оценка динамики роста резистентности микроорганизмов. Переработана и актуализирована анкета «Мероприятия по мониторингу резистентных микроорганизмов и рациональному применению антибиотиков». Подготовлен проект инструкции «Основные принципы организации и проведения мониторинга резистентности клинически значимых бактерий к антибиотикам и потребления антимикробных препаратов в учреждениях здравоохранения Республики Беларусь».

В 2012 г. на базе центра проведен Республиканский семинар «Формирование системы мониторинга резистентности клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам в организациях здравоохранения».

Особое внимание уделялось проблеме природно-очаговых и особо опасных инфекций. В центре проводится поиск, выделение и многолетнее мониторирующее арбовирусных

инфекций, вызываемых вирусами клещевого энцефалита (КЭ), лихорадки Западного Нила (ЗН), Тягиня, Укуниема, Батаи, Калифорнийского энцефалита и др. на территории Республики Беларусь. Полученные данные позволили научно обосновать гипотезу о закономерностях циркуляции арбовирусов с клещевой и комариной трансмиссией на территории нашей страны и за ее пределами. В последние годы проводятся молекулярно-генетические исследования выделенного биологического материала, а также разработка и производство экспериментальных серий тест-систем для диагностики КЭ, лихорадки ЗН.

В настоящее время выполняется ряд заданий НИР в рамках ГНТП «Инфекции и микробиологические нанотехнологии», ОНТП «Здоровье и окружающая среда», ФФИ, Постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 01.09.2011 № 55 «Об эпидемиологическом мониторинге за клещевыми инфекциями».

Разрабатывается иммуноферментная тест-система для выявления антигена вируса ЗН в переносчиках и клиническом материале. Проводится оценка напряженности природных очагов клещевых и комариных инфекций арбовирусной этиологии на территории Республики Беларусь с разработкой комплекса профилактических мероприятий.

От кровососущих членистоногих, собранных в природных очагах Республики Беларусь, выделено 5 штаммов вируса ЗН и 2 изолята возбудителей болезни Лайма. Проведена их идентификация. Изучаются молекулярно-генетические свойства штаммов вируса ЗН, циркулирующих на территории республики. От больных людей из всех областей Беларуси с различными недифференцированными лихорадочными заболеваниями получены сыворотки крови. Проведенные серологические исследования методом ИФА позволили выявить антитела в сыворотках крови пациентов к вирусам клещевого энцефалита и ЗН. Проведен анализ степени напряженности выявленных природных очагов арбовирусных инфекций в Беларуси и составлена карта-схема их ранжирования. Показано, что высокоактивные природные очаги КЭ и ЗН выявлены в Гродненской, Брестской, Могилевской и Минской областях. На территории Гомельской области зарегистрированы высокоактивные природные очаги ЗН.

Особое внимание уделялось проблеме Лайм-боррелиоза (ЛБ). Исследовали пробы клинического материала от больных, поступивших из ЦГЭиОЗ и лечебно-профилактических учреждений республики. Всего за 2011 г. — 8 мес. 2012 г. исследовано 1279 проб сывороток крови на наличие антител к возбудителю болезни Лайма, в 56,6% проб обнаружены антитела к возбудителю. Также было исследовано 452 экз. иксодовых клещей, напивавшихся на людях, 41,5% клещей оказались зараженными. Эти данные свидетельствуют о напряженной эпидситуации в стране по Лайм-боррелиозу.

Впервые в республике будут разработаны критерии клинико-лабораторной диагностики клещевых микст-инфекций, которые обеспечат возможность дифференциальной диагностики возбудителей патогенных для человека трансмиссивных бактериальных инфекций, определяют пути хронизации процесса при клещевых микст-инфекциях.

Выполнены исследования по разработке молекулярно-биологических способов диагностики особо опасных вирусных геморрагических лихорадок. На основе сконструированных плазмид получены рекомбинантные полипептиды вирусов ККГЛ, ГЛПС, ЛХМ, Ласса, Марбург, Эбола и созданы иммуноферментные тест-системы для идентификации особо опасных вирусов методом ТФИФА, а также опасных вирусов ГЛПС, ЛХМ, ККГЛ методом дот-блот иммуноанализа.

Большое внимание в центре уделяется инфекциям, передающимся половым путем. В настоящее время в стране складывается ситуация, требующая незамедлительных мер, направленных на совершенствование системы диагностики, профилактики и лечения ВИЧ-инфекции. На 01.09. 2012 г. в Беларуси зарегистрировано 13819 случаев ВИЧ-инфекции (показатель на 100 тыс. населения составил 114,7). Ежегодно в стране выявляется более 1 тыс. ВИЧ-инфицированных.

В связи с этим, в 2012 г. приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 14.05.2012 № 546 на базе лаборатории диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций создана Республиканская референс-лаборатория генодиагностики ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов В и С по определению генотипов/субтипов и резистентности к противовирусным препаратам ВИЧ, гепатитов В и С. Цель создания лаборатории — совершенствование системы эпидемиологического надзора и генодиагностики ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов В и С, организационно-методическое руководство и оказание консультативной помощи диагностическим лабораториям республики по данным проблемам.

Особенностями эпидпроцесса по ВИЧ/СПИД в Беларуси являются: смена одного механизма инфицирования на другой (парентерального — на половой); выход вируса за пределы групп риска и вовлечение в эпидпроцесс людей, не относящихся к группам рискованного поведения; увеличение количества детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями; преобладание светлогорского варианта субтипа А ВИЧ-1 — до 90%, циркулирующей субтипов В, С и рекомбинантных форм CRF\_AB и CRF\_AG; циркуляция ВИЧ с первичной резистентностью, определение вторичной резистентности высокого уровня у пациентов, получающих антиретровирусное лечение; увеличение числа случаев туберкулеза среди ВИЧ-инфицированных [6].

В рамках выполняемых заданий НИР будет разработана и внедрена в практическое здравоохранение система молекулярно-эпидемиологического мониторинга за ВИЧ/СПИД в стране. Создана контрольная панель сывороток крови ВИЧ-инфицированных, которая позволит протестировать биопробы на наличие маркеров ВИЧ. Собрана коллекция сывороток крови (150 образцов) ВИЧ-инфицированных и больных СПИД, зараженных в течение 2008–2011 гг. Образцы протестированы методом ИФА и иммунного блотинга на наличие маркеров ВИЧ.

Разрабатывается тест-система для определения мутаций резистентности вируса к действию лекарственных средств, что позволит корректировать схемы лечения при назначении антиретровирусной терапии пациентам. Разрабатывается способ получения ингибитора репродукции ВИЧ методом ферментативного гидролиза инфицированных клеток.

Разрабатывается алгоритм молекулярно-эпидемиологического мониторинга папилломавирусов человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска. Проведен первичный скрининг на наличие ВПЧ высокого онкогенного риска в биопробах женщин репродуктивного возраста из разных регионов Беларуси. Среди исследованных проб доминировал ВПЧ-16 (84,3%), выявлялись ВПЧ других типов: 18, 31, 33, 39, 45, 56. Проведено секвенирование и филогенетический анализ образцов, содержащих ВПЧ-16. Показано, что на территории Беларуси доминируют азиатские и европейские варианты ВПЧ-16. В то же время в Гродненской области выявлен ВПЧ-16 с «африканскими» корнями, а в Гомельской области обнаружен новый тип ВПЧ-16.

Разработан алгоритм комплексного лабораторного обследования пациенток с нарушением репродуктивной функции (бесплодие, неразвивающаяся беременность, самопроизвольные выкидыши), что позволяет проводить рациональную этиотропную терапию и приводит к восстановлению репродуктивной функции у 61,3±4,0% женщин в течение 6–9 мес. после окончания лечения.

Разработана схема диагностики врожденного хламидиоза у плодов и новорожденных, что позволяет сократить частоту осложнений, длительность пребывания в стационаре, младенческую смертность и выход на инвалидность детей раннего возраста.

Разработана методика комплексного лабораторного обследования и тактика лечения хронического рецидивирующего уретропростатита, которые приводят к нормализации и улучшению клинических и лабораторных показателей в 94% случаев.

Созданы новые методические подходы определения фенотипической и генотипической устойчивости, выделенных возбудителей (*C. trachomatis*, *T. vaginalis* и др.) к химиопрепаратам, что способствует проведению адекватной терапии и повышает эффективность лечения.

В настоящее время проводится разработка диагностических тест-систем нового поколения с использованием высокочувствительных сенсорных биочипов и нанотехнологий.

Большое внимание уделяется проблеме кишечных инфекций. С 2009 по август 2012 г. на территории Беларуси зарегистрировано 10 эпизодов групповой заболеваемости острыми кишечными инфекциями (ОКИ) вирусной этиологии среди пациентов 7–86 лет. Установлено, что в 70% случаев групповая заболеваемость протекала по типу моноинфекции и была вызвана вирусами одного типа. В 30% случаев имела место смешанная инфекция с участием нескольких вирусных агентов. Установлен неодинаковый вклад различных вирусов в формирование групповой заболеваемости. Среди этиологических агентов доминировали норовирусы II геногруппы (70%). В качестве других возбудителей выступили энтеровирусы (30%), саповирусы (20%), норовирусы I геногруппы (10%).

В центре при содействии специалистов БГМУ, БелМАПО, БГМК, ДИКБ Минска, санитарно-эпидемиологической службы республики разработана современная комплексная система эпидемиологического надзора за ротавирусной инфекцией. Система включает подсистемы популяционного и дозорного эпидемиологического надзора, серологического и молекулярно-эпидемиологического мониторинга. Разработана и утверждена инструкция «О порядке осуществления дозорного эпидемиологического надзора за ротавирусной инфекцией, молекулярно-эпидемиологического и серологического мониторинга».

Проведен молекулярно-эпидемиологический мониторинг циркулирующей популяции ротавирусов. Исследовано 125 изолятов ротавируса, выделенных от детей, госпитализированных в детскую инфекционную клиническую больницу г. Минска в 2011 г. для лечения гастроэнтеритов. Выделенные изоляты ротавирусов имели различные Р и G-типы и их сочетания. Р-тип наиболее часто (111 изолятов или 88,8% проб) представлен вариантом Р. Генотипическая структура изолятов ротавирусов в 2011 г. заметно отличается от структуры изолятов, выделенных в 2008–2010 гг. Так, в 2011 г. по сравнению с предыдущим периодом заметно увеличился удельный вес ротавирусов с генотипом G3P (до 53,6%). Этот вариант возбудителя впервые за последние годы стал доминирующим в структуре популяции, при этом его удельный вес имел выраженную положительную динамику. Компенсаторно снизился удельный вес ротавирусов с бинаминальной формулой G2P (до 8,0%) и G4P (до 24,8%). Считается, что такие изменения типовой структуры популяции ротавирусов являются причиной осложнений эпидемиологической ситуации в отношении ротавирусной инфекции.

В ходе выполнения заданий ГНТП «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» будут разработаны препараты для диагностики ротавирусной инфекции. Тест-система иммунохроматографическая комбинированная с подтверждающим тестом для сочетанной экспресс-диагностики адено- и ротавирусной острых кишечных инфекций позволит проводить специфическую диагностику распространенных рота- и аденовирусных ОКИ в лечебных учреждениях разного уровня и профиля. Тест-система иммуноферментная комбинированная для определения антител классов М, А, G позволит контролировать структуру и напряженность коллективного иммунитета к ротавирусам, оценивать эффективность вакцинации.

Будет разработана тест-система для выявления антигенов энтеровирусов иммуноферментным методом с использованием генно-инженерной технологии. Тест-система не будет иметь зарубежных аналогов и заменит на отечественном рынке ранее разработанный диагностический препарат.

Проводится разработка современной системы молекулярно-эпидемиологического мониторинга за циркулирующими на территории страны возбудителями норовирусной инфекции. Будут изучены генетические характеристики патогенов, филогенетические взаимоотношения и вклад в формирование sporadic и epidemic заболеваемости. Планируется создать тест-систему иммуноферментную для количественного определения антител к вирусу гепатита А.

В связи со вспышкой ОКИ в Европе летом 2011 г. и во исполнение поручения Заместителя Министра — Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 04.06.2011 № 10-27/15-712 «О мониторинге овощной продукции», ввозимой на территорию РБ из стран Европейского Союза, в центре в период с 03.06.2011 г. по 25.08.2011 г. доставлено 94 образца овощной продукции и клинического материала. Все образцы прошли микробиологический анализ (посев на среду обогащения), проведены молекулярно-генетические исследования — мультиплексная ПЦР для выявления токсина энтерогеморрагической *Escherichia coli*, токсин ни в одной из проб обнаружен не был.

Впервые в Беларуси будет разработана тест-система для одновременного выявления пяти наиболее значимых возбудителей кишечных инфекций бактериальной этиологии (*Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica* и др.). Разрабатываются питательные среды и тест-система для идентификации листерий.

Развитие перспективных направлений фундаментальных и прикладных исследований в области диагностики инфекционных заболеваний, создание современных биомедицинских технологий невозможно без широкого применения клеточных культур. В настоящее время на базе центра создается Национальная коллекция и криобанк клеточных культур, основная функция которых — регулярное обеспечение научных и практических учреждений качественным, охарактеризованным, стерильным биологическим материалом, разработка и внедрение новых технологий культивирования клеток, криоконсервации, пополнение фонда новыми линиями клеток, их паспортизация и др.

Одним из главных направлений исследований при создании Коллекции и криобанка эталонных линий человека и животных явилась разработка системы контроля качества имеющихся и постоянно приобретаемых клеточных линий, исходя из опыта работы коллекции типовых культур Института цитологии (г. Санкт-Петербург), Европейской и Американской коллекций.

В рамках выполняемых с 2011 г. заданий ГП «Инновационные биотехнологии», п/п «Медицинские биотехнологии» проводится разработка методов выделения, повышения пролиферативного потенциала и экспрессного наращивания биомассы соматических стволовых клеток взрослого организма в целях регенерации поврежденных органов и тканей.

Разрабатывается технология восстановительной терапии инфаркта миокарда, основанная на трансплантации трансдифференцированных в кардиомиоцитарном направлении мезенхимальных стволовых клеток. Отобраны наиболее современные и доступные в освоении методики репрограммирования клеток в кардиомиоцитарном направлении. Методики адаптированы и модифицированы для существующих условий.

В рамках задания Союзной программы «Стволовые клетки» начата разработка клеточных композиций из обонятельного эпителия и кожи для реконструкции эпителиальных дефектов. Разработаны технологии выделения и культивирования стволовых клеток и их коммитированных предшественников обонятельного эпителия и кожи человека на оптимизированных ростовых средах. Дана морфофункциональная и фенотипическая характеристика культивируемых клеток.

В настоящее время в связи с ухудшающейся экологической обстановкой, возрастающими психоэмоциональными нагрузками на человека, увеличивается распространенность иммунных заболеваний, в т.ч. иммунодефицитов.

В Республике начаты научные исследования по изучению функции дендритных клеток (ДК) и применение их для аутоиммунотерапии хронических инфекций и онкозаболеваний под руководством чл.-кор. НАНБ, д-ра мед. наук, проф. Л.П. Титова. Проведены первые в Беларуси клинические испытания метода иммунотерапии с использованием дендритных клеток. С 2006 г. на базе центра выполнялось 4 задания НИР, целью которых была разработка методов лечения хронических гепатитов, туберкулеза и рака молочной железы дендритными клетками [7, 8].

В УЗ «Городская инфекционная больница» проведены клинические испытания метода терапии хронического гепатита В с использованием дендритных клеток. После аутоиммунотерапии у всех пациентов наблюдалось снижение вирусной нагрузки и уровня АЛТ. У ряда пациентов отмечалось увеличение иммунорегуляторного индекса CD4/CD8, рост содержания ЕК-клеток, что указывает на активацию противовирусного иммунитета. Побочных эффектов не выявлено. Эффективность способа иммунотерапии оценивается как положительная у 100% больных. На основании результатов клинических испытаний разработана инструкция на данный способ иммунотерапии, которая может быть использована для терапии больных хроническим гепатитом В в ЛПУ.

Проведенные в 2009–2010 гг. на базе РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии клинические испытания способа лечения пациентов с мультирезистентным туберкулезом легких при помощи праймированных антигенами микобактерий моноцитарных ДК также показали эффективность такого подхода к иммунотерапии. Сочетание стандартной схемы химиотерапии туберкулеза с применением дендритных клеток способствовало снижению массивности бактериовыделения, положительной рентгенологической динамике. У пациентов после терапии дендритными клетками установлена тенденция нормализации индекса CD4/CD8, показана активация Тх1-иммунного ответа, увеличение пула антигенспецифических Т-лимфоцитов в периферической крови, что указывает на активацию специфического противотуберкулезного иммунного ответа [7].

Следует отметить, что если клинические испытания метода терапии хронического гепатита В, основанного на использовании дендритных клеток, проводили в 2006–2010 гг. в Китае и Японии, то упоминания о методе лечения туберкулеза аутологичными дендритными клетками в международных базах данных отсутствуют. Это дает основания считать, что такой метод терапии обладает мировой новизной.

В настоящее время на базе РНПЦ онкологии и медицинской радиологии (РНПЦОМР) проводятся клинические испытания «Метода противорецидивной аутоиммунотерапии пациентов с первичным агрессивным раком молочной железы с использованием аутологичных дендритных клеток, праймированных опухоле-ассоциированными антигенами», разработанного совместными усилиями сотрудников РНПЦЭМ и РНПЦОМР.

Дисфункции иммунной системы могут проявляться различными формами дерматозов, таких как псориаз и пузырчатка. В центре будет разработана принципиально новая диагностическая тест-система для выявления аутоантител к кератиноцитам у больных псориазом.

Для обеспечения охраны уникальности имеющегося вирусного и бактериального материала на базе центра создана и успешно развивается специализированная коллекция вирусов и бактерий, патогенных для человека. Она содержит оригинальные авторские штаммы, изолированные на протяжении многих лет на территории Республики Беларусь, стран СНГ, некоторых стран Африки. Всего в коллекции хранится 5961 вирус (штаммы — 388; изоляты — 5559; эталонные штаммы — 14), 5516 бактерий (штаммы — 12; изоляты — 5412; эталонные штаммы — 9), 17 рекомбинантных плазмид.

Коллекция осуществляет учет ввозимых в Республику Беларусь, вывозимых из Республики Беларусь и перемещаемых транзитом через ее территорию условно патогенных и патогенных генно-инженерных организмов. В целях обеспечения международной и правовой охраны штаммов вирусов и бактерий, патогенных для человека, специализированной коллекции вирусов и бактерий придан по Будапештскому соглашению статус Международного депозитария для депонирования патогенных микроорганизмов (Указ Президента Республики Беларусь от 15.05.2001 № 262). В настоящее время проводятся необходимые мероприятия по приданию коллекции статуса Национальной специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека и научного объекта, составляющего национальное достояние Республики Беларусь.

Большое внимание в центре уделялось подготовке кадров высшей квалификации. В очной аспирантуре обучается 7 аспирантов, в форме соискательства — 5 соискателей ученой степени кандидата или доктора наук. За полтора года успешно защищено 3 кандидатские диссертации, проведена предварительная экспертиза 5 кандидатских диссертаций. На базе центра под научным руководством ведущих специалистов выполняются 4 докторские и 10 кандидатских диссертаций, 2 магистерские.

Особое внимание уделялось укреплению связи с профильными учреждениями образования. На базе центра студенты БГМУ, БГУ, МГЭУ им. А.Д. Сахарова выполняли 20 курсовых и 5 дипломных работ, более 30 проходили производственную практику. Проведено более 50 практических занятий по курсу микробиологии, вирусологии и иммунологии для студентов медико-профилактического, лечебного, педиатрического и военного факультетов БГМУ.

Специалисты центра регулярно проходят курсы повышения квалификации, а также стажировки на рабочих местах в ведущих зарубежных и республиканских центрах по проблемам инфекционной патологии человека. Так, за последние полтора года выполнено более 100 научных командировок, из них: 77 — в страны ближнего и дальнего зарубежья (Россия, Украина, Латвия, Польша, Испания, Швеция, Великобритания, Швейцария, Словения, Китай, Италия, Дания, Турция) и 26 — в Республике Беларусь. Сотрудники центра, участвуя в работе международных научных конференций в ведущих зарубежных центрах, выступили с 64 докладами, в Беларуси — с 20.

#### ***Разработка и производство диагностических иммунобиологических препаратов.***

Одним из приоритетных направлений в работе центра является инновационная деятельность. Выполняется план освоения и внедрения научно-технической продукции, созданной в рамках ГНТП «Инфекционные заболевания и микробиологические биотехнологии» (2006–2010 гг.). План включает 65 единиц научно-технической продукции. Это диагностические препараты (тест-системы, питательные среды) — всего 36, а также новые методы диагностики, профилактики и лечения, протоколы ведения и лечения больных с инфекционной патологией — 29 единиц. Получено разрешение на серийный выпуск 19 тест-систем. Получено разрешение на применение 11 новых методов. По результатам выполнения научных заданий НИР 2010 г. подготовлено и утверждено в Министерстве здравоохранения Республики Беларусь 13 инструкций на методы диагностики и способы лечения инфекционных заболеваний, разработана нормативно-техническая документация на 19 тест-систем.

В 2011 г. завершился этап освоения производства диагностических препаратов, разработанных в 2008 г. Планируемый результат данного этапа — возможность обеспечения потребности лечебно-профилактических учреждений республики в отечественных диагностических препаратах в среднем до 70%, а по некоторым позициям до 100% и соответственно импортозамещение аналогичных видов продукции.

С 2011 г. совместно с государственным учреждением СП ООО «Фармлэнд» центр выполняет задание «Доработать технологию промышленного производства и методики контроля качества, освоить промышленный выпуск на СП ООО «Фармлэнд» противовирусных лекарственных препаратов на основе лак-тоиммуноглобулина коров» (ГНТП «Новые лекарственные средства», п/п «Фармацевтические субстанции и лекарственные средства»). В 2013 г. будет налажено промышленное производство нового лечебно-профилактического средства — лактоиммуноглобулина противоротавирусного на основе молозива коров, применение которого позволит снизить уровень заболеваемости ротавирусной инфекцией и сократить продолжительность лечения.

Продолжалась работа по внедрению результатов НИР в систему контроля водных объектов и пищевых продуктов в отношении контаминации их вирусными агентами. Практическому здравоохранению регулярно поставлялись и поставляются наборы для сбора

и концентрирования вирусов из вод разного вида пользования, концентратор гидробиологический для обнаружения возбудителей паразитарных болезней в окружающей среде, тест-системы для диагностики энтеро-, ротавирусных инфекций, гепатита А. Разработанная схема санитарно-вирусологического контроля пищевых продуктов и оценка их эпидемиологической безопасности внедрена в практику работы региональных лабораторий.

Продукция, разработанная в центре, востребована лечебно-профилактическими и санитарно-эпидемиологическими учреждениями Минздрава Республики Беларусь. Ряд разработок центра уникальны, производятся только в нашей стране и находят спрос в других странах.

По результатам исследований, выполненных в центре, в республике промышленно производятся новые противовирусные препараты «Мазь бутаминофеновая», «Нуклеавир», «Фитогор». Разработан и готовится к серийному производству комбинированный противогерпетический препарат. Разрабатываются новые способы лечения вирусных инфекций с использованием официальных препаратов, у которых впервые установлены противовирусные свойства. В частности, имодиум рекомендован для этиопатогенетической терапии ротавирусной инфекции, проводимой на фоне базисного лечения, а «Метронидазол» — для комбинированной терапии герпетических энцефалитов. В результате комбинированного использования метронидазола и ацикловира в республике ликвидирована смертность, вызванная герпетическими энцефалитами.

С 2012 г. в центре наблюдается резкое увеличение объемов выпуска разработанной диагностической продукции. Так, если за весь 2011 г. было реализовано продукции на общую сумму 840,145 млн руб., то уже за 8 мес. 2012 г. объем продаж возрос более, чем в 2 раза и составил 1 млрд 867 млн. руб.

Наиболее востребованной диагностической продукцией были наборы для сбора и концентрирования вирусов из вод различного вида пользования, тест-системы для выявления антител к вирусу гепатита С, гепатита А, антигенов рота-, энтеровирусов, наборы для обнаружения возбудителей кишечных паразитарных болезней, тест-системы для диагностики ОРВИ и гриппа, природно-очаговых инфекций (Лайм-боррелиоз, КЭ, ЗН, лептоспироз), наборы для концентрирования вирусов из расфасованных вод и экстрактов пищевых продуктов, культуры клеток (FL, MDSK, RPMI-1640), питательные и ростовые среды.

Разработанная в центре диагностическая продукция экспонировалась на 7 выставках: 18-й Международной выставке «Здравоохранение–2011», 19-й Международной выставке «Медицина и Здравоохранение–2011», выставке, приуроченной к проведению Белорусского промышленного форума (17–20 мая 2011 г.), выставке в рамках Международной научно-практической конференции «Инновационные технологии в странах ЕврАзЭС» (27–28 октября 2011 г.), выставке «Инновационная неделя» (15–18 ноября 2011 г.) в Национальной библиотеке Беларуси, Международной выставке «Здравоохранение–2012» (27–30 марта 2012 г.).

**Контроль качества иммунобиологических препаратов.** Созданная в 2009 г. лаборатория по контролю качества иммунобиологических средств не допускает поступления на внутренний рынок Республики Беларусь некачественных вакцин и других иммунобиологических лекарственных средств (ИЛС). Лаборатория прошла экспертизу со стороны Национального органа по аккредитации — Белорусский государственный центр аккредитации (БГЦА) и подтвердила статус аккредитации в системе аккредитации Республики Беларусь на соответствие требованиям СТБ ИСО/МЭК 17025 (аттестат № ВУ/112.02.1.0.0250), а также ежегодный инспекционный надзор (внешний аудит) со стороны БГЦА. Расширена область аккредитации лаборатории в составе лабораторной службы РНПЦ эпидемиологии и микробиологии на 5 дополнительных методик. В течение 2011–2012 гг. лаборатория выполняла посерийный контроль качества зарегистрированных в Республике Беларусь ИЛС до поступления в реализацию и испытания вакцин и других ИЛС при их регистрации на территории

Беларуси. Так, в 2011 г. проведена проверка качества 1869 ИЛС отечественного и зарубежного производства (Россия, Германия, Франция, Нидерланды, Китай) по отдельным показателям на соответствие требованиям нормативного документа производителя, в т.ч. более 120 отдельных серий вакцин (АКДС-вакцины, антирабические, бруцеллезные, брюшнотифозные, вакцины против кори, паротита, краснухи, гепатитные, герпетические, гриппозные, туберкулезные, туляремиальные и др.) на общую сумму 351,6 млн бел. руб. Проведены испытания 17 иммунобиологических препаратов с целью их регистрации на территории Республики Беларусь, на общую сумму 5974,6 долларов США, 4 112,85 евро и 67,325 тыс. российских рублей.

**Платные медицинские услуги.** Успешно продолжал работу центр по оказанию платных медицинских услуг по диагностике инфекционных заболеваний, расширялся их спектр, увеличивались объемы. Платные медицинские услуги проводились высококвалифицированными специалистами в аккредитованных лабораториях на современном оборудовании. Всего населению, государственным и негосударственным медицинским центрам в 2011 г. оказано услуг на сумму 432,2 млн руб., а за 8 мес. 2012 — 646,240 тыс руб. Экспорт услуг в 2011 г. составлял 233,5 млн руб., а за 8 мес. 2012 г. — 580,305 тыс руб.

**Изобретательская деятельность.** В 2011 г. из Национального центра интеллектуальной собственности получено 15 положительных решений на изобретения, подано 2 заявки на изобретения, получено 6 охранных грамот на патенты и свидетельство на рацпредложение. В силе поддерживается 16 патентов на изобретения и свидетельство на товарный знак центра.

**Издательская деятельность.** В 2011 г. РНПЦЭМ подготовлены и изданы 2 монографии, 4 учебно-методических пособия, около 400 публикаций. Издан 4-й вып. сборника научных трудов «Современные проблемы инфекционной патологии человека», тематические выпуски журнала «Здравоохранение» (№№ 10–11). В связи с развитием информационных технологий значительная часть публикаций представлена в электронном виде в информационных ресурсах интернета.

**Обучающие семинары.** На базе центра проведены: научно-практический обучающий семинар для специалистов Молдовы и Украины на тему «Санитарно-вирусологический контроль водных объектов и оценка их эпидемиологической безопасности»; Республиканский научно-практический семинар «Формирование системы мониторинга резистентности клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам в организациях здравоохранения»; Республиканский семинар «Актуальные вопросы диагностики и профилактики инфекционных заболеваний: подготовка к верификации элиминации кори и краснухи в Республике Беларусь, современные аспекты эпидемиологического надзора за вакциноуправляемыми инфекциями» (совместно с РЦГЭиОЗ). В работе семинаров принимало участие более 100 специалистов санитарно-эпидемиологической службы и клиницисты инфекционных и областных больниц всех областей республики. В августе 2012 г. центр с визитом посетила группа международных экспертов ВОЗ по надзору за инвазивными бактериальными заболеваниями в Республике Беларусь.

**Международное сотрудничество.** Центр поддерживает и развивает международное сотрудничество с ЕРБ ВОЗ, ее центрами, зарубежными коллегами по проблемам, имеющим глобальное значение для мирового сообщества: ВИЧ-инфекция, пандемический грипп и грипп птиц, проблема ликвидации полиомиелита, резистентность микроорганизмов к антибиотикам и др.

РНПЦЭМ участвует в выполнении следующих международных программ: Европейская система эпиднадзора за гриппом ЕБР ВОЗ (EuroFlu); Международная программа глобальной эрадикации полиомиелита; Международная программа элиминации кори и краснухи в Европейском регионе; Европейская лабораторная рабочая группа (ELWGD) и сеть

эпиднадзора за дифтерией в Европе (DIPNET); Межгосударственный координационный Совет СНГ по проблемам внутрибольничных инфекций, мониторингу антибиотикорезистентности микроорганизмов и устойчивости к дезинфектантам; Межгосударственная программа ЕврАзЭС «Здоровье народов ЕврАзЭС» (2007–2010). Продолжалась работа в качестве партнера Глобальной сети оповещения о вспышках болезней и ответных действий ВОЗ (WHO Global Outbreak Communications Network).

Поддерживается сотрудничество с научными центрами Франции (Институт Пастера в Париже), Германии (Институт микробиологии в Майнце, Институт микробиологии в Мюнхене), Англии (Центральная баклаборатория в Лондоне) и другими ведущими центрами Европейского региона.

Научное сотрудничество связывает центр с Калифорнийским университетом (США) по вопросам анаэробных инфекций, СПИДа, а также с исследовательским институтом иммунологии Новой Англии (Бостон, США), в области современных проблем иммунологии и аллергологии. Подготовлен план совместного проекта с кафедрой акушерства и гинекологии медицинского университета, Хельсинки, Финляндия. Налаживаются контакты с директором Института медицинской микробиологии и иммунологии, профессором Gunna Christiansen (г. Архус, Дания).

Центр является одним из инициаторов создания программы МЦП ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» п/п «Инновационные биотехнологии в Республике Беларусь». Участвует в выполнении 6 заданий НИР (2011–2015 гг.): «Создать и пополнить национальную коллекцию микроорганизмов, патогенных для человека, паспортизовать штаммы для исследований в области вирусологии, бактериологии и других областей биологии и медицины в странах ЕврАзЭС»; «Создать коллекцию и криобанк паспортизованных эталонных линий культур клеток человека и животных для диагностики и контроля за инфекциями в Республике Беларусь»; «Разработать ИФА тест-систему для диагностики РС-инфекции»; «Разработать подтверждающий лиа-тест (биочипы) для карантинной группы вирусных инфекций»; «Разработать и внедрить препарат для экспресс-индикации вирусных патогенов в объектах питьевого водоснабжения»; «Разработать технологию получения бактериального пробиотического препарата на основе кислотоустойчивых штаммов бифидо- и молочнокислых бактерий для получения ферментированных молочных продуктов». Зарубежными партнерами по реализации программы являются коллеги профильных учреждений России и Казахстана.

Сотрудники центра постоянно принимают участие и выступают с научными докладами на зарубежных конференциях, а также проходят научные стажировки в ведущих профильных научных центрах ближнего и дальнего зарубежья. В свою очередь, на базе центра проходят стажировку на рабочих местах и выполняют экспериментальные исследования иностранные аспиранты и научные сотрудники.

В целом, научно-исследовательская, инновационная, научно-методическая и координационная деятельность центра, как ведущего научно-практического учреждения страны по контролю инфекционных заболеваний, направлена на поддержание устойчивого санитарно-эпидемического благополучия в нашей стране, защиту населения и санитарную охрану ее территории с обеспечением необходимого уровня биобезопасности как составного элемента национальной безопасности Республики Беларусь.

#### ***Направления деятельности и задачи центра на 2013 г.:***

– опережающее развитие научных исследований в области эпидемиологии, бактериологии, вирусологии, паразитологии и иммунологии на основе молекулярно-биологических, генно-инженерных и биотехнологических подходов;

–обеспечение и совершенствование эпидемиологического надзора по направлению молекулярно-биологического мониторинга за наиболее актуальными и значимыми для республики инфекционными заболеваниями;

- укрепление материально-технической базы центра, повышение возможностей для быстрой и эффективной диагностики инфекционных заболеваний как составного элемента санитарной охраны территории и населения страны;
- разработка и внедрение в практическое здравоохранение современных методов и средств диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекционных заболеваний;
- совершенствование структуры санитарно-эпидемиологической службы, форм взаимодействия РНПЦ и практических центров, научно-методической и учебной деятельности по проблеме контроля инфекционных заболеваний.
- развитие международного сотрудничества, координация и кооперация усилий на уровне Союза Россия-Беларусь, Таможенного Союза, ЕврАзЭС, и мира в целом по проблеме контроля инфекционных заболеваний.

#### **Литература**

1. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Беларусь в 2011 году: гос. доклад. – Минск, 2012.
2. Брико, Н.И. Инфекционные заболевания и глобализация / Н.И. Брико // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. – Минск, 2010. – Вып. 3. – С. 11-16.
3. Жарко, В.И. Об итогах работы органов и организаций здравоохранения Республики Беларусь в 2011 году и основных направлениях деятельности на 2012 год / В.И. Жарко // Вопр. организации и информатизации здравоохранения. – 2012. – № 1. – С. 4-17.
4. Шмелева, Н.П. Эпидемия гриппа в Республике Беларусь в первый постпандемический сезон (2010-2011гг) / Н.П. Шмелева, Н.В. Грибкова, Н.В. Сивец // Здравоохранение. – 2011. – № 10. – С. 31-36.
5. Мониторинг выполнения международных программ эрадикации полиомиелита и элиминации кори и краснухи в Республике Беларусь / Е.О. Самойлович [и др.] // Журн. микробиол. – 2012. – № 1. – С. 21-30.
6. Молекулярная эпидемиология ВИЧ/СПИД в Беларуси (2008-2011) / В.Ф. Еремин [и др.]. – Здравоохранение. – 2012. – № 1. – С. 25-34.
7. Иммунофизиологическая и клиническая эффективность иммунотерапии пациентов с мультирезистентным туберкулезом легких нановакциной на основе аутологичных моноцитарных дендритных клеток // Л.П. Титов [и др.] // Здравоохранение. – 2012. – № 1. – С. 53-60.
8. Иммунный статус и противоопухолевый иммунный ответ у пациентов с раком молочной железы // А.Е. Гончаров [и др.] // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. – 2012. – № 2. С. 63-69.

Поступила 24.09.2012

### **ГОСУДАРСТВЕННАЯ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ ПРОГРАММА «ИНФЕКЦИИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ». ИТОГИ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ ЗА 2011–2012 ГГ.**

**Горбунов В.А., Филонюк В.А., Шмелева Н.П., Павлова Н.И., Лапушкина Т.Н.,  
Игнатъев Г.М., Петкевич А.С., Кукареко Т.М., Мелюх У.Л.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

Государственная научно-техническая программа «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» (2011–2015 гг.) направлена на разработку современных средств диагностики инфекций, а также новых методов диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Отражены перспективы выполнения программы, представлены итоги за период 2011–2012 гг.

*ГНТП «Инфекции и микробиологические нанотехнологии», средства диагностики,  
методы профилактики, методы лечения, инфекционные заболевания*

Инфекционные заболевания по-прежнему остаются одной из серьезнейших проблем здравоохранения, возрастает их роль в общей заболеваемости населения. Благодаря успехам медицинской науки выявлена инфекционная природа целого ряда соматических заболеваний. Возникновение новых видов инфекций, возвращение хорошо известных, но измененных в результате мутаций возбудителей, высокие темпы приобретения возбудителями устойчивости к лекарственным и дезинфицирующим препаратам — вот далеко не полный

перечень проблем, требующих неотложного решения. Все это происходит на фоне глобализации экономики и связанного с нею роста масштабов и скорости миграции населения, что многократно повышает риск возникновения эпидемий и пандемий. В современных условиях оправдана необходимость решения широкого круга задач, связанных с разработкой высокочувствительных, быстрых, сравнительно недорогих методов обнаружения и идентификации возбудителей, а так же эффективных средств профилактики и лечения инфекционных заболеваний, основанных на последних достижениях науки и техники.

В последние годы сохраняется высокий уровень эпидемиологического благополучия и управляемости ситуацией по инфекционным и паразитарным заболеваниям, несмотря на ее сложность и напряженность в сопредельных государствах и в мире. Не допущено завоза и распространения в стране энтеропатогенной кишечной палочки (O:104), холеры. Обеспечено выполнение основных показателей качества проведения эпиднадзора в соответствии с рекомендациями ВОЗ за полиомиелитом, корью, краснухой. Не допущено возникновения заболеваний дифтерией, столбняком. Снижена заболеваемость вирусным гепатитом А, В, эпидпаротитом, бактериальной дизентерией, кишечным иерсиниозом, сальмонеллезными инфекциями [1].

Среди основных задач, определенных Республиканским санитарно-эпидемиологическим советом, для санитарно-эпидемиологической службы в целом на 2012 г. следует отметить необходимость опережающего развития научных исследований в области гигиены, эпидемиологии, бактериологии, вирусологии, паразитологии и иммунологии на основе молекулярно-биологических, генно-инженерных и биотехнологических подходов в сочетании с должным лабораторным подтверждением, а также повышение эффективности научной деятельности и решение конкретных задач практического здравоохранения [2, 3].

Для решения данной проблемы разрабатывается Государственная научно-техническая программа «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» (далее Программа). Головной организацией-исполнителем является Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии». Научный руководитель Программы — директор центра Горбунов Владимир Анатольевич. Сроки выполнения — 2011–2015 гг.

Целью Программы является разработка и внедрение в практическое здравоохранение эффективных средств специфической профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекционных и иммунных заболеваний; повышение эффективности эпидемиологического надзора за инфекциями; обеспечение потребности лечебно-профилактических учреждений в диагностических препаратах.

В соответствии с поставленной целью Программы определены ее задачи. Это разработка и внедрение молекулярно-генетических методов в систему мониторинга актуальных для Республики Беларусь инфекций (ОРВИ и грипп, кишечные инфекции, гепатиты, ВИЧ, туберкулез и др.); создание современных отечественных технологий производства новых поколений диагностических, лечебно-профилактических и других иммунобиологических препаратов; разработка и внедрение в практику здравоохранения страны новых средств и методов профилактики и лечения ряда инфекционных и иммунных заболеваний.

В настоящее время в рамках Программы выполняется 45 заданий, из них 37 — РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2 — РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии», 1 — Белорусским государственным медицинским университетом, 2 — Витебским государственным медицинским университетом, 1 — Гомельским государственным медицинским университетом, 1 — Гродненским государственным медицинским университетом, 1 — РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии. В качестве соисполнителей заданий в выполнении программы участвуют государственные научные учреждения Национальной академии наук

Беларуси — Институт химии новых материалов и Институт биоорганической химии, РНПЦ неврологии и нейрохирургии, РНПЦ травматологии и ортопедии, Белорусская медицинская академия последипломного образования, ряд других учреждений.

Научные исследования в рамках Программы выполняются в следующих направлениях: система эпиднадзора за распространенными инфекционными заболеваниями (9 заданий); средства для диагностики вирусных, бактериальных, иммунных заболеваний с использованием новых перспективных биотехнологий (20 заданий); средства профилактики и лечения вирусных, бактериальных, иммунных заболеваний (10 заданий); разработка эффективных средств контроля природно-очаговых, карантинных и особо опасных инфекционных заболеваний (5 заданий); научно-организационное сопровождение программы (1 задание).

Общая характеристика тематик ГНТП «Инфекции и микробиологические нанотехнологии»

**Грипп и другие ОРВИ.** В связи с высокой актуальностью проблемы большое внимание уделяется исследованиям, направленным на создание средств и методов диагностики и профилактики заболеваний, вызванных вирусами респираторной группы. В результате выполнения первого блока заданий (2011–2013 гг.) будут осуществлены работы по созданию следующей научно-технической продукции:

Диагностический набор для типирования вирусов гриппа в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Набор создается с учетом спектра циркулирующих на территории вирусов гриппа и их антигенного родства с эталонными штаммами. Разработка набора позволит предложить практическому здравоохранению отечественный препарат, тем самым обеспечив экономию валютных средств.

Набор для дифференциальной диагностики ОРВИ на основе метода ПЦР создаст возможность дифференциальной диагностики ОРВИ с учетом индикации новых респираторных вирусов: метапневмо- и бокавирусов, а также обеспечит импортозамещение и валютосбережение.

Комплекс препаратов для диагностики ОРВИ разрабатывается с целью обеспечения лабораторий практического здравоохранения набором отечественного производства. Это препараты для серодиагностики ОРВИ, представляющие собой антигены вирусов парагриппа 1–3 типов и респираторно-синцитиального (РС) вируса. Антигены будут использоваться для постановки РТГА и других серологических реакций. Вторая группа препаратов — специфические сыворотки к вирусам парагриппа 1–3 типов, РС, аденовирусам, предназначенные для идентификации возбудителей ОРВИ в РТГА, для иммуноферментного анализа, непрямого метода флуоресцирующих антител, реакции нейтрализации.

Впервые в республике с применением молекулярно-биологических методов будет проведен мониторинг возбудителей аденовирусных инфекций, определены гено- и серотипы циркулирующих возбудителей. Будет разработан метод молекулярной диагностики аденовирусной инфекции и на его основе создана тест-система для выявления вируса методом ПЦР.

Проводятся исследования иммунологической эффективности противогриппозных вакцин, применяемых для иммунизации в Беларуси. На основании их результатов будет разработан алгоритм оценки постинфекционного и поствакцинального противогриппозного иммунитета и подготовлена инструкция по применению «Оптимизация схемы иммунизации против гриппа». Разработка позволит повысить эффективность иммунопрофилактики в стране, снизить заболеваемость гриппом и частоту осложнений.

**Кишечные инфекции.** Ряд заданий Программы направлен на разработку средств и методов диагностики и профилактики бактериальных и вирусных кишечных инфекций:

С использованием методов генетической инженерии разрабатывается технология получения рекомбинантного полипептида, на основе которого будет создана тест-система

для выявления антигенов энтеровирусов иммуноферментным методом. Тест-система будет обладать высокой чувствительностью и специфичностью, а ее внедрение в практику повысит эффективность лабораторного контроля энтеровирусных инфекций. Тест-система не имеет зарубежных аналогов, разработка ориентирована на экспорт.

Тест-система иммунохроматографическая комбинированная с подтверждающим тестом для сочетанной экспресс-диагностики адено- и ротавирусной острых кишечных инфекций (ОКИ) предназначена для специфической диагностики распространенных ротавирусных и аденовирусных ОКИ в учреждениях здравоохранения любого уровня и профиля. Применение экспресс-метода определения антител классов М, А, G позволит контролировать структуру и напряженность коллективного иммунитета к ротавирусам, оценить эффективность вакцинации, уточнить этиологию ОКИ. В рамках задания проводится молекулярно-эпидемиологический и серологический мониторинг ротавирусной инфекции, а также изучение иммуноструктуры населения к ротавирусам. Последнее позволит наладить эпидемиологический надзор за инфекцией и обеспечить научный подход к вакцинации.

Осуществляется разработка современной системы молекулярно-эпидемиологического мониторинга за циркулирующими на территории республики возбудителями норовирусной инфекции. Будут установлены доминирующие генотипы норовирусов, дана генетическая характеристика, филогенетические взаимоотношения, изучен вклад в формирование sporadic и эпидемической заболеваемости. Внедрение разработок (инструкция по применению «Молекулярно-эпидемиологический мониторинг норовирусной инфекции» и информационная база данных о генотипах норовирусов) в практику санитарно-эпидемиологических служб будет способствовать повышению эффективности лабораторного контроля и эпидемического надзора над возбудителями вирусных ОКИ.

На основании изучения видовой структуры сальмонелл, выделенных от пациентов из пищевых продуктов, и исследования их устойчивости к антибактериальным препаратам разрабатывается метод молекулярно-генетического типирования сальмонелл. Широкое применение метода практическим здравоохранением будет способствовать повышению эффективности лечебных и профилактических мероприятий при сальмонеллезах.

Впервые в республике будет разработана тест-система для одновременного выявления пяти наиболее значимых возбудителей кишечных инфекций бактериальной этиологии (*Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, энтероинвазивной *E.coli*, энтерогеморрагической *E. coli*, энтеропатогенной *E.coli*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium perfringens*). Тест-система позволит ускорить диагностику инфекций неустановленной этиологии, а также будет способствовать усовершенствованию системы эпидемиологического надзора. Высокая чувствительность и специфичность тест-системы повысит качество диагностики ОКИ, значительно снизит продолжительность анализа.

Разрабатываются сухие питательные среды (накопительный бульон, сухая селективная среда) и тест-система для биохимической идентификации листерий. Поступление препаратов на отечественный рынок позволит повысить эффективность диагностики листериозов, обеспечит замещение аналогичной продукции зарубежных производителей.

Проводятся работы с целью усовершенствования системы эпидемиологического надзора за вирусным гепатитом А — разработана и апробирована методика генотипирования вируса гепатита А, алгоритм определения напряженности коллективного иммунитета и оценки результативности вакцинации против этой инфекции. Для осуществления последнего разрабатывается тест-система иммуноферментная для количественного определения антител к вирусу гепатита А.

**Вакциноуправляемые инфекции — полиомиелит, паротит, коклюш.** Несмотря на относительную стабильность ситуации по данной группе инфекций, проводятся работы, направленные на повышение эффективности надзора и сохранение санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

В целях поддержания санитарно-эпидемического благополучия населения страны выполняются разработки по совершенствованию качества диагностики вакциноуправляемых инфекций:

В русле мероприятий по поддержанию статуса страны, свободной от полиомиелита, создается комплексная технология дифференциальной диагностики заболеваний с синдромом острого вялого паралича, которая будет включать критерии отбора больных, методологию их обследования, генетическую характеристику выделенных вирусов. Внедрение технологии в практику обеспечит своевременное выявление диких полиовирусов и недопущение их распространения.

Изучается эпидемический процесс паротитной инфекции в Республике Беларусь за многолетний период; лабораторная диагностика эпидемического паротита, включая ПЦР-диагностику; определяется генотип вируса паротита, циркулирующего в Республике Беларусь. Внедрение разработанного в рамках задания алгоритма лабораторной диагностики позволит установить реальную заболеваемость эпидемическим паротитом в стране, дифференцировать случаи эпидемического паротита от неспецифических поражений слюнных желез, определить дальнейшую тактику иммунизации против эпидпаротита, выявить генотип эндемичного для Республики Беларусь вируса паротита и установить его филогенетические взаимоотношения с вирусами, циркулирующими в других странах.

Проводятся исследования генетической структуры возбудителя коклюшной инфекции с целью выявления мутаций в генетических детерминантах факторов патогенности штаммов *Bordetella pertussis*. Результаты исследований необходимы и могут быть использованы для создания новых вакцинных препаратов. В результате выполнения задания будет разработан и внедрен наиболее совершенный молекулярный метод диагностики коклюша на основе ПЦР реального времени, что существенно повысит эффективность лабораторной диагностики этой инфекции.

**Парвовирусная инфекция.** В условиях элиминации кори и краснухи парвовирус начинает играть существенную роль как этиологический агент острых экзантем, что требует обязательного лабораторного обследования на эту инфекцию всех выявленных в стране пациентов с сыпью и температурой. С целью диагностики и молекулярно-эпидемиологического надзора за инфекцией разрабатывается тест-система на основе полимеразной цепной реакции для выявления парвовируса В19 в клиническом материале. Использование данной тест-системы позволит повысить качество эпидемиологического надзора за инфекцией, а также обеспечить импортозамещение, снизив при этом стоимость исследования в 2,5 раза.

**ВИЧ-инфекция.** На 1 апреля 2012 г. в Беларуси зарегистрировано 13276 случаев ВИЧ-инфекции. Ежегодно в стране выявляется более 1 тыс. ВИЧ-инфицированных, что требует незамедлительных мер, направленных на создание и совершенствование системы диагностики, профилактики и лечения. По данной проблеме в Программу включены следующие разработки:

Будет создана и внедрена в практику здравоохранения система молекулярно-эпидемиологического мониторинга над ВИЧ/СПИД. Это позволит поднять на новый уровень систему эпидемиологического контроля за развитием эпидемии ВИЧ/СПИД в Беларуси, определить направление, время заноса вируса в Беларусь, улучшить качество профилактических мероприятий в стране.

Разрабатывается диагностическая тест-система для определения мутаций резистентности вируса к действию лекарственных средств. Использование ее в лабораторной диагностике позволит скорректировать схемы лечения при назначении антиретровирусной терапии пациентам, а при определении вторичной резистентности — своевременно менять схемы лечения.

Впервые на большом фактическом материале будет установлена этиологическая структура и механизмы поражения печени различными инфекционными патогенами у

ВИЧ-инфицированных пациентов, разработаны критерии верификации диагноза, схемы диагностики и рациональной этиотропной терапии.

Проводятся исследования с целью создания контрольной панели сывороток крови ВИЧ-инфицированных. Она предназначена для тестирования образцов биологического материала методом иммуноферментного анализа и иммунного блоттинга на наличие маркеров ВИЧ и оценки качества коммерческих тест-систем.

**Природно-очаговые и особо опасные инфекции.** Особое внимание в Программе уделено проблеме природно-очаговых и особо опасных инфекций:

Впервые в республике будут разработаны критерии клинико-лабораторной диагностики клещевых микст-инфекций, которые обеспечат возможность дифференциальной диагностики возбудителей патогенных для человека трансмиссивных бактериальных инфекций. Предложенная схема терапии клещевых микст-инфекций позволит повысить эффективность лечения больных в зависимости от сочетания возбудителей.

Будет разработана тест-система на основе ПЦР для одновременной детекции основных возбудителей патогенных для человека трансмиссивных бактериальных инфекций (Лайм-боррелиоз, эрлихиоз, анаплазмоз). Использование тест-системы позволит сократить сроки постановки анализа, ускорить диагностику случаев неясной этиологии и значительно повысить качество проводимых лабораторных исследований. В республике и на территории СНГ аналогов не имеется.

Разрабатывается тест-система для выявления иммуноглобулинов класса М и класса G к возбудителю Лайм-боррелиоза иммунофлюоресцентным методом, позволяющая дифференцировать ранние и поздние стадии заболевания, что имеет существенное значение при выборе схемы терапии.

Тест-система иммуноферментная для выявления антигена вируса Западного Нила в переносчиках и клиническом материале создается для проведения массовых исследований кровососущих насекомых с целью определения их вирусофорности и оценки степени эпидемической опасности обследуемых территорий, а также выявления антигена в клиническом материале. Разработка ориентирована на экспорт.

Для исследования органов животных на наличие антигена ЛХМ в потенциальных природных очагах, а также для молекулярно-генетического подтверждения диагноза «вирусный лимфоцитарный хориоменингит» разрабатывается тест-система для выявления вируса ЛХМ методом ПЦР в режиме реального времени. Достоинством метода является универсальность, быстрота проведения, высокая специфичность и чувствительность. Тест-система предназначена для использования в работе санитарно-эпидемиологических служб, в службе гематологии и трансфузиологии, а также в центрах трансплантологии для тестирования доноров на наличие антигена вируса ЛХМ.

Выполнены исследования по созданию молекулярно-биологических способов диагностики особо опасных вирусных геморрагических лихорадок. На основе сконструированных плазмид получены рекомбинантные полипептиды вирусов ККГЛ, ГЛПС, ЛХМ, Ласса, Марбург, Эбола и созданы тест-системы для идентификации особо опасных вирусов методом твердофазного иммуноферментного анализа, а также природно-очаговых вирусов ГЛПС, ЛХМ, ККГЛ методом дот-блот иммуноанализа.

Разрабатывается подтверждающий тест на лептоспироз. Набор обеспечит верификацию диагноза «лептоспироз» у больных в острой фазе, реконвалесцентов и при лептоспироносительстве путем выявления низких концентраций противолептоспирозных антител классов IgM и IgG в сыворотке и плазме крови человека методом иммунного блоттинга.

**Туберкулез.** Эпидемиология туберкулеза в современных условиях в Республике Беларусь характеризуется стремительным нарастанием удельного веса множественно

лекарственно-устойчивого туберкулеза как среди впервые выявленных, так и ранее лечившихся и утяжелением структуры множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) микобактерий туберкулеза в сторону нарастания устойчивости к резервным препаратам. Одним из серьезных факторов, снижающих эффективность борьбы с МЛУ туберкулезом, является отсутствие в республике молекулярно-генетической диагностики лекарственной чувствительности возбудителя к препаратам резервного ряда. Данная проблема нашла отражение в следующих разработках:

Создается тест-система для молекулярной экспресс-идентификации лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* к препаратам резервного ряда. Диагностический препарат будет характеризоваться высокой чувствительностью и позволит обнаружить не менее 90% фторхинолонустойчивых штаммов возбудителя туберкулеза.

Решается проблема терапии туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью. С целью повышения эффективности лечения разрабатывается метод терапии мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками. Внедрение метода в практику фтизиатрии повысит эффективность лечения туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью, уменьшит количество и снизит тяжесть токсических побочных эффектов лекарственной терапии, сократит сроки лечения.

**Менингит.** Менингиты и менингоэнцефалиты различной этиологии продолжают оставаться самыми распространенными формами поражения нервной системы. Решающим в успехе исхода заболевания являются ранняя диагностика и адекватная стартовая терапия. В рамках программы выполняются следующие работы:

На основе высокоэффективной, простой в исполнении и экономически доступной методики определения уровня D-лактата в крови и спинномозговой жидкости, разрабатывается тест-система для дифференциальной диагностики бактериальных и вирусных поражений ЦНС, которая обеспечит раннюю надежную диагностику. Своевременно начатая адекватная антибактериальная терапия позволит предотвратить развитие осложнений, сократить продолжительность госпитализации, упредить необратимую инвалидизацию.

Выполняется разработка тест-системы для серотипирования штаммов *Neisseria meningitidis* на основе полимеразной цепной реакции.

**Паразитарные заболевания.** Паразитозы достаточно широко распространены среди населения республики. В настоящее время регистрируется более 10 нозологических форм. Увеличилось количество заболеваний редкими гельминтозами, чему способствуют интенсивные миграционные процессы. В русле данной проблемы в программе представлены следующие разработки:

Новая, не имеющая отечественных аналогов, технология седиментации клинического материала позволит существенно повысить эффективность и ускорить процесс выделения возбудителей паразитарных заболеваний. Разработанные на ее основе методы предназначены для детекции яиц гельминтов и цист простейших, как минимум, 8 таксономических групп.

С использованием нанотехнологий (метод ДНК-комет) исследуются особенности патогенеза трихинеллеза, описторхоза, трихоцефалеза человека. Разработка на основе полученных данных способов диагностики и лечения, а также внедрение их в практику будет способствовать повышению эффективности лечения инвазий и, соответственно, снижению генетического груза в популяции населения нашей страны.

Активное развитие нанотехнологий привело к широкому применению их достижений в биологии и медицине. Оригинальна разработка технологии получения в качестве метки функционально-активных наночастиц (магнитные и флуоресцентные биомаркеры) и создание на их основе тест-системы, позволяющей выявить персистентные формы хламидийной инфекции.

**Иммунные заболевания.** Ряд заданий посвящен разработке средств диагностики иммунных заболеваний:

Будет разработана диагностическая тест-система для биохимического определения аденозиндезаминазы в сыворотке и плазме крови для скрининга иммунодефицитных состояний. В основе диагностики — определение уровня аденозиндезаминазы, ключевого фермента катаболизма аденозина в живых организмах, играющего важную роль в регуляции иммунитета. Низкая активность этого фермента нарушает пролиферацию и созревание Т- и В- лимфоцитов и сопровождается тяжелыми формами клеточного и гуморального иммунодефицита. Высокий уровень отмечается у пациентов с инфекционной патологией (различные формы гепатитов, туберкулезный плеврит и др.).

Дисфункция иммунной системы может проявляться различными формами дерматозов, такими как псориаз и пузырчатка, ранняя диагностика которых является важной социальной проблемой. В связи с этим будет разработана принципиально новая диагностическая тест-система для выявления аутоантител к кератиноцитам у лиц с псориазом, получены новые научные факты и закономерности на функциональном и генетическом уровне, разработан комплекс рекомендаций для практических врачей по ведению пациентов с псориазом.

**Коллекции культур клеток и микроорганизмов.** Формирование и поддержание коллекций культур клеток и микроорганизмов неразрывно связано с обеспечением научно-исследовательских работ и санитарно-эпидемиологических служб страны стандартными культурами микроорганизмов и линиями клеток. Исследования, выполненные в этом направлении, создадут условия для полного удовлетворения потребностей учреждений в продукции данного вида.

***В рамках программы будут выполнены следующие работы:***

Проведена инвентаризация и молекулярно-генетическая паспортизация штаммов-возбудителей инфекционных заболеваний, пополнена коллекция новыми микроорганизмами, патогенными для человека, изучены биологические свойства штаммов, создан электронный каталог коллекции.

Разработан алгоритм депонирования штаммов, представлена инструкция по применению.

Разработана технология культивирования линий клеток, высокочувствительных к различным возбудителям, имеющим значение в патологии человека, создана коллекция и криобанк эталонных культур клеток.

За период выполнения Программы (2011–2015 гг.) планируется разработать и внедрить в практику здравоохранения новые технологии, обеспечивающие современный уровень проводимой в стране работы в области контроля инфекций, а также создать на основе современных методов новые средства их диагностики, профилактики и лечения. Всего за эти годы будет выполнено более 80 заданий, в рамках которых планируется разработать около 100 единиц научно-технической продукции, из них: диагностические препараты — 45 наименований, новые методы — 55 разработок.

***Итоги выполнения ГНТП «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» за 2011–2012 гг.***

Первый блок заданий, выполняющийся с 2011 г., включает 45 заданий и в основной части завершится в 2013 г. С 2014 г. усилия организаций-разработчиков будут направлены на успешное освоение производства созданной продукции диагностического назначения и последующее обеспечение потребностей страны, а также внедрение новых технологий диагностики, профилактики и лечения в практику здравоохранения. За данный период будут разработаны диагностические тест-системы — 34 единицы, новые методы диагностики инфекций — 30 единиц; выделено, изучено и депонировано в коллекции около 90 штаммов

вирусов и бактерий, патогенных для человека, созданы 2 информационные базы данных республиканского значения по результатам мониторинга инфекций.

За двухлетний период выполнения Программы получены следующие результаты:

- разработаны новые методы исследований — 7;
- разработаны компоненты диагностических тест-систем — 81;
- представлены экспериментальные, лабораторные образцы диагностических препаратов (тест-системы, диагностические среды) — 11;
- разработаны комплекты нормативно-технической документации на производство диагностических препаратов — 8;
- другие нормативные документы — 3;
- разработаны программы и методики клинических испытаний диагностических препаратов — 5
- разработаны новые методы диагностики, профилактики и лечения, представлены проекты инструкций — 7
- выделено и охарактеризовано штаммов (изолятов) вирусов и бактерий, патогенных для человека — 161;
- создана база данных — 1;
- получено актов о внедрении научно-технической продукции в практику здравоохранения — 74.

Выполняются работы, связанные с освоением и внедрением созданной в рамках ГНТП (2010–2011 гг.) научно-технической продукции. Получены разрешения на серийный выпуск 12 диагностических препаратов, на применение 3 новых методов диагностики, профилактики и лечения. Разработки успешно используются в медицине. За 2011–2012 гг. получено более 100 актов о внедрении.

Осуществляется производство разработанных ранее диагностических препаратов. За два года лабораториям практического здравоохранения поставлено продукции диагностического назначения на сумму более 1,5 млрд руб. В полном объеме обеспечиваются потребности республики в таких препаратах, как набор для обнаружения возбудителей кишечных паразитарных болезней; набор для концентрирования вирусов из расфасованных вод, экстрактов пищевых продуктов и других объектов окружающей среды, набор для диагностики гепатита А, изготовленный на основе антигена гепатита А собственного производства.

Сформировано предложение для централизованной закупки препаратов производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии на 2012 г. В перечень вошли и разработки ГНТП — среда для культивирования гемофильной палочки, Мюллер–Хинтон агар, набор реагентов для лабораторной диагностики гриппа и других ОРВИ, набор для концентрирования вирусов из расфасованных вод и экстрактов пищевых продуктов, набор для обнаружения возбудителей кишечных паразитарных болезней, тест-системы для диагностики гепатита А, тест-система для диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом, ИФА для выявления антител к возбудителю лептоспироза.

По результатам выполнения ГНТП «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» опубликовано более 170 научных статей, подано 7 заявок на изобретение, получено 4 патента. Основные публикации представлены в специализированных выпусках журнала «Здравоохранение» [4–5], монографиях [7–8] тематическом сборнике [9].

#### Литература

1. О санитарно-эпидемической обстановке в Республике Беларусь в 2010 году: гос. доклад. – Минск, 2011. .
2. О санитарно-эпидемической обстановке в Республике Беларусь в 2011 году: гос. доклад. – Минск, 2012.
3. Жарко, В.И. Об итогах работы органов и организаций здравоохранения Республики Беларусь в 2011 году и основных направлениях деятельности на 2012 год / В.И. Жарко // Вопр. организ. и информатиз. здравоохран.: аналит.-информ.

бюл. – 2012. – № 1. – С. 4–17.

4. Здоровоохранение. – 2011. – № 1. – С. 26–29; № 4. – С. 9–15; № 8. – С. 29–38, 44–47; № 10. – С. 4–45; № 11. – С. 4–29, 43–48, 57–59; № 12. – С. 4–55; 66–67.

5. Здоровоохранение. – 2012. – № 10.

6. Достижения медицинской науки Беларуси: рец. науч.-практ. ежегодник. – Минск: ГУ РНМБ, 2011. – Вып. 16.– С. 31–45.

7. ВИЧ-инфекция у взрослых и детей. Оппортунистические инфекции и заболевания / Н.В. Магиевская, В.М. Цыркунов, Е.Л. Красавцев, В.Ф. Еремин. – Минск: ГрГМУ, 2011. – 399 с.

8. Скрипова, Л.В. Санитарно-эпидемиологический мониторинг – основа профилактики паразитарных болезней / Л.В. Скрипова. – Минск, 2011, 253 с.

9. Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. – Минск, 2011. – Вып. 4. – 312 с.

Поступила 17.09.2012

**«НЕУПРАВЛЯЕМАЯ» НОРОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ И ПУТИ  
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЕЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА**

**Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Статья посвящена проблеме совершенствования контроля над норовирусной инфекцией как доминирующей в структуре неуправляемых кишечных заболеваний вирусной этиологии. Кратко изложены основные эпидемиологические характеристики инфекции и особенности биологии ее возбудителей. В качестве профилактической меры, направленной на минимизацию риска массового заражения норовирусами населения и предотвращение вспышечной заболеваемости, предложен лабораторный контроль вирусоносительства у работников декретированных профессий. Рекомендуется во время прохождения данными работниками обязательных медицинских осмотров обследование их на предмет носительства норо-, рота-, адено-, астровирусов. Предлагаемая рекомендация требует экономической проработки, а для ее внедрения в практику необходимо внести соответствующие изменения в нормативную базу и разработать специальные инструктивно-методические документы.

**Ключевые слова:** норовирусы, норовирусная инфекция, вирусоносительство, работники декретированных профессий.

В последние годы наметилась устойчивая тенденция к активизации эпидемического процесса норовирусной инфекции (НВИ), которая стала представлять собой серьезную проблему здравоохранения во многих странах мира. Норовирусы (НВ) сегодня признаны одними из доминирующих этиологических агентов острых кишечных инфекций (ОКИ) вирусной этиологии. Установлены также их ведущая роль в возникновении вспышек острого гастроэнтерита и второе по значимости место после ротавирусов в инфекционной кишечной патологии детей [1].

НВ относятся к семейству *Caliciviridae*, которое было выделено из семейства *Picornaviridae* в 1979 г. Вирионы НВ представляют собой мелкие безоболочечные частицы с икосаэдрической симметрией ( $T=3$ ) диаметром 27 нм. Капсид состоит из 180 копий большого структурного белка VP1, 1–2 копий малого белка VP2 и белка VPg. Геном калицивирусов представлен однопитевой РНК позитивной полярности с молекулярной массой 2,6–2,8 мегадальтон, размером 7500–7700 нуклеотидных оснований.

НВ довольно стабильны, обладают высокой устойчивостью к физическим и химическим воздействиям и могут длительно сохранять свои инфекционные свойства (до 28 дней и более) в окружающей среде. Резервуаром и источником НВИ является больной человек или бессимптомный носитель вируса, для которого характерна высокая контагиозность: менее 10 НВ частиц достаточно, чтобы при попадании в желудочно-кишечный тракт здорового взрослого человека вызвать заболевание.

Инкубационный период НВИ составляет 12–48 ч, продолжительность заболевания — 2–5 дней. Выделение вируса достигает максимума на 1–2 день после инфицирования и может продолжаться в среднем до 1 мес. Однако у лиц с иммунодефицитом выделение вируса может быть гораздо более длительным (до 6–18 мес.). Поскольку НВИ чаще всего протекает в виде острого гастроэнтерита, для возбудителя характерно активное выделение с рвотными массами, что определяет возможность аэрозольного механизма его передачи в результате контаминации окружающей среды и воздуха каплями рвотных масс, содержащих вирусные частицы. Вместе с тем, основным механизмом передачи НВ является фекально-оральный, реализуемый контактно-бытовым, пищевым и водным путями передачи. Среди последних

водный путь реализуется значительно реже, чем пищевой и контактно-бытовой. Факторами передачи НВ контактно-бытовым путем обычно служат загрязненные руки больного или вирусоносителя, а также самые разнообразные объекты среды обитания человека (поверхности предметов, ручки дверей, мебель, оборудование и т.д.), контаминированные возбудителем. Пищевой путь передачи НВИ реализуется через контаминированные вирусом пищевые продукты. Источником инфекции являются больные или вирусоносители (лица, выделяющие вирусы при отсутствии манифестных признаков инфекции); чаще всего это работники общественного питания. Факторами передачи в таких случаях могут служить разнообразные продукты, не проходящие термическую обработку (фрукты, овощи, салаты, молочные и мясные изделия, морепродукты и т.д.). Водный путь реализуется при попадании в организм человека загрязненной вирусами воды (питьевой водопроводной, бутилированной, пищевого льда, воды закрытых и открытых водоемов).

НВ способны поражать все возрастные группы. При спорадической заболеваемости наиболее часто болеют дети в возрасте до 5 лет и пожилые люди. Возникновение вспышек более характерно для закрытых коллективов (в детских и военных учреждениях, клиниках и т.д.). Известно, что НВ являются наиболее частой причиной внутрибольничных инфекций в лечебных учреждениях. Это касается клинических стационаров различной специализации (интенсивной терапии, родильных домов и др.). Часто несмотря на проводимые противозидемические мероприятия вспышки могут приобретать затяжной характер. Особенно высокие уровни внутрибольничного инфицирования НВ имеют место в инфекционных стационарах среди пациентов, госпитализируемых с ОКИ. Данные случаи характеризуются атипичным волнообразным течением ОКИ. Они могут также проявляться клинически после выписки пациентов из стационара с последующим активным инфицированием контактирующих с ними лиц.

Заболеваемость НВИ имеет осенне-зимне-весеннюю сезонность. Однако вспышки наблюдаются в течение всего года, в т.ч. летом, когда уровень спорадической заболеваемости снижается. В целом характер эпидемического процесса связан с фазами циркуляции эпидемических штаммов НВ, их периодической сменой и появлением относительно новых для конкретной территории генотипов (геновариантов).

Основную роль в поддержании циркуляции НВ среди населения играют следующие факторы: низкая инфицирующая доза, высокая восприимчивость людей, неполная изоляция заболевших и отсутствие изоляции реконвалесцентов, продолжительное выделение вируса после перенесенной инфекции, длительное сохранение жизнеспособности вирусов на контаминированных предметах, более высокая, чем у большинства бактерий и других вирусных патогенов, устойчивость к действию дезинфектантов, короткий инкубационный период.

Вследствие наличия вышеуказанных особенностей НВ являются доминирующими агентами вспышек и других обострений эпидситуации по ОКИ во всем мире. Так, по данным зарубежных исследователей в 1997–2000 гг. НВ вызвали 93% всех вспышек ОКИ, зарегистрированных в США, а в 1995–2000 гг. — 85% всех вспышек ОКИ в странах Европы [2, 3]. Зимой 2008 г. значительный подъем заболеваемости ОКИ вследствие норовирусной инфекции был зарегистрирован в Великобритании: еженедельно фиксировалось около 200 000 случаев заболевания, а общая численность заболевших составила 2,8 млн человек. В этот период экономика Великобритании теряла по оценкам экспертов в среднем около 12 млн. фунтов стерлингов в неделю [4].

Что касается нашей страны [5–7], то в последние несколько лет (2009–2012 гг.) на ее территории как в летнее, так и в зимнее время года зарегистрировано 10 эпизодов групповой заболеваемости вирусными ОКИ (табл.), клинически протекающими в виде острых гастроэнтеритов (ОГЭ).

Таблица — Общая характеристика групповой заболеваемости ОГЭ в 2009–2012 гг.

Дата	Регион	Диагноз	Кол-во обследованных	Возраст	Этиологический агент(ы)	Доля заболеваний установленной этиологии
Май, 2009	Минск	ОГЭ	8	18–20 лет	Саповирус	75%
Февраль, 2010	Минская обл.	ОГЭ	10	18–20 лет	Саповирус Норовирус II Энтеровирус	60% 10% 30%
Март, 2010	Минск	ОГЭ	8	45–86 лет	Норовирус II	87,5%
Май, 2010	Минск	ОГЭ	15	16–17 лет	Норовирус II	86,6%
Февраль, 2011	Минск	ОГЭ	5	18–25 лет	Норовирус II Энтеровирус	80,0% 40,0%
Январь, 2012	Ляховичи	ОГЭ	11	11–18 лет	Норовирус II	81,8%
Май, 2012	Лунинец	ОГЭ	5	7–8 лет	Норовирус II	100%
Июль, 2012	Борисов	ОГЭ	6	7–12 лет	Энтеровирус	100%
Июль, 2012	Мядель	ОГЭ	5	9–15 лет	Норовирус I	80%
Июль, 2012	Минск	ОГЭ	6	18–20 лет	Норовирус II	33,3%

Подавляющее большинство обострений эпидситуации произошли в организованных коллективах (детских оздоровительных и спортивных учреждениях, воинской части). Возрастной состав заболевших был весьма разнообразен — от 7 до 86 лет. По результатам проведенных на базе РНПЦЭМ лабораторных исследований возбудителями ОГЭ оказались норо-, сапо-, энтеровирусы. Чаще этиология ОГЭ была обусловлена моноинфекцией, и только 2 из 10 эпизодов групповой заболеваемости сопровождались смешанной инфекцией с одновременной идентификацией в клиническом материале двух или трех возбудителей. При этом доминирующими этиологическими агентами были норовирусы II геногруппы (рисунок), явившиеся причиной эпидемической заболеваемости в 70% случаев.

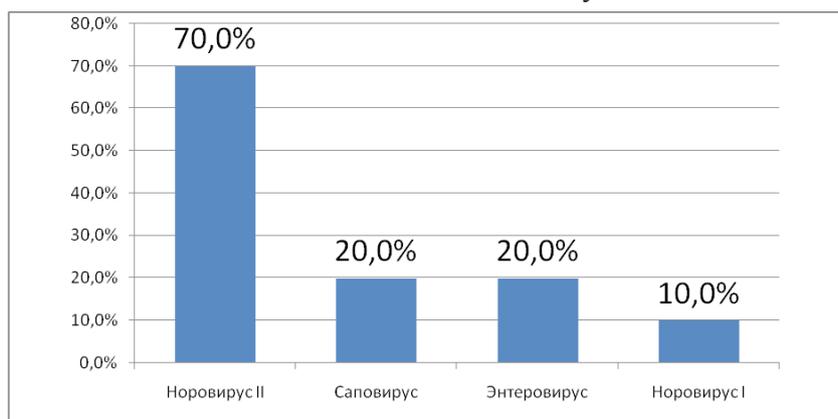


Рисунок — Вклад различных возбудителей в формирование групповой заболеваемости вирусными ОГЭ

Характерной особенностью биологии НВ является их чрезвычайно высокая генетическая и антигенная изменчивость, лежащая в основе широкого разнообразия циркулирующих вариантов. Именно данное обстоятельство является главной проблемой при разработке вакцинных препаратов. В настоящее время таковых не создано, в связи с чем НВИ остается неуправляемой с точки зрения ее вакцинопрофилактики. В этих условиях единственным эффективным средством снижения заболеваемости, вызванной НВ, является тщательный эпидемический надзор за их циркуляцией, основанный на результатах лабораторного контроля над возбудителями как на уровне человеческой популяции, так и эпидемически значимых внешнесредовых объектов (пищи и воды). С этой целью во многих странах мира активно разрабатываются и внедряются национальные системы эпиднадзора за НВ. Так, в 1999 г. лаборатории 13 Европейских стран объединились в единую сеть

по надзору за кишечными вирусами, контаминирующими продукты питания — FBVEnet. В ходе проведенных ими исследований установлено, что именно НВ обладают наибольшей эпидемической значимостью и наносят наиболее значительный ущерб экономике и здоровью населения различных стран [8]. Со временем к этой сети присоединилось значительное количество государств, и в настоящее время она трансформировалась в международную сеть эпидемиологического надзора за НВ — NoroNet, включающую лаборатории США, Канады, Никарагуа, Венесуэлы, Чили, России, Нидерландов, Великобритании, Германии, Венгрии, Франции, Швеции, Израиля, Японии, Китая, Индии, Малайзии, Новой Зеландии и Австралии. Основным звеном NoroNet является система молекулярно-эпидемиологического мониторинга — сбор и обмен информацией о генетических характеристиках циркулирующих вариантов НВ, их генотипах и субгенотипах [9]. Такая система молекулярно-эпидемиологического мониторинга с учетом накопленного мирового опыта и национальных особенностей организации и функционирования лабораторной и эпидемиологической служб в настоящее время разрабатывается и в нашей стране. Конечным итогом успешного функционирования этой системы является внедрение в практику новых профилактических мер, направленных на минимизацию риска массового заражения НВ населения и предотвращение связанной с НВИ вспышечной заболеваемости. Одной из таких превентивных мер, известных в отношении других социально значимых инфекций, может быть контроль вирусоносительства. Речь идет о лабораторном обследовании лиц — возможных вирусоносителей, которые могут представлять определенную эпидемическую опасность для обслуживаемых ими групп населения вследствие выделения НВ в окружающую среду при отсутствии клинических проявлений инфекции. Это касается так называемых работников декретированных профессий, к которым относятся работники различных учреждений пищевой промышленности, общественного питания, торговли, организаций здравоохранения и образования (для детей и взрослых), детских интернатов, сезонных оздоровительных организаций с круглосуточным пребыванием детей, а также персонал водопроводных сооружений, связанных с подготовкой воды и обслуживанием водопроводных сетей. В связи с родом выполняемой работы для данных категорий работников обязательны предварительные, периодические и внеочередные медосмотры [10], во время которых, по нашему мнению, целесообразно осуществлять их обследование на предмет выявления норовирусного носительства.

Следует отметить, что в настоящее время требованиями санитарного законодательства Республики Беларусь [10] при прохождении медосмотров вышеуказанных категорий работников их обследование на патогенные кишечные вирусы не предусмотрено. В качестве диагностических тестов на патогенную кишечную микрофлору регламентируется «бактериологическое исследование выделений (кал) на наличие энтеропатогенных кишечных бактерий, в том числе возбудителей брюшного тифа и паратифов, серологическое обследование на брюшной тиф» (тиф и паратиф (A01), другие сальмонеллезные инфекции (A02), шигеллез (A03) и другие бактериальные кишечные инфекции (A04)». Как видно, регламентируемый спектр возбудителей для лабораторного обследования работников вышеуказанных категорий не адекватен реалиям современной эпидобстановки как в нашей стране, так и за рубежом, а используемые диагностические исследования не в состоянии гарантировать эпидемическую безопасность населения в отношении актуальных возбудителей вирусной природы, какими являются сегодня НВ.

В целях совершенствования эпидемиологического надзора за носительством патогенной микрофлоры у работников декретированных профессий целесообразно дополнить перечень детектируемых инфекционных агентов актуальными вирусными патогенами. В первую очередь в этот перечень должны войти доминирующие возбудители вирусных ОКИ, какими являются норо-, рота-, адено-, астровирусы. Для осуществления

такого комплексного обследования работников на бактерио- и вирусоносительство нами рекомендуется использование ПЦР как наиболее чувствительного и репрезентативного метода обнаружения инфекционных агентов. В качестве диагностического препарата целесообразно применять хорошо зарекомендовавшую себя на отечественном рынке диагностическую ПЦР тест-систему «ОКИ скрин-FL» (производства АмплиСенс®, Россия). Данный препарат позволяет в довольно короткие сроки (6–8 ч.) выявить основной спектр из 8 актуальных вирусных и бактериальных возбудителей ОКИ. Он включает 4 вида вирусных агентов — норовирусы 2 генотипа, ротавирусы группы А, аденовирусы группы F, астровирусы, а также 4 вида бактериальных агентов — микроорганизмы рода Шигелла (*Shigella spp.*), энтероинвазивные *E. coli* (EIEC), сальмонеллы (*Salmonella spp.*), термофильные кампилобактерии (*Campylobacter spp.*).

Таким образом, при проведении лабораторного анализа одного образца, выполненного на самом современном уровне, будет получена точная информация о наличии или отсутствии у работника носительства довольно широкого спектра потенциально опасных (в плане заражения окружающих) как бактериальных, так и вирусных кишечных патогенов. К этому следует добавить, что в настоящее время данные исследования технически вполне доступны для лабораторной службы нашей страны. Вместе с тем, для внедрения такого комплексного обследования работников декретированных групп необходимо изменить соответствующую нормативную базу, а также разработать специальные инструктивно-методические документы, устанавливающие конкретный алгоритм действий, определяющие методы исследований, дающие интерпретацию и оценку результатов с указанием соответствующих профилактических мер. Целесообразно также провести анализ материальных затрат и определить экономическую эффективность предлагаемого совершенствования лабораторного обследования работников декретированных профессий с учетом принципов профилактической медицины и здоровьесбережения населения.

#### Литература

1. Wilhelmi, I. Viruses causing gastroenteritis // Clin. Microbiol. Infect. / I. Wilhelmi, E. Roman, A. Sanchez-Fauquier. – 2003. – Vol. 9. – P. 274–262.
2. Epidemiologic and molecular trends of Norwalk-like viruses associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States / R.L. Fankhauser [et al.] // J. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 186. – P. 1–7.
3. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000 / B.A. Lopman [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 1. – P. 90–96.
4. Times Online January 3, 2008. H. Fletcher and agencies. Two million struck down by norovirus [Electronic resource]. – Mode of access: [www.thetimes.co.uk/tto/health/news](http://www.thetimes.co.uk/tto/health/news). – Date of access: 03.01.2008.
5. Генетическое разнообразие норовирусов, вызвавших спорадическую и групповую заболеваемость ОКИ в г. Минске в 2009–2010 гг. / Н.В. Поклонская [и др.] // Здоровоохранение. – 2010. – № 10. – С. 30–36.
6. Генетический анализ норовирусов – возбудителей острых гастроэнтеритов в г. Минске в 2009–2010 гг. / Н.В. Поклонская [и др.] // Молекулярная диагностика–2010: сб. тр. 7-й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием: в 4 т. – М., 2010. – Т. 2. – С. 381–383.
7. Генотипирование возбудителей норовирусной инфекции / Н.В. Поклонская [и др.] // Здоровоохранение. – 2011. – № 10. – С. 36–42.
8. Food-borne viruses in Europe. Rapid detection of transnational food-borne viral infections and elucidation of transmission routes through molecular tracing and development of a common database. Final report. 2004 [Electronic resource]. – Mode of access: <http://eufoodborneviruses.rivm.nl/EUFBVindex.asp>. – Date of access: 31.08.2012.
9. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007 / J.J. Siebenga [et al.] // J. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 200, N 5. – P. 802–812.
10. Инструкция о порядке проведения обязательных медицинских осмотров работающих: утв. Постановлением МЗ РБ 28.04.2010 № 47.

Поступила 05.09.2012

## UNCONTROLLED NOROVIRUS INFECTION AND WAYS TO IMPROVE ITS SURVEILLANCE

Amvrosieva T.V., Paklonskaya N.V.

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

The paper is devoted to the problem of improving surveillance for norovirus infection, which is predominant among uncontrolled enteric viral infections. The major epidemiological features of the infection and its agents are briefly summarized. As a preventive measure aimed at minimizing the risks of mass infection and outbreaks, it is suggested to use additional virology testing among employees who must go through mandatory medical examination prior to employment. Noro-, rota-, adeno-, and astroviruses are recommended for such testing. Suggested recommendation is subject to further economic, legislative and methodological development.

**Keywords:** norovirus, norovirus infection, viral carrier status

### ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ В РАЗРАБОТКЕ И ВНЕДРЕНИИ СИСТЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА, СРЕДСТВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ, ЭКСТРЕННОЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ И ЭТИОТРОПНОГО ЛЕЧЕНИЯ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В БЕЛАРУСИ

Гудков В.Г.<sup>1</sup>, Виринская А.С.<sup>1</sup>, Чистенко Г.Н.<sup>2</sup>, Фисенко Е.Г.<sup>3</sup>,  
Карабан И.А.<sup>4</sup>, Ключарева А.А.<sup>5</sup>, Плотникова К. Ю.<sup>1</sup>, Новацкая Ю.В.<sup>1</sup>,  
Малявко Д.В.<sup>6</sup>, Запольская В.В.<sup>3</sup>, Сенчук В.В.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;

<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет;

<sup>3</sup>Минский городской центр гигиены и эпидемиологии;

<sup>4</sup>Министерство здравоохранения Республики Беларусь;

<sup>5</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования;

<sup>6</sup>Белорусский государственный медицинский колледж;

<sup>7</sup>Белорусско-голландское СП «Фармлэнд», Минск, Беларусь

**Резюме.** Приведены результаты комплексного исследования по проблеме ротавирусной инфекции. Разработана система эпидемиологического надзора, методы и средства лабораторной диагностики инфекции, экстренной специфической профилактики и лечения. Указаны перспективы дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** ротавирусная инфекция, эпидемиологический надзор.

**Введение.** Ротавирусная инфекция (РВИ) в Беларуси, как и во всем мире, является значимой медицинской и социально-экономической проблемой, обусловленной повсеместным распространением инфекции, высоким уровнем заболеваемости, преимущественным поражением детей в возрасте до 2–3 лет, выраженной тяжестью заболевания, наличием вспышечных и сезонных форм эпидемического процесса и вытекающими из этого значительными экономическими издержками.

Актуальность проблемы РВИ обусловило проведение в мире интенсивных научных исследований, направленных сначала на установление природы этиологического агента заболевания [1], а затем на изучение свойств ротавирусов, особенностей эпидемического процесса, разработку методов и средств диагностики, профилактики и лечения этой инфекции. Аналогичные исследования по проблеме РВИ в течение ряда лет осуществляются и в РНПЦ (до 2005 г. — Белорусском НИИ) эпидемиологии и микробиологии.

**Цель исследования:** анализ результатов исследований, выполненных в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, внедрение которых может способствовать решению проблемы РВИ в республике, а также определение перспективных направлений дальнейших исследований.

**Материалы и методы.** При проведении исследований по проблеме РВИ использовались вирусологические, серологические, молекулярно-биологические, эпидемиологические, клинические, информационные и статистические методы, Материалом для исследований являлись изоляты ротавирусов, образцы экскретов, сывороток крови и слюны от пациентов с острыми кишечными инфекциями различной этиологии и здоровых лиц, сыворотки крови и иммунное молоко коров-производителей, лактоиммуноглобулин противорота-вирусный, истории болезни, данные официальной медицинской статистики, программные продукты.

**Результаты и их обсуждение.** Наиболее значимым достижением в области борьбы с РВИ в республике, по существу аккумулирующим основные результаты исследований за последние годы, явилась разработка новой современной и высоко технологичной системы эпидемиологического надзора (СЭН) за этой инфекцией.

СЭН за РВИ создавалась на основе следующих концептуальных подходов:

- целью эпидемиологического надзора за РВИ является эпидемиологическая диагностика эпидемического процесса и разработка на ее основе рекомендаций по проведению организационных, санитарно-гигиенических, противоэпидемических, лечебно-профилактических мероприятий, направленных на снижение заболеваемости населения, предотвращение групповых заболеваний (вспышек инфекции);

- эпидемический процесс рассматривается как система, образованная взаимодействующими в конкретных условиях (среде) популяциями человека и возбудителя инфекции;

- дискретность взаимодействующих популяций и среды согласно выдвинутому ранее положению обуславливает относительную автономность эпидемического процесса, возможность его локализации и управления им;

- эпидемиологический надзор осуществляется в соответствии с разработанной ранее территориально-факторной концепцией в совокупности трех основных взаимосвязанных аспектов — территориального, факторного и временного;

- СЭН за РВИ состоит из двух основных подсистем: традиционной — популяционно-эпидемиологического надзора (ПЭН) и новой — дозорного эпидемиологического надзора (ДЭН). В свою очередь, каждая из этих подсистем, как и СЭН в целом включает общие для них подсистемы: информационную, эпидемиолого-диагностическую и управленческую с различающимися для каждой из них задачами;

- научно-технический (технологический) уровень СЭН и особенно в сфере лабораторного и информационного обеспечения должен соответствовать современным мировым достижениям, что обуславливает градацию эпидемиологического надзора по используемому научно-техническому (технологическому) потенциалу на 3 основных уровня: первичный, квалифицированный и специализированный;

- эффективность борьбы с инфекцией повышается при комплексном и систематическом использовании всех имеющихся способов и средств.

В процессе исследований разработаны и усовершенствованы средства диагностики РВИ (иммуноферментная и иммунохроматографическая тест-системы), методы выявления антител классов А, М, G к ротавирусам, типирования изолятов возбудителя с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции. Создан банк изолятов ротавирусов и соответствующий информационный ресурс с индивидуализированной характеристикой изолятов и источников инфекции, предусмотрено создание информационных баз данных по результатам дозорного эпидемиологического надзора. Разработано иммунобиологическое лекарственное средство для экстренной специфической профилактики и этиотропного лечения РВИ — лактоиммуноглобулин противорота-вирусный, проводятся опытно-конструкторские работы по освоению его промышленного выпуска на белорусско-голландском СП «Фармлэнд». Созданы определенные научные заделы по разработке инактивированной противорота-вирусной вакцины.

Разработанные методы и средства лабораторной диагностики РВИ обеспечивают осуществление в рамках СЭН серологического и молекулярно-эпидемиологического мониторинга. Серологический мониторинг традиционно направлен на изучение коллективного иммунитета в отношении возбудителей инфекции, но имеет определенные особенности, обусловленные циркуляцией различных серо-генотипов ротавирусов и молекулярно-биологической структурой вирионов. Это предполагает изучение иммунитета с использованием двух методических подходов — иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции нейтрализации в культуре клеток. С помощью ИФА определяются антитела к группоспецифическому антигену VP6, что позволяет судить о распространенности инфекции у различных контингентов населения. В реакции нейтрализации выявляются типоспецифические противоротавирусные иммуноглобулины, что позволяет судить о распространенности отдельных генотипов возбудителя в человеческой популяции и напряженности иммунитета, в т.ч. поствакцинального, к ним. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг направлен на контроль циркулирующей популяции ротавирусов и имеет большое значение для оценки и прогнозирования эпидемиологической ситуации на конкретной территории.

**Выводы.** На основании результатов проводившихся в течение ряда лет исследований и анализа специальной литературы разработана система эпидемиологического надзора за РВИ, представленная в инструкции по применению [2]. Установлены основные закономерности эпидемического процесса РВИ в республике, определены структура и порядок функционирования новой системы эпидемиологического надзора за РВИ, включающей подсистемы популяционного и дозорного эпидемиологического надзора, функции органов государственного надзора различных уровней, приводятся разработанные авторами методики серологического и молекулярно-эпидемиологического мониторинга, которые успешно апробированы и могут быть использованы на практике.

Система эпидемиологического надзора содержит ряд новшеств, в т.ч. подсистему дозорного эпидемиологического надзора, банк изолятов и информационные ресурсы, предусматривается факторный анализ заболеваемости, в т.ч. с использованием программного продукта «УЛИС-эпидемиология». Новым является и применение лабораторных методов исследований, реализуемых в рамках молекулярно-эпидемиологического и серологического мониторинга.

Разработанная система эпидемиологического надзора за РВИ базируется на полученных в республике сведениях об эпидемическом процессе РВИ, современных данных об организации эпидемиологического надзора и противоэпидемических мероприятий, способах профилактики, методах диагностики и типирования возбудителя этой инфекции. Вместе с тем, требует дальнейшего изучения вопрос о целесообразности и форме установления контроля над вирусовыделителями, прежде всего, относящимися к эпидемиологически значимым контингентам, организации действенных противоэпидемических мероприятий на такого рода объектах (в коллективах). Кроме того, дискуссионным является вопрос о возможности упрощения учета пациентов с РВИ в системе ПЭН, в частности путем отмены экстренных извещений на каждый единичный случай РВИ у неорганизованных детей, переход на суммарный учет случаев заболеваний у них.

Внедрение и последующее совершенствование новой системы эпидемиологического надзора за РВИ, разработка инактивированной вакцины, а также освоение промышленного производства и применение противоротавирусного лактоиммуноглобулина для экстренной специфической профилактики и этиотропного лечения РВИ у детей, несомненно, будет способствовать существенному снижению заболеваемости этой инфекцией и установлению действенного контроля над ней.

#### Литература

1. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis / R.F. Bishop [et al.] // *Lancet*. – 1973. – Vol. 2, № 7841. – P. 1281–1283.

Поступила 21.09.2012

## ACHIEVEMENTS AND PROSPECTS IN DEVELOPMENT AND IMPLEMENTATION OF EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE, LABORATORY DIAGNOSIS, EMERGENCY PREVENTION, AND ETIOTROPIC TREATMENT OF ROTAVIRUS INFECTION IN BELARUS

Gudkov V.G.<sup>1</sup>, Virinskaya A.S.<sup>1</sup>, Chistenko G.N.<sup>2</sup>, Fisenko E.G.<sup>3</sup>, Karaban I.A.<sup>4</sup>, Kluchareva A.A.<sup>5</sup>, Plotnikova K.Yu.<sup>1</sup>, Novatskaya Yu.V.<sup>1</sup>, Maliavko D.V.<sup>6</sup>, Zapolskaya V.V.<sup>3</sup>, Senchuk V.V.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;

<sup>2</sup>Belarusian State Medical University;

<sup>3</sup>Minsk Municipal Center for Hygiene & Epidemiology;

<sup>4</sup>Ministry of Health of the Republic of Belarus;

<sup>5</sup>Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education;

<sup>6</sup>Belarusian State Medical College;

<sup>7</sup>Belarusian-Dutch joint venture PharmLand LLC, Minsk, Belarus

The results of a comprehensive study on rotavirus are presented. A system of surveillance methods and tools for laboratory diagnosis of the infection, specific prevention and emergency treatment have been developed. Prospects for further research are pointed.

**Keywords:** rotavirus infection surveillance.

## РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПОПУЛЯЦИИ РОТАВИРУСОВ

Гудков В.Г.<sup>1</sup>, Плотникова К.Ю.<sup>1</sup>, Новацкая Ю.В.<sup>1</sup>, Виринская А.С.<sup>1</sup>, Ключко Н.Л.<sup>2</sup>, Зайцева Л.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;

<sup>2</sup>Детская инфекционная клиническая больница, Минск, Беларусь

**Резюме.** Проведен молекулярно-эпидемиологический мониторинг популяции ротавирусов, циркулирующих в Республике Беларусь. Выделенные в 2011 г. изоляты ротавирусов имели различные Р и G-типы и их сочетания. В 2011 г. по сравнению с предыдущим периодом заметно увеличилась доля ротавирусов с генотипом G3P [8] (до 53,6%) с одновременным снижением удельного веса ротавирусов с бинаминальной формулой G2P [4] (до 8,0%) и G4P [8] (до 24,8%). Типированные образцы помещены в банк изолятов ротавирусов РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Сведения о возбудителях и источниках инфекции размещены в информационном ресурсе «Характеристика изолятов ротавирусов, выделенных в Республике Беларусь». Полученные данные целесообразно учитывать при осуществлении эпидемиологического надзора и планировании противоэпидемических мероприятий.

**Ключевые слова:** ротавирус, молекулярно-эпидемиологический мониторинг.

**Введение.** Ротавирусы, являющиеся этиологическим агентом актуальной во всем мире ротавирусной инфекции (РВИ), характеризуются генетической гетерогенностью и высоким уровнем изменчивости. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг ротавирусов позволяет определять спектр циркулирующих штаммов, доминирующие генотипы вируса, своевременно отслеживать их смену, прогнозировать эпидемиологическую ситуацию и определять адекватную для циркулирующей популяции возбудителя антигенную структуру иммунобиологических противоротавирусных препаратов [1]. Кроме того, молекулярно-

эпидемиологический мониторинг ротавирусов может использоваться при расшифровке вспышек инфекции и изучении путей распространения возбудителя на различных территориях.

Выборочный молекулярно-эпидемиологический мониторинг ротавирусов осуществляется в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии на протяжении нескольких лет. В 2011 г. он проводился в соответствии с инструкцией по применению «Эпидемиологический надзор за ротавирусной инфекцией» [2].

**Цель исследования:** проведение молекулярно-эпидемиологического мониторинга популяции ротавирусов, определение ее типовой структуры; актуализация банка изолятов ротавирусов и информационного ресурса (ИР) «Характеристика изолятов ротавирусов, выделенных в Республике Беларусь».

**Материалы и методы.** Образцы. Исследовано 125 проб фекалий от детей с клиникой острого гастроэнтерита и положительных на содержание ротавирусного антигена. Пробы поступали из Минской детской инфекционной клинической больницы в течение 2011 г.

Генотипирование ротавирусов. Типирование изолятов ротавирусов проводилось с помощью ПЦР по генам, кодирующим структурные белки вириона VP4 и VP7 с помощью мультиплексной ОТ-ПЦР. Выделение РНК проводили с помощью гуанидинтиоцианатной методики. Для этого исследуемый образец смешивали с лизирующим раствором, содержащим гуанидин тиоцианат, и термостатировали при 65 °С в течение 15 мин. После чего РНК преципитировали изопропанолом, полученный осадок отмывали этанолом и ацетоном. Выделенную таким образом двуцепочечную РНК денатурировали DMSO. Обратную транскрипцию и амплификацию проводили, как описано ранее [3]. Полученные фрагменты разгоняли в 2% агарозном геле. Принадлежность тому или иному типу определялась по длинам фрагментов относительно маркера молекулярных масс.

**Результаты и их обсуждение.** Исследовано 125 изолятов ротавирусов, выделенных от детей, госпитализированных в Минской детской инфекционной клинической больнице для лечения гастроэнтерита ротавирусной этиологии в течение января-декабря 2011 г.

Результаты исследований в динамике за 2008–2011 гг. представлены в табл.

Таблица — Результаты молекулярно-эпидемиологического мониторинга популяции ротавирусов, циркулирующей в Беларуси, в динамике

Генотипы	2008 г.		2009 г.		2010 г.		2011 г.		Всего	
	абс.	%								
G1P[8]	15	12,2	10	7,4	10	8,9	5	4,0	40	8,0
G2P[4]	23	18,7	37	27,4	18	16,1	10	8,0	88	17,8
G3P[8]	10	8,1	13	9,6	31	27,7	67	<b>53,6</b>	121	24,5
G3P[9]	0	0	2	1,5	1	0,9	2	1,6	5	1,0
G4P[8]	58	<b>47,2</b>	41	<b>30,4</b>	52	<b>46,4</b>	31	24,8	182	<b>36,8</b>
G4P[4]	0	0	4	2,9	0	0	0	0	4	0,8
G9P[8]	0	0	1	0,8	0	0	3	2,4	4	0,8
G3+G4P[8]	0	0	0	0	0	0	3	2,4	3	0,6
G1P[x]	2	1,6	0	0	0	0	0	0	2	0,4
G2P[x]	0	0	0	0	0	0	1	0,8	1	0,2
G3P[x]	0	0	12	8,9	0	0	1	0,8	13	2,6
GxP[4]	13	10,6	15	11,1	0	0	0	0	28	5,7
GxP[8]	0	0	0	0	0	0	2	1,6	2	0,4
GxP[4]+P[6]	2	1,6	0	0	0	0	0	0	2	0,4
<b>Всего исследовано</b>	<b>123</b>	<b>100</b>	<b>135</b>	<b>100</b>	<b>112</b>	<b>100</b>	<b>125</b>	<b>100</b>	<b>495</b>	<b>100</b>
<b>Из них по отдельным генотипам:</b>										

G1	17	13,8	10	7,4	10	8,9	5	4,0	42	8,5
G2	23	18,7	37	27,4	18	16,1	11	8,8	89	17,9
G3	10	8,1	27	20,0	32	28,6	70	56,0	139	28,1
G4	58	47,2	45	33,3	52	46,4	34	27,2	189	38,2
G9	0	0	1	0,7	0	0	3	2,4	4	0,8
P[8]	83	67,5	65	48,2	93	83,0	111	88,8	352	71,1
P[9]	0	0	2	1,4	1	0,9	2	1,6	5	1,0
P[4]	38	30,9	56	41,5	18	16,1	10	8,0	122	24,6
P[6]	2	1,6	0	0	0	0	0	0,0	2	0,4

Примечания:

1. x — нетипируемый тип;
2. Доминирующий геновариант вируса выделен жирным шрифтом.

Наиболее распространенными в мире являются 5 G-P комбинаций: G1, G3, G4, G9 с [P8], а также G2 с P [4]. Как видно из представленных в таблице данных, в республике циркулируют все 5 наиболее распространенных в мире G-P-типов, однако удельный вес их в различные годы был неодинаковым.

Из таблицы видно, что выделенные в 2011 г. изоляты ротавирусов имели различные P и G-типы и их сочетания. P-тип наиболее часто (111 изолятов или 88,8% проб) представлен вариантом P [8]. У 10 (8,0%) изолятов выявлен тип P [4]; 2 изолята типировались как P [9] (1,6%). G-тип исследованных изолятов ротавирусов отличался большим разнообразием. Были выявлены 5 G-типов ротавирусов: G1 — 5 изолятов (4,0%), G2 — 11 (8,8%), G3 — 70 (56,0%), G4— 34 (27,2%), G9 — 3 (2,4%) изолята, G2+G3 —3 (2,4%).

Генотипическая структура изолятов ротавирусов в 2011 г. (рисунок) заметно отличается от структуры изолятов, выделенных в 2008-2010гг. Так, в 2011 г. по сравнению с предыдущим периодом заметно увеличился удельный вес ротавирусов с генотипом G3P [8] (до 53,6%). Этот вариант возбудителя впервые за последние годы стал доминирующим в структуре популяции, при этом его удельный вес имел выраженную положительную динамику. Кроме того, компенсаторно снизился удельный вес ротавирусов с бинаминальной формулой G2P [4] (до 8,0%) и G4P [8] (до 24,8%). Считается, что такие изменения типовой структуры популяции ротавирусов являются причиной осложнений эпидемиологической ситуации в отношении РВИ в рассматриваемый период.

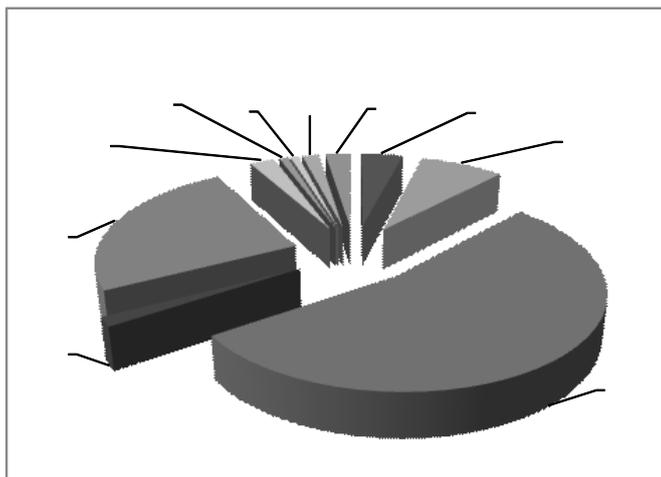


Рисунок — Генотипическая структура изолятов ротавирусов в 2011 г. (г. Минск, n=125)

Анализ G-P структуры популяции ротавирусов в Беларуси показал, что известные живые противоротавирусные вакцины Rotarix и RotaTeq, окажутся эффективными для профилактики РВИ в республике, однако ожидаемая эффективность этих препаратов может

различаться. Так, пентавалентная вакцина RotaTeq содержит все выявленные в республике разновидности G-P-типов вируса. Моновалентная вакцина Rotarix с типовой формулой G1P[8] могла нейтрализовать преобладающую часть циркулирующей популяции вируса хотя бы по одному G-P-ассоциированному антигену. Это же относится и к разработанному в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии противоротавирусному лактоиммуноглобулину с типовой биномиальной формулой G3P [8], промышленное производство которого в настоящее время осваивается.

Охарактеризованные клинические образцы хранятся в банке изолятов ротавирусов, созданном в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Полученная по каждому образцу и его источнику информация размещается в ИР «Характеристика изолятов ротавирусов, выделенных в Республике Беларусь», разработанном на матрице MS Access 2007 и представляющем собой реляционную базу данных [3]. Ресурс содержит связанные между собой таблицы (материал, вид материала, пациент (контактный), диагноз, учреждение, P-тип, G-тип), что обеспечивает целостность информации и позволяет анализировать и формировать отчеты по данным из нескольких таблиц. С целью совершенствования эпидемиологического надзора организациям МЗ РБ предоставлен доступ к данному источнику информации. Специалистами ДИКБ и кафедры инфекционных болезней и детских инфекций БелМАПО проводятся исследования по изучению клинических особенностей РВИ в зависимости от генотипа вызвавшего его возбудителя с использованием содержащихся в ИР сведений [4].

**Выводы.** Проведен молекулярно-эпидемиологический мониторинг популяции ротавирусов, циркулирующей на территории Республики Беларусь. Показано, что она характеризуется значительным генетическим разнообразием, при этом структура популяции подвержена изменчивости, что обуславливает подъемы заболеваемости. Это целесообразно учитывать при осуществлении эпидемиологического надзора и планировании противоэпидемических мероприятий, а в дальнейшем — и клинического ведения пациентов с РВИ.

#### Литература

1. Santos, N. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine / N. Santos, Y. Hoshino // *Rev. Med. Virol.* – 2005. – Vol. 15, № 1. – P. 29–56.
2. Эпидемиологический надзор за ротавирусной инфекцией: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 15.12.2011, рег. № 020–1211.
3. Банк изолятов ротавирусов и информационная база данных по их характеристике / А.С. Вириная [и др.] // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.* – Минск, 2010. – Вып. 3. – С. 56–61.
4. Clinical features of gastroenteritis (RVGE) caused by rotavirus G4P[8] serotypes in Minsk [Electronic resource] / D.V. Malyavko [et al.] // *The 29th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, The Hague, The Netherlands, 7–11 June, 2011: abstr.* – 1 electronic optical disc (CD ROM): sd., col.

Поступила 20.09.2012

## RESULTS OF ROTAVIRUS MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE

**Gudkov V.G.<sup>1</sup>, Plotnikova K.Yu.<sup>1</sup>, Novatskaya Yu.V.<sup>1</sup>, Virinskaya A.S.<sup>1</sup>,  
Klyuyko N.L.<sup>2</sup>, Zaitseva L.V.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology;*

<sup>2</sup>*Minsk Municipal Pediatric Infectious Clinical Hospital, Minsk, Belarus*

The molecular epidemiological surveillance for rotavirus population circulating in the Republic of Belarus was carried out. Rotavirus strain isolated in 2011 had different P and G-types and their combinations. Compared with the previous period, in 2011 the proportion of rotavirus genotype G3P [8] significantly increased (to 53,6%). Simultaneously the proportion of rotavirus with the binomial formula G2P [4] (8,0%) and G4P [8] (24,8%) decreased. Typed samples are placed in rotavirus isolates bank of RRPCEM. Information about the viruses and the sources of

infection is available in the information resource «Characterization of Rotaviruses Isolated in the Republic of Belarus». These data reasonably take into account when the conducting of epidemic surveillance and planning of anti-epidemic measures.

**Keywords:** rotavirus, molecular epidemiological surveillance.

## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ МОНИТОРИНГУ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Коломиец Н.Д.<sup>1</sup>, Тонко О.В.<sup>1</sup>, Ханенко О.Н.<sup>1</sup>, Шмелева Н.Д.<sup>1</sup>, Левшина Н.Н.<sup>2</sup>,  
Фисенко Е.Г.<sup>2</sup>, Гудкова Е.И.<sup>3</sup>, Скороход Г.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования;

<sup>2</sup>Минский городской центр гигиены и эпидемиологии;

<sup>3</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

**Резюме.** Среди резидентной микрофлоры на пищеблоках установлено наличие устойчивости к отдельным антибиотикам и дезинфектантам. Разработка основных принципов организации и проведения микробиологического мониторинга среды технологического окружения позволит установить эффективный контроль распространения возбудителей и развития пищевых отравлений.

**Ключевые слова:** микробиологический мониторинг, внешняя среда, антибиотикорезистентность, пищевые отравления.

**Введение.** Среди предъявляемых к качеству пищи требований одним из основных является отсутствие в них инфекционных агентов. Разумеется, достигнуть нулевого уровня по этому показателю не представляется возможным даже при использовании самых совершенных методов подготовки продуктов. Поэтому желаемой целью является получение пищи с наиболее низким уровнем количества содержащихся в них инфекционных микроорганизмов. Для того чтобы сократить время и количество стадий обработки пищевых продуктов, а также добиться более длительных периодов хранения и транспортировки продуктов питания на более дальние расстояния, прежде чем они достигнут своего потребителя, необходима разработка совершенно новых подходов для контроля надежности сохраняемых продуктов [1].

**Цель исследования:** усовершенствование системы санитарно-гигиенического и эпидемиологического надзора на основании использования данных микробиологического мониторинга с возможностью оценки рисков возникновения эпидемического неблагополучия и как следствие — пищевого отравления.

**Материалы и методы.** Изучение видового состава микроорганизмов объектов окружающей среды и кожи персонала осуществлялось в лаборатории кафедры эпидемиологии и микробиологии БелМАПО. Идентификацию выделенных культур микроорганизмов осуществляли по общепринятым методикам, применяемым в микробиологических лабораториях. Определение чувствительности выделенных микроорганизмов к антибиотикам проводилось двумя методами: диско-диффузионным на среде Мюллер–Хинтон агар и с использованием автоматического микробиологического анализатора VITEK-2 Compact (Bio Merieux, Франция) [2, 3] Испытания устойчивости культур к дезинфектантам проводили по утвержденным методикам [4]. Статистическая обработка цифрового материала с целью определения удельного веса и структуры первичных данных с достоверностью  $p < 0,05$  проводилась с использованием программы EPI INFO.

**Результаты и их обсуждение.** Для санитарно-гигиенической и эпидемиологической характеристики обследованы пищеблока 2-х средних общеобразовательных школ, пищеблок детского дошкольного учреждения ясли-сад с группой недельного пребывания, пищеблок

детской больницы, буфетная родильного дома. Исследованы образцы смывов с поверхностей оборудования, инвентаря, посуды, вспомогательных средств на различных стадиях и этапах производства, раздачи и хранения готовой продукции. Всего исследовано 159 объектов среды технологического окружения пищеблоков. Выделено 150 штаммов микроорганизмов из смывов с поверхностей оборудования, инвентаря, посуды, вспомогательных средств. Оценена их родовая и видовая структура. Структуру составили 79 штаммов грамположительных микроорганизмов ( $52,7 \pm 4,1\%$ ) и 71 штамм грамотрицательных микроорганизмов ( $47,3 \pm 4,1\%$ ).

Основными выделенными видами микроорганизмов из среды технологического окружения пищеблоков были *E. cloacae* ( $20,7 \pm 3,3\%$ ), *S. aureus* ( $14,7 \pm 2,9\%$ ), *S. epidermidis* ( $13,3 \pm 2,8\%$ ), *E. faecalis* ( $8,7 \pm 2,3\%$ ), *S. saprophyticus* ( $8,0 \pm 2,2\%$ ), *K. oxytoca* ( $8,7 \pm 2,3\%$ ), *E. coli* ( $7,3 \pm 2,1\%$ ), *E. faecium* ( $5,3 \pm 1,8\%$ ).

Однако частота выделения микроорганизмов из объектов среды технологического окружения пищеблоков различных типов учреждений имела свои особенности. Так, основными микроорганизмами, выделенными из внешней среды пищеблоков школ являлись грамположительные микроорганизмы ( $58,8 \pm 5,3\%$ ), представленные различными видами стафилококков и энтерококков, в то время как из внешней среды пищеблока детского дошкольного учреждения ясли-сад с группой недельного пребывания в  $31,4 \pm 27,8\%$  случаев выделялись штаммы *E. cloacae* и еще в  $40,0 \pm 8,3\%$  случаев — другие виды грамотрицательных палочек ( $p < 0,05$ ). Распределение штаммов микроорганизмов, выделенных из объектов пищеблоков учреждений здравоохранения также имело свои особенности:  $63,3 \pm 8,8\%$  штаммов были представлены стафилококками, половина из которых составляли *S. epidermidis*, энтерококки не были обнаружены, а из обнаруженных энтеробактерий  $45,5 \pm 15,0\%$  приходилось на *E. cloacae* и  $36,4 \pm 14,5\%$  на *K. oxytoca* ( $p < 0,05$ ).

Данные микробиологического мониторинга устойчивости выделенных штаммов к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам являются важным элементом эпидемиологического надзора и позволяют составить профиль циркулирующих штаммов.

При анализе резистентности стафилококков к антимикробным препаратам, установлено, что  $86,4 \pm 7,3\%$  штаммов устойчивы к пенициллину и оксациллину,  $45,5 \pm 10,6\%$  — к эритромицину,  $18,2 \pm 8,2\%$  — к цефазолину,  $4,5 \pm 4,4\%$  — к ампициллину/клавуланату. Выявлено 2 штамма, устойчивых к ванкомицину ( $9,1 \pm 6,1\%$ ). К рабочим концентрациям антисептиков и дезинфектантов так же выявлены устойчивые штаммы:  $24,5 \pm 6,1\%$  к гексадекону,  $7,8 \pm 3,8\%$  к инкрасепту,  $15,6 \pm 5,4\%$  к дуоциду (табл. 1).

Таблица 1 — Устойчивость-чувствительность к антимикробным препаратам стафилококков, выделенных из объектов внешней среды пищеблоков

Вид штаммов микроорганизмов, выделенных из объектов внешней среды	Число устойчивых-чувствительных штаммов к антибиотикам:						Число устойчивых-чувствительных штаммов к дезинфектантам:					
	пенициллин	оксациллин	цефазолин	эритромицин	ванкомицин	ампициллин-клавуланат	гексадекон 1 % 30 мин	антисепт 1% 30 мин	инкрасепт 1% 30 мин	дуоцид 0,5% 30 мин	криптадезамин	аминоцид
<i>S. aureus</i>	3S/14R	3S/14R	13S/4R	10S/6R/I	15S/2R	15S/R/I	14S/8R	5S	18S/1R	16S/2R	-	-
<i>S. epidermidis</i>	4R	4R	4S	1S/3R	4S	4S	14S/2R	-	18S/2R	14S/2R	4S	4S
<i>S. saprophyticus</i>	R	R	S	R	S	S	9S/2R	-	11S/1R	8S/3R	S	S
Всего	3S/19R	3S/19R	18S/4R	11S/10R/I	20S/2R	20S/R/I	37S/12R	5S	47S/4R	38S/7R	5S	5S

Примечание:

1. S — культура чувствительна;
2. R — устойчива;
3. I — умеренно устойчива.

При оценке резистентности отдельных видов стафилококков к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам не было выявлено достоверных отличий ( $p > 0,05$ ).

Резистентность энтерококков к ампициллину составила  $36,0 \pm 9,6\%$ , к гентамицину —  $40,0 \pm 9,8\%$ , к амоксициллин/клавуланату —  $20,0 \pm 8,0\%$ . Не было выявлено штаммов энтерококков, устойчивых к ванкомицину и линезолиду.

К рабочим концентрациям гексадекона установлено  $12,0 \pm 6,5\%$  устойчивых штаммов энтерококков,  $16,0 \pm 7,3\%$  — к инкрасепту и  $12,5 \pm 6,8\%$  — к дуоциду (таблица 2).

Таблица 2 — Устойчивость-чувствительность к антимикробным препаратам энтерококков, выделенных из объектов внешней среды пищеблоков

Вид штаммов микроорганизмов, выделенных из объектов внешней среды	Число устойчивых-чувствительных штаммов к антибиотикам:					Число устойчивых-чувствительных штаммов к дезинфектантам:			
	ампициллин	гентамицин	амоксициллин/клавуланат	ванкомицин	линезолид	гексадекон 1% 30 мин	анасепт 1% 30 мин	инкрасепт 1% 30 мин	дуоцид 0,5% 30 мин
<i>E. faecalis</i>	8S/5R	8S/5R	11S/2R	13S	13S	11S/2R	S	10S/3R	10S/2R
<i>E. faecium</i>	5S/3R	4S/4R	5S/3R	8S	8S	7S/R	-	7S/R	7S/R
<i>Enterococcus spp.</i>	3S/R	3S/R	4S	4S	4S	4S	-	4S	4S
Всего	16S/9R	15S/10R	20S/5R	25S	25S	22S/3R	S	21S/4R	21S/3R

Примечание:

1. S — культура чувствительна;
2. R — устойчива;
3. I — умеренно устойчива.

Нами так же были изучены профили резистентности к антибиотикам, дезинфектантам и антисептикам энтеробактерий (табл. 3).

Таблица 3 — Устойчивость к антимикробным препаратам энтеробактерий, выделенных из объектов внешней среды пищеблоков

Вид штаммов микроорганизмов, выделенных из объектов внешней среды	Число устойчивых-чувствительных штаммов к антибиотикам:						Число устойчивых-чувствительных штаммов к дезинфектантам:					
	ампициллин	цефазолин	цефалотин	амикацин	гентамицин	ципрофлоксацин	гексадекон 1% 30 мин	анасепт 1% 30 мин	инкрасепт 1% 30 мин	дуоцид 0,5% 30 мин	криптадеза-мин	аминоцид
<i>E. cloacae</i>	2S/I/16R	2S/17R	I/18R	19S	19S	19S	27S/4R	4S	16S/5R	23S/5R	-	-
<i>C. freundii</i>	2R	2R	2R	2S	2S	2S	7S/2R	R	6S/3R	3S/5R	-	-
<i>C. diversus</i>	2S/R	2S/R	2S/R	3S	3S	3S	4S	-	4S	4S	-	-
<i>K. oxytoca</i>	S/5R	S/5R	6R	6S	6S	6S	8S/5R	-	13S	10S/3R	-	-
<i>E. coli</i>	S/8R	3S/6R	S/8R	9S	9S	9S	7S/3R	3S	11S	5S/2R	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	2R	S/R	2R	2S	2S	2S	-	-	2S	-	2S	2S
Всего энтеробактерии	6S/I/34R	9S/32R	3S/I/37R	41S	41S	41S	53S/14R	7S/R	36S/8R	45S/11R	3S	3S

Примечание:

1. S — культура чувствительна;
2. R — устойчива;
3. I — умеренно устойчива.

При анализе резистентности энтеробактерий к антимикробным препаратам, установлено, что  $82,9 \pm 5,9\%$  штаммов устойчивы к ампициллину,  $78,0 \pm 6,5\%$  к цефазолину,  $90,2 \pm 4,6\%$  к цефалотину. Не обнаружено устойчивых штаммов к амикацину, гентамицину, ципрофлоксацину. К рабочим концентрациям антисептиков и дезинфектантов выявлено устойчивых штаммов:  $20,9 \pm 5,0\%$  к гексадекону,  $12,5 \pm 11,7\%$  к анасепту,  $18,2 \pm 5,8\%$  к инкрасепту,  $19,6 \pm 5,3\%$  к дуоциду.

При оценке резистентности отдельных родов энтеробактерий к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам не было выявлено значимых достоверных отличий ( $p > 0,05$ ).

**Выводы.** В связи с вышеизложенным разработана основных принципов организации и мониторинга микроорганизмов из среды технологического окружения с целью создания эффективного контроля распространения возбудителей и формирования устойчивости к антибиотикам и дезинфектантам на объектах общественного питания и обеспечение надлежащей гигиены актуальной как в научном плане, так и для практической работы гигиенистов и эпидемиологов.

#### Литература

1. Джей, Дж.М. Современная пищевая микробиология / Дж.М. Джей, М.Дж. Лессинер, Д.А. Гольден; пер. 7-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 886 с.
2. Оптимизированные методы количественного выявления санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Республики Беларусь 19.03.2010 № 074-0210 / Н.Д. Коломиец [и др.]; БелМАПО. – Минск, 2010. – 12 с.
3. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Республики Беларусь 11.11.2008 № 226-12.
4. Устройство для определения устойчивости бактерий к дезинфектантам: пат. 5420 Респ. Беларусь, МПК (2006) А 61L 2/16, С 12M 1/00 / Е.И. Гудкова, Г.А. Скороход, А.А. Адарченко; заявитель Белорус. гос. мед. ун-т. – № 20080795; заявл. 27.10.2008; опубл. 30.08.2009 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. ўласнасці. – 2009. – № 4.

Поступила 20.08.2012

## MODERN APPROACHES TO MIKROBIOLOGICAL ENVIROMENTAL MONITORING

**Kolomiets N.D.<sup>1</sup>, Tonko O.V.<sup>1</sup>, Hanenko O.N.<sup>1</sup>, Shmeleva N.D.<sup>1</sup>, Levshina N.N.<sup>2</sup>,  
Fisenko E.G.<sup>2</sup>, Gudkova E.I.<sup>3</sup>, Skorokhod G.A.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education;*

<sup>2</sup>*Minsk City Center for Hygiene and Epidemiology;*

<sup>3</sup>*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

Among the resident microflora in the nutrition unit established the presence of resistance to some antibiotics and disinfectants. Development of guidelines for organizing and conducting the microbiological monitoring of the technological environment in order to allow the environment to establish an effective control of the spread of pathogens and the development of food poisoning.

**Keywords:** microbiological monitoring, external environment, antimicrobial resistance, food poisoning.

## СОЦИАЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

**Мамчиц Л.П.**

*Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь*

**Резюме.** В Гомельской области ежегодно вовлекается в эпидемический процесс от 14,3 до 36,5% жителей, из них 40% болеют один раз в течение года острыми респираторными инфекциями (ОРИ), 41,1% — 2-3 раза в течение года, 7,1% переносят ОРИ 4 и более раз в год. В работе дана пространственно-временная характеристика проявлений эпидемического процесса ОРИ среди населения Гомельской области за 50 лет (1962–2011), что позволило выявить наиболее устойчивые эпидемиологические закономерности эпидемического процесса в области, оценить социальную значимость данной группы инфекций в современных условиях.

**Ключевые слова:** острые респираторные инфекции, Гомельская область, заболеваемость, территориальное распределение, смертность, социальная значимость.

**Введение.** Острые респираторные инфекции (ОРИ) являются наиболее распространенной патологией населения и одной из важных проблем здравоохранения во всех странах мира [1]. ОРИ имеют широкое распространение в европейских странах, в развивающихся странах ежегодно от данных инфекций и их осложнений умирает 4 млн детей [2].

Одной из трех главных причин смерти у людей в мире являются инфекционные болезни, а в числе 7 наиболее важных из них названы ОРИ и грипп [3]. Заболевания ОРИ регистрируются постоянно. Спорадическая заболеваемость не прекращается даже в летние месяцы, и это обеспечивает непрерывность эпидемического процесса данной группы инфекций [4]. На эпидемический процесс ОРИ оказывают влияние социальные и природные факторы. Широкая распространенность данных инфекций объясняется легкостью передачи возбудителя от человека к человеку, замкнутостью коллективов, отсутствием стойкого иммунитета после перенесенной инфекции и, в целом, снижением иммунной защиты у жителей больших городов (вследствие загрязнения атмосферного воздуха и др.) [5, 6].

По нашим данным, 40% жителей Гомельской области болеют один раз в течение года ОРИ, 41,1% — 2-3 раза в течение года, 7,1% переносят ОРИ 4 и более раз, доля лиц, ни разу не болевших ОРИ в течение года, не превышает 11% [7–9].

**Цель исследования:** на примере Гомельской области изучить проявления эпидемического процесса заболеваемости острыми респираторными инфекциями за 50-летний период с 1962 по 2011 гг. и определить социальную значимость данной группы инфекций в современных условиях.

**Материалы и методы.** Использованы данные официального учета заболеваемости острыми респираторными инфекциями ГУ «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» с 1962 по 2011 гг., данные РУП «Вычислительный центр Главного статистического управления по Гомельской области». Для более детальной характеристики проявлений эпидемического процесса выделено 5 временных промежутков с одинаковым количеством лет, но различающихся по совокупности социально-экономических тенденций развития общества, демографической ситуации, экологической обстановки, организации профилактической работы и др.: первый период — 1962–1970 гг., второй период — 1971–1980 гг., третий период — 1981–1990 гг., четвертый период — 1991–2000 гг., пятый период — 2001–2011 гг.

Применен метод эпидемиологической диагностики — ретроспективный эпидемиологический анализ. Обработка данных проводилась с помощью статистических методов и компьютерных программ Microsoft Word 2007 и Microsoft Office Excel 2007. Статистические методы применялись для оценки интенсивных и экстенсивных показателей, средних величин, установления достоверности результатов исследования и их различий. Распространенность острых респираторных инфекций на отдельных территориях оценивалась по показателям заболеваемости, рассчитанным на 100 тыс. населения. При дифференциации территорий по уровням заболеваемости ОРИ использовано разделение территорий на квартили, характеризующиеся одинаковыми или близкими показателями заболеваемости населения. При таком подходе территории, входившие в первый квартиль, характеризовались низкой заболеваемостью, на территориях второго квартиля заболеваемость была средней, третьего — высокой, а для территорий четвертого квартиля характерной была очень высокая заболеваемость.

**Результаты и их обсуждение.** В структуре основных нозологических форм инфекционных заболеваний среди населения Гомельской области удельный вес острых респираторных инфекций составлял  $80,0 \pm 4,37\%$ , гриппа —  $16,86 \pm 3,43\%$  [7–9]. Среднеголетний показатель заболеваемости ОРИ в Гомельской области за анализируемый 50-летний период составил 20483,0 на 100 тыс. населения с колебаниями от 12240 на 100 тыс. населения в 1969 г. до 36556,7 на 100 тыс. населения в 2011 г. В эпидемический процесс ежегодно вовлекалось от 14,3 до 36,5% населения области.

Эпидемическая тенденция, как известно, является отражением влияния на заболеваемость постоянно действующих причин. В пределах указанного диапазона изменения годовых показателей заболеваемости характеризовались относительно прямолинейной зависимостью, что выразилось в значительной тенденции к росту со средним темпом ежегодного прироста (Тпр) – +12,07% (рисунок 1).

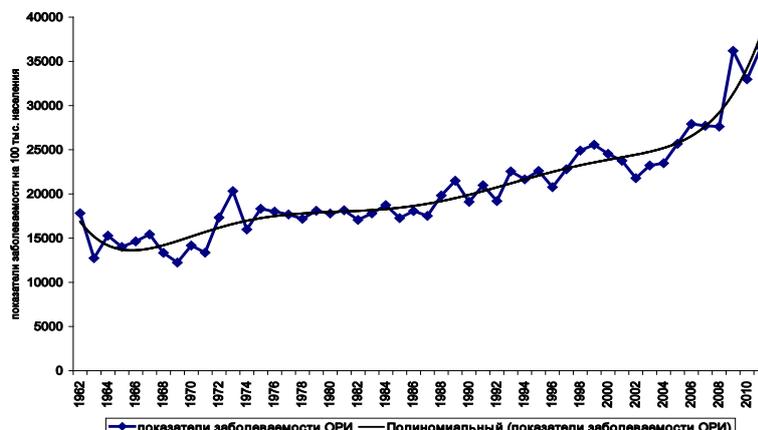


Рисунок 1 — Многолетняя динамика и эпидемическая тенденция заболеваемости острыми респираторными инфекциями в Гомельской области за 1962-2011 гг.

На фоне однонаправленной тенденции выявлены различные значения среднего темпа прироста в различные временные периоды. В пределах изучаемых 10-летних периодов тенденции развития эпидемического процесса ОРИ отличались по степени выраженности и направленности (табл.).

Таблица — Тенденции развития эпидемического процесса острых респираторных инфекций в разные периоды

Периоды	Темпы прироста, %	Средняя заболеваемость на 100 тыс. населения
1962–1970	-1,97	14403,00
1971–1980	1,19	17406,3
1981–1990	0,05	18502,52
1991–2000	2,79	22856,74
2001–2011	5,79	27897,87

В первом периоде активность причин, формирующих заболеваемость острыми респираторными инфекциями на территории Гомельской обл., была невысокой и способствовала снижению уровней заболеваемости, во втором периоде заболеваемость характеризовалась умеренной тенденцией к росту. Третий период характеризовался стабильной заболеваемостью острыми респираторными инфекциями и невысокими уровнями заболеваемости ОРИ. Начиная с 1993 г. отмечалась умеренно выраженная тенденция к росту заболеваемости ОРИ, в начале нового столетия темпы роста заболеваемости стали более выраженными. Эпидемическая ситуация по острым респираторным инфекциям в Гомельской обл. после достигнутого в 80-е гг. благополучия с 1993 г. заметно ухудшилась. На это, можно предположить, повлияли социально-экономические и демографические процессы в обществе. Если в 80-е гг. средний показатель заболеваемости ОРИ составлял 18505,52 на 100 тыс. населения, то в первое десятилетие XXI в. он возрос в 1,5 раза и составил 27897,87 на 100 тыс. населения, а размах между минимальным и максимальным уровнем заболеваемости за анализируемый промежуток времени составил 3 раза.

Многолетняя динамика заболеваемости острыми респираторными инфекциями характеризовалась четко выраженной периодичностью. Один полный цикл, включавший завершенный подъем и спад заболеваемости ОРИ, составлял от 5–6 до 7–8 лет. В течение анализируемого времени в развитии эпидемического процесса острыми респираторными инфекциями завершились 5 полных циклов. При этом подъемы заболеваемости продолжались от 1–2 и 3–4 лет, а продолжительность спадов составляла 3–4 года.

Применение эпидемиолого-географического метода позволило в пределах региона дифференцировать территории по уровням заболеваемости острыми респираторными инфекциями. При разделении диапазона среднесноголетних показателей заболеваемости на 4 квартиля в каждом из них выделены группы территорий, характеризующиеся близкими показателями заболеваемости внутри группы и различающиеся по этим параметрам между группами (рисунок 2).

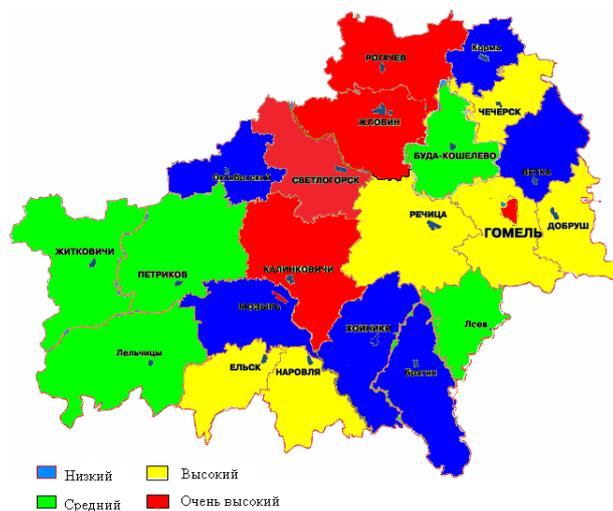


Рисунок 2 — Территориальное распределение заболеваемости ОРИ по районам Гомельской области за 2000–2011 гг.

Первый квартиль составили территории с низким уровнем заболеваемости (0–11,8 тыс. на 100 тыс. населения). В эту группу вошли территории Брагинского, Ветковского, Кормянского, Мозырского, Октябрьского и Хойникского р-нов.

Второй квартиль составили территории Буда-Кошелевского, Житковичского, Лельчицкого, Лоевского и Петриковского р-нов. Здесь отмечен средний уровень заболеваемости ОРИ, который составил 12,01–16,1 тыс. на 100 тысяч населения.

Высокие уровни заболеваемости зарегистрированы в Гомельском, Добрушском, Ельском, Наровлянском, Речицком и Чечерском р-нах. Показатели заболеваемости в этих районах вошли в диапазон третьего квартиля и составили 16,51–22,4 тыс. на 100 тыс. населения.

Четвертый квартиль составили территории с очень высокими показателями заболеваемости (22,52–36,5 тыс. на 100 тыс. населения). Это территории Жлобинского, Калининковского, Рогачевского, Светлогорского р-нов, г. Гомель и г. Мозырь. Данная дифференциация территорий по уровням заболеваемости приведена на примере последнего десятилетия. В другие периоды в отдельные годы происходило перемещение территорий из одного в другой квартиль с небольшими колебаниями в уровнях заболеваемости, но в целом можно отметить, что как в эпидемически неблагоприятные, так и в благоприятные годы территориальное распределение заболеваемости ОРИ менялось несущественно. Это свидетельствует о том, что на отдельных территориях сложились комплексы факторов, действующих на заболеваемость постоянно и формирующих относительно стабильные уровни заболеваемости ОРИ.

Заболевания острыми респираторными инфекциями регистрировались в течение всего года, годовая динамика заболеваемости распределялась неравномерно. Подъем заболеваемости начинался в октябре и заканчивался в конце марта. Максимум чаще приходился на ноябрь и февраль, минимальный уровень регистрировался в июле. Различия в годовой динамике заболеваемости ОРИ в эпидемически благополучные и неблагополучные годы состояли, прежде всего, в том, что в эпидемически неблагополучные годы уровни заболеваемости в каждом месяце были выше, чем в годы эпидемического благополучия.

Подъем заболеваемости в осенне-зимний период связан с погодными и климатическими условиями, снижением иммунного статуса населения в этот период, большой скученностью людей и активацией механизмов и путей передачи инфекции.

Анализ заболеваемости в социальных группах позволяет выявить эпидемически значимые группы, на которые следует обратить особое внимание при планировании и проведении противоэпидемических мероприятий.

За анализируемый период в эпидемический процесс чаще стали вовлекаться дети в возрасте до 14 лет, удельный вес их в общей структуре заболеваемости ОРИ возрос с 44,3 до 62,8% по среднегодовалым данным (рисунок 3).

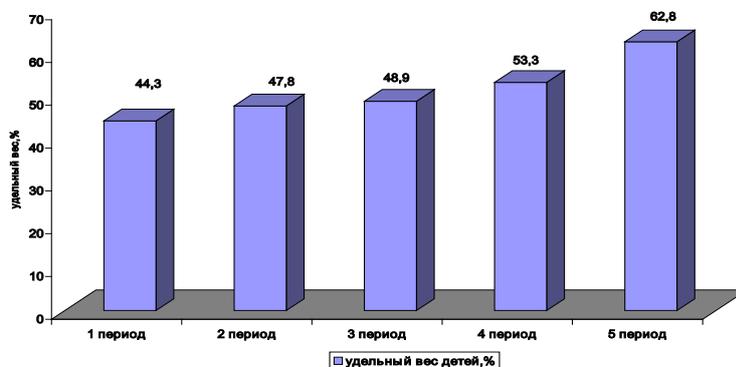


Рисунок 3 — Удельный вес детского населения в возрасте до 14 лет в общей структуре заболеваемости острыми респираторными инфекциями

Наибольшую значимость в развитии эпидемического процесса ОРИ имел комплекс постоянно действующих социальных факторов: 1) численность населения, проживающего на конкретной территории; 2) численность и удельный вес детей в возрасте 0–14 лет в структуре населения; 3) численность детских дошкольных учреждений и численность детей в дошкольных учреждениях; 4) общая численность учеников в общеобразовательных школах; 5) численность и удельный вес городских жителей в структуре населения; 6) численность автобусного парка для пассажирских перевозок; 7) загрязнение атмосферного воздуха (кратность превышения ПДК) [7–9].

Одними из показателей для оценки социальной значимости заболеваний является смертность населения. Показатели смертности при современной структуре инфекционной заболеваемости утратили значение как ведущий критерий социального значения и роли ОРИ в патологии человека. Однако при оценке проблем противоэпидемического обслуживания отдельных социально-возрастных групп населения этот показатель и в настоящее время сохраняет свое значение.

В течение 1981–2011 гг. в Гомельской обл. заболевания ОРИ явились причиной смерти в 534 случаях (без учета гриппа). Среднегодовой показатель смертности по причине ОРИ составил 1,097 на 100 тыс. населения. За изучаемый период смертность от ОРИ в Гомельской обл. имела выраженную тенденцию к снижению со среднегодовым темпом 21,8% (рисунок 4).

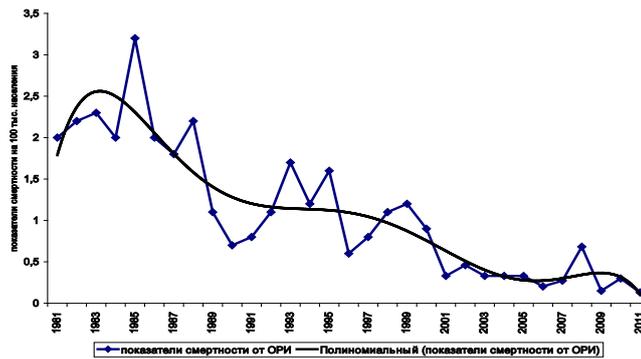


Рисунок 4 — Многолетняя динамика смертности от острых респираторных инфекций в Гомельской обл.

Наиболее высокие показатели смертности от ОРИ зарегистрированы в эпидемически неблагоприятные годы по заболеваемости (1993, 1999, 2009, 2010 гг.).

**Выводы.** В целом рост заболеваемости населения острыми респираторными инфекциями, увеличение доли детского населения в общей структуре заболеваемости диктует необходимость оптимизации существующей системы профилактики заболеваний:

- профилактические мероприятия должны проводиться на всей территории Гомельской области. При этом особое внимание должно быть уделено территориям с наиболее высокими уровнями заболеваемости;

- профилактические мероприятия должны проводиться в течение всего года. Очень важно приурочить профилактические мероприятия к началу осеннего и весеннего подъёмов заболеваемости. Сроки начала активного проведения профилактики следует определять с учетом результатов эпидемиологического анализа заболеваемости ОРИ на каждой территории;

- основные усилия следует сконцентрировать на группах населения, имеющих наибольшую эпидемическую значимость в эпидемическом процессе. В первую очередь такой группой является детское население;

- в работе по предупреждению неблагоприятных исходов следует учитывать группы и территории риска по смертности ОРИ.;

- особое внимание должно быть обращено на качество всех проводимых мероприятий с последующим анализом их эффективности и принятием управленческих решений с учетом региональных особенностей заболеваемости.

#### Литература

1. Инфекционная заболеваемость на территории Беларуси в конце XIX, в XX веке и проблемы борьбы с инфекционной патологией в XXI столетии / Л.П. Титов [и др.] / Роль антропогенных и природных патогенов в формировании инфекционных и неинфекционных болезней человека: материалы междунар. конф. – Минск, 2002. – С. 3–25.
2. Osinusi, K. Acute laryngotracheobronchitis in Nigerian children / K. Osinusi, W.B. Johnson, W.I. Aderole // West Afr. J. Med. – 1999. – Vol. 18, № 1. – P. 1–5.
3. To assess the incidence of acute respiratory infections and bacterial colonization in children attending a daycare center / E. Nandi-Lozano [et al.] // Salud Publica Mex. – 2002. – Vol. 44, № 3. – P. 201–206.
4. Карпухин, Г.И. Диагностика, профилактика и лечение острых респираторных заболеваний // Г.И. Карпухин, О.Г. Карпухина / СПб.: Изд-во «Гиппократ», 2000. – 179 с.
5. Батова, О.В. Профилактика респираторных вирусных инфекций / О.В. Батова, М. Башкова Н, Т.А. Попова // Эпидемиология XXI века: материалы 8-го съезда Всерос. о-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол.: сб. ст. в 4-х т. –М., 2002. – Т. 1. – С. 6–7.
6. Мамчиц, Л.П. Острые респираторные заболевания по данным анкетирования / Л.П. Мамчиц, Г.Н. Чистенко // Мед. новости. – 1999. – № 7. – С. 48–50.
7. Чистенко, Г.Н. Особенности территориального распространения острых респираторных заболеваний /

Г.Н. Чистенко, Л.П. Мамчиц, В.И. Ключенович // Достижения отечественной эпидемиологии в XX веке. Взгляд в будущее. – СПб., 2001. – С. 145–146.

8. Мамчиц, Л.П. Эпидемиологические закономерности и совершенствование профилактики острых респираторных заболеваний / Л.П. Мамчиц, Г.Н. Чистенко // Достижения медицинской науки Беларуси: рец. науч.-практ. ежегодник. – Минск: ГУ РНМБ, 2004. – Вып. 9. – С. 142–143.

9. Мамчиц, Л.П. Эпидемиологические закономерности острых респираторных заболеваний и совершенствование их профилактики: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.30 / Л.П. Мамчиц; НИИ эпидемиологии и микробиологии. – Минск, 2003. – 22 с.

Поступила 04.09.2012

## SOCIAL SIGNIFICANCE OF ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS IN PRESENT-DAY CONDITIONS

**Mamchits L.P.**

*Gomel State Medical University, Gomel, Belarus*

In Gomel region, from 14.3% to 36.5% of the population are involved in the epidemic process each year, of them, 40.0% suffer from ARI every year, 41,1% twice or three times a year, 7 1% have ARI four or more times a year. This work presents the spatial and temporal characteristics of the epidemic manifestations of acute respiratory infections among the population in Gomel region for the period of 50 years from 1962 to 2011, which made it possible to reveal the most persistent epidemiological patterns of the epidemic process and to assess the social significance of this group of infections in present-day conditions.

**Keywords:** acute respiratory infections, Gomel region, incidence, geographical distribution, mortality, social significance.

## ГЕНОТИПИРОВАНИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСОВ КОРИ, ВЫЯВЛЕННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2004–2011 ГГ.

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

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В работе представлены результаты молекулярно-эпидемиологического мониторинга кори в Республике Беларусь за 2004–2011 гг. Всего за этот период вирусы кори были изолированы от 65 больных (2004 г. — 1, 2006 г. — 47, 2010 г. — 1, 2011 г. — 15). Выполненное секвенирование С-терминальной области N-гена (450 нуклеотидов) показало, что вирусы относились к 4 различным генотипам: D6 (D6, Турция и D6, Украина), D5, D8 и D4. Результаты молекулярно-генетического анализа вирусов и эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что выявляемые в последние 8 лет на территории Республики Беларусь случаи кори являлись завозными или связанными с завозными. Несмотря на многочисленные завозы вирусов различных генотипов на территорию страны, восстановления эндемичной циркуляции вируса кори в Республике Беларусь не произошло.

**Ключевые слова:** заболеваемость, вирус кори, генотип.

**Введение.** Корь — вирусное инфекционное заболевание, которое уже в течение многих лет является вакциноуправляемым. Вирус кори относится к семейству *Paramyxoviridae*, роду *Morbillivirus*. Геном вируса представлен одноцепочечной минус-нитевой РНК, длиной около 16000 пар нуклеотидов, кодирующих 6 структурных (N, P, M, F, H, L) и 3 неструктурных (С, V, R) белка. Несмотря на то что все вирусы кори относятся к одному серотипу, молекулярно-генетическое изучение вируса позволяет дифференцировать его различные генотипы. Для генотипирования вирусов кори принято исследовать наиболее вариабельный участок генома — С-терминальную область N-гена длиной 450 нуклеотидов. На основании

генетической характеристики вируса было определено 8 групп (А-Н) и 24 генотипа вирусов кори. Большинство генотипов вируса имеет характерное географическое распределение. Молекулярно-генетическое изучение вируса с последующим его филогенетическим анализом дает возможность отслеживать пути трансмиссии вируса, устанавливать связь между отдельными случаями и вспышками инфекции, определять происхождение вируса и идентифицировать местные, завозные и связанные с завозными случаи кори.

Молекулярно-эпидемиологический мониторинг кори в настоящее время представляет особую актуальность ввиду поставленной Европейским региональным бюро Всемирной организации здравоохранения (ЕРБ ВОЗ) цели элиминировать корь в регионе к 2015 г. Возможность провозглашения такой цели была обусловлена успехами в снижении заболеваемости, достигнутыми благодаря массовой вакцинации. В целом только за последние 20 лет заболеваемость корью в регионе снизилась с 300000 случаев в год (начало 1990 гг.) до 6000–8000 тыс. в год в 2006–2009 гг. [1]. На фоне успехов, достигнутых в реализации этой цели, в 2010–2011 гг. ситуация осложнилась, рост заболеваемости был отмечен в 40 странах, число выявленных в 2011 г. заболевших превысило 34000 [2]. В одних странах заболеваемость была чрезвычайно высокой (Франция — более 15000 случаев, Италия — более 5000, Румыния — более 4000, Испания — около 2000, Германия — около 2000), в других регистрировались завозные случаи кори с их ограниченным распространением.

В Республике Беларусь вакцинация против кори, проводимая с 1967 г., привела к существенному снижению заболеваемости. Если в довакцинальный период заболеваемость колебалась от 500 до 850 случаев на 100 000 населения, то начиная с 2000 г. заболеваемость составляет менее 1 на 100000 населения, за исключением 2006 г., когда она достигла 1,52 на 100000 (149 случаев заболевания). В отдельные годы корь в стране вовсе не регистрировалась (2008 и 2009 гг.) или выявлялось по одному случаю инфекции (2005, 2007, 2010 гг.). При низком уровне заболеваемости молекулярно-эпидемиологический мониторинг циркуляции вируса представляет особую актуальность, поскольку только на основании его результатов можно установить, имеет ли вирус эндемичное распространение в стране или регистрируемые случаи связаны с завозами инфекции извне. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг кори в Республике Беларусь проводится с 2004 г. В данной работе мы представляем результаты молекулярно-генетического изучения вирусов кори, выявленных в Республике Беларусь за 8-летний период (2004–2011 гг.)

**Материалы и методы.** Лабораторному исследованию был подвергнут клинический материал (гепаринизированная кровь, сыворотка крови, носоглоточный смыв [НГС], моча) от подозрительных в отношении кори пациентов, выявленных в Республике Беларусь в 2004–2011 гг. Исследования были выполнены в Республиканской лаборатории по диагностике кори и краснухи, аккредитованной ВОЗ. Клинический материал доставлялся в лабораторию в соответствии с приказом МЗ РБ №162 от 10.10.2003 г. «Об утверждении Программы элиминации кори, профилактики эпидемического паротита, краснухи и врожденной краснушной инфекции в Республике Беларусь на 2003–2010 годы» и приказа МЗ РБ №451 от 1.06.2006 г. «О совершенствовании эпидемиологического надзора за корью».

Изоляцию вируса кори выполняли путем инокуляции мононуклеаров периферической крови в клетки Vero-SLAM и инкубированием их при температуре 37 °С в течение 7 дней.

Выделение вирусной РНК из НГС, сыворотки крови и культуральной жидкости, полученной после появления вирусного цитопатического эффекта, выполняли с использованием набора «QIAamp Viral RNA Mini Kit» (QIAGEN, Германия). Идентификацию вируса кори проводили в ОТ-ПЦР в один раунд с использованием набора реагентов «QIAGEN OneStep RT-PCR Kit» (QIAGEN, Германия) с праймерами, разработанными J.R. Kremer et al. [3]. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере, pH 8,5 (0,04М трис-ацетат, 0,002М ЭДТА) с добавлением красителя GelStar Gel Stain (Lonza, США).

Аmplифицированный в ходе ПЦР фрагмент ДНК вырезали из геля, очищали с использованием набора QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия) и секвенировали в обоих направлениях с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США) на капиллярном секвенаторе (Model 3100 Avant, Applied Biosystems, США) или с использованием набора «GenomeLab™DTCS — Quick Start Kit» (Beckman Coulter, США) на капиллярном секвенаторе CEQ 8000 (Beckman Coulter, США), применяя ПЦР праймеры в качестве праймеров для секвенирования.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием алгоритма Clustal W, встроенного в программу BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0. Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA версии 5. Эволюционные расстояния между последовательностями определяли на основании двухпараметрической модели эволюции Кимура. Достоверность топологий филограм оценивали методом псевдореплик (анализировались 1000 псевдореплик) [4].

**Результаты и их обсуждение.** В результате проведенного исследования клинического материала от подозрительных на корь пациентов удалось выделить вирус кори или обнаружить его РНК у 65 человек (2004 г. — 1, 2006 г. — 47, 2007 г. — 1, 2010 г. — 1, 2011 г. — 15). Во всех 65 случаях за исключением одного диагноз кори также был подтвержден выявлением IgM антител в сыворотке крови.

Анализ нуклеотидной последовательности С-терминальной области N-гена (450 нуклеотидов) 65 вирусов кори позволил обнаружить их принадлежность к четырем различным генотипам — D4, D5, D6, D8. Среди вирусов, относящихся к генотипу D6, было выявлено несколько генотипов (табл.). Всем выявленным вирусам был присвоен номер в соответствии с рекомендациями ВОЗ (сокращенное название вируса с указанием, выделен ли вирус в культуре клеток или вирусная РНК выявлена только в клиническом материале; название населенного пункта и страна, где был выявлен пациент, от которого выделен вирус; время сбора клинического материала — эпидемическая неделя и год, а также номер изолята, если в течение одной эпидемической недели выявлены вирусы более чем от одного пациента). Информация о выявленных вирусах была представлена в Международную базу данных MeaNS ([http://www.who-measles.org/Public/Web\\_Front/main.php](http://www.who-measles.org/Public/Web_Front/main.php)).

Таблица — Результаты обнаружения и генотипирования вирусов кори, Республика Беларусь, 2004-2011 гг.

Годы	Число выявленных случаев кори	Заболеемость на 100 000 населения	Число выявленных и генотипированных вирусов кори	Генотип вируса
2004	1	0,01	1	D6, Турция
2005	1	0,01	0	-
2006	152	0,15	47	D6, Украина
2007	1	0,01	1	D5
2008	0	0	0	
2009	0	0	0	
2010	1	0,01	1	D8
2011	51	0,05	15	D4, D8
2004–2011	207	0,02	65	

Как правило, результаты генотипирования вирусов соответствовали эпидемиологическим данным, полученным на каждого заболевшего. Комплексная эпидемиологическая информация и информация по молекулярно-генетическому исследованию вируса использовались для установления его происхождения. Так, в 2004 г. вирус кори генотипа D6 был изолирован от обследованной из г. Минска, которая за 7 дней до

начала заболевания прибыла из Армении. Как известно, в 2004 г. в Армении регистрировалась крупная вспышка кори (1783 случая). Результаты молекулярно-генетического изучения изолированного вируса показали, что в соответствии с утвержденной ВОЗ номенклатурой он принадлежал к генотипу D6 (вариант «Турция») (рисунок). Вирус получил наименование MVi/Minsk.BLR/28.04 и под этим именем был депонирован в международную базу данных. Согласно данным литературы этот же вариант вируса вызвал крупную вспышку кори в Турции в 2000 г. и впоследствии широко циркулировал во многих странах Европы [5].

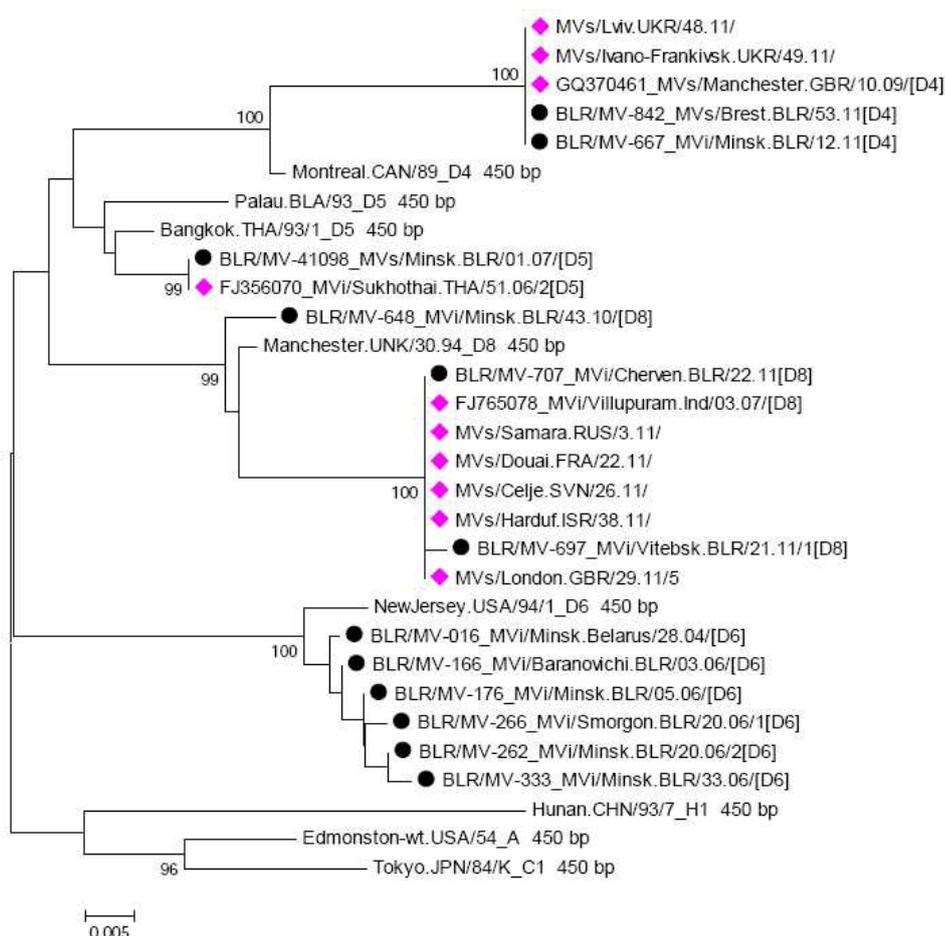


Рисунок — Филогенетические связи вирусов кори, выявленных в Беларуси в 2004–2011 гг.

При сравнении нуклеотидных последовательностей фрагмента N-гена 47 вирусов кори, изолированных в 2006 г., с референс-штаммами было установлено, что все они принадлежат к генотипу D6 (вариант «Украина»). Однако не все исследованные вирусы являлись абсолютно идентичными. Максимальная варибельность между нуклеотидными последовательностями различных штаммов составила 0,67%. Среди вирусов кори генотипа D6 прослеживалось существование 5 различных генетических вариантов, условно обозначенных нами как D6/a, D6/b, D6/c, D6/d, D6/e. Учитывая тот факт, что вирус кори является одним из наиболее стабильных РНК-содержащих вирусов, а генотип D6 — наиболее стабильным из всех известных генотипов вируса кори, вероятность появления новых генетических вариантов вируса за счет накопления мутаций в процессе циркуляции на территории Республики Беларусь в течение относительно непродолжительного времени чрезвычайно мала [6]. Выявление нескольких генетических вариантов вируса кори указывало на существование множественных заносов возбудителя на территорию страны. Эпидемиологические данные также подтверждали завозы из различных регионов Украины (Киев, Одесса, Хмельницкая область, Крым).

Вирус MVs/Minsk.BLR/01.07, вызвавший единичный случай кори в г. Минске в 2007 г., согласно данным молекулярно-генетического исследования принадлежал к генотипу D5. Вирус был выделен от женщины, недавно прибывшей из Таиланда. Известно, что вирусы генотипа D5 являются эндемичными для стран Юго-Восточной Азии [7]. Согласно молекулярно-эпидемиологическим данным этот случай кори был классифицирован как завозной из Таиланда.

Вирус кори, принадлежащий к генотипу D8, выявленный в 2010 г. (MVi/Minsk.BLR/43.10), был изолирован от пациента М.Е., проживающего в г. Минске, и не выезжавшего за пределы страны в течение всего возможного инкубационного периода инфекции. Анализ нуклеотидных последовательностей всех вирусов кори генотипа D8, представленных в Международном генетическом банке данных, показал, что вирусов с абсолютно идентичной нуклеотидной последовательностью выявлено не было. Наименьший уровень различий (0,4%, 2 нуклеотида) обнаружен с вирусами, выделенными в конце 2009 г. в северных районах Индии (коды доступа HQ141406, GU561991). Проведенный с целью выявления возможного источника инфицирования ретроспективный эпидемиологический анализ показал, что за две недели до появления заболевания данный пациент (М.Е.) был в контакте с другим лицом (Д.Я.) с температурой и сыпью, который заболел вскоре после посещения Индии. Вероятнее всего этот недиагностированный завозной случай кори (Д.Я.) и являлся индексным случаем. Случай с выделением вируса являлся вторичным и был классифицирован как связанный с завозным.

Неблагоприятная ситуация в Европейском регионе в целом в 2011 г. отразилась и на заболеваемости корью в Республике Беларусь. В марте 2011 г. в г. Минске и в мае 2011 г. в г. Витебске было выявлено по одному случаю кори (по эпидемиологическим данным оба завезены из Германии), вызванному вирусами генотипов D4, Манчестер (MVi/Minsk.BLR/12.11), и D8 (MVi/Vitebsk.BLR/21.11/1), соответственно. Оба случая не получили дальнейшего распространения в Республике Беларусь.

В мае-июле 2011 г. в Минской области (в основном Червенский р-н) была выявлена вспышка кори (47 заболевших). Этиологическим агентом вспышки явился вирус генотипа D8. Был выявлен единичный случай завоза этого вируса и в г. Минск (заболела девочка 2 лет после посещения родственников в Червенском районе). Во время этой вспышки вирусы кори были изолированы от 15 больных (MVi/Cherven.BLR/22.11, MVi/Cherven.BLR/24.11.1, MVi/Cherven.BLR/24.11.2, MVi/Cherven.BLR/24.11.3, MVi/Cherven.BLR/24.11.4, MVi/Puhovichi.BLR/24.11.1, MVi/Puhovichi.BLR/24.11.2, MVi/Cherven.BLR/25.11.1, MVi/Cherven.BLR/25.11.2, MVi/Cherven.BLR/25.11.3, MVi/Cherven.BLR/24.11.4, MVi/Cherven.BLR/28.11, MVi/Cherven.BLR/29.11). Несмотря на то, что отмечалась достаточно интенсивная циркуляция вируса генотипа D8 на ограниченной территории, к середине июля она прекратилась (во многом благодаря проведенным мероприятиям по дополнительной иммунизации в очагах инфекции), и восстановления эндемичной циркуляции вируса кори не произошло. Анализ нуклеотидных последовательностей, представленных в международных генетических базах данных GenBank и MeaNS, показал, что вирусы этого генетического варианта впервые были выявлены в 2007 г. в южных областях Индии, но уже в 2011 г. в разных странах европейского региона (Великобритания, Словения, Франция, Россия) обнаруживали спорадические случаи кори, вызванные данным геновариантом.

В конце декабря 2011 г. в стране был выявлен еще один заболевший корью в г. Бресте. Выявленный в клиническом материале вирус (MVi/Brest.BLR/53.11) принадлежал к генотипу D4, Манчестер. Этот вирус получил ограниченное распространение на территории г. Бреста, где в январе 2012 г. послужил этиологическим агентом еще 5 случаев заболевания. Согласно результатам мониторинга циркуляции вирусов кори в Европейском регионе известно, что именно вариант генотипа D4, Манчестер вызвал крупную вспышку кори во Франции в 2011 г.

и впоследствии выявлялся в других странах Европы (Испания, Бельгия, Люксембург, Португалия, Нидерланды, Греция, Турция), а также получил распространение на территории Украины и России.

Таким образом, представленные данные молекулярной эпидемиологии кори свидетельствуют о том, что выявляемые в последние 8 лет на территории Республики Беларусь случаи кори являются завозными или связанными с завозными. Несмотря на многочисленные завозы вирусов различных генотипов на территорию страны, восстановления эндемичной циркуляции вируса кори в Республике Беларусь не произошло, что явилось результатом проводимых в течение нескольких десятилетий мероприятий по вакцинопрофилактике и совершенствованию системы эпидемиологического надзора за корью.

#### **Литература**

1. Molecular genotyping and epidemiology of measles virus transmission in the World Health Organization European region 2007–2009 / Mankertz A. [et al.] // *J. Inf. Dis.* – 2011. – Suppl. 1. – P. 335–342.
2. Increased transmission and outbreaks of measles – European region, 2011 / R. Martin [et al.] // *MMWR.* – 2011. – Vol. 60, № 47. – P. 1605–1610.
3. Genotyping of recent measles virus strains from Russia and Vietnam by nucleotide-specific multiplex PCR / J.R. Kremer [et al.] // *J. Med. Virol.* – 2007. – Vol. 79, № 7. – P. 987–994.
4. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 20, № 10. – P. 2731–279.
5. Laboratory investigations are indispensable to monitor the progress of measles elimination—results of the German Measles Sentinel 1999–2003 / A. Tischer [et al.] // *J. Clin. Virol.* – 2004. – Vol. 31, № 3. – P. 165–178.
6. Muller, C.P. Molecular epidemiology in measles control / C.P. Muller, M.N. Mulders // *The Molecular Epidemiology of Human Viruses* / Ed. T. Leitner. – Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002. – Ch. 11. – P.103–104.
7. Mulders, M.N. Monitoring of measles elimination using molecular epidemiology / M.N. Mulders, A.T. Truong, C.P. Muller // *Vaccine.* – 2001. – Vol. 19, № 17–19. – P. 2245–2249.

Поступила 13.09.2102

## **GENOTYPING AND PHILOGENETIC ANALYSIS OF MEASLES VIRUSES REVEALED IN BELARUS IN 2004–2011**

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

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

The results of molecular epidemiology of measles in Belarus for the period 2004–2011 are presented. For this period measles viruses were isolated from 65 patients (2004—1, 2006—47, 2010—1, 2011—15). The sequence analysis of C-terminal region of N gene (450 nucleotides) revealed, that viruses belonged to 4 different genotypes: D6 (D6, Turkey и D6, Ukraine), D5, D8 и D4. The results of molecular investigation as well as epidemiological data confirm that reported measles cases in Belarus during last 8 years were imported or linked with imported cases. Despite the importation of measles viruses of different genotypes into the country, the restoration of endemic measles virus circulation in Belarus has not happened.

**Keywords:** incidence, measles virus, genotype.

## **ОБ ОСОБЕННОСТЯХ РАЗВИТИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ**

**Довжук И.А., Ильяшева Е.В., Глебка Л.В., Рудая Л.Н.**

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

**Резюме.** Проблема распространения ВИЧ-инфекции на территории Брестской области сохраняет свою актуальность. За весь период наблюдения, начиная с 1988 г., эпидпроцесс претерпел характерные изменения. Начавшись со спорадических случаев в конце 80-х гг., к середине 90-х гг. трансформировался, преимущественно охватив потребителей инъекционных наркотиков и другие маргинальные группы населения. В настоящее время

преобладают случаи заражения через сексуальные контакты с вовлечением в эпидпроцесс социально благополучных слоев населения. С ростом числа ВИЧ-инфицированных женщин обозначается проблема рождения ВИЧ-инфицированных детей.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, эпидемиологический анализ, Брестская область.

**Введение.** Эпидскрининг по выявлению ВИЧ-инфицированных в Брестской области проводится с 1988 г., когда начали функционировать первые три диагностические лаборатории при областной и двух городских станциях переливания крови. В настоящее время в области проводят исследования на ВИЧ-инфекцию 8 лабораторий — три при станциях переливания крови, три при центральных районных больницах, одна — при государственной хозрасчетной поликлинике и одна — арбитражная — при областном центре гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья.

**Материалы и методы.** На начальном этапе проведения эпидскрининга в 1989–1992 гг. организовано широкое обследование населения, выполнено почти 1,5 млн. исследований, показатель на 1 тыс. населения составлял 216–265. При этом выявляемость ВИЧ-инфекции составляла единичные случаи — за период с 1987 по 1997 гг. всего выявлено 13 случаев. Таким образом, эпидемиологических обоснований для проведения широкомасштабной работы не прослеживалось. Хотя такой подход — принцип спонтанного обследования различных социальных групп — был отчасти оправдан на первом этапе развития эпидемии, когда эпидемиологические векторы распространения инфекции прогнозировались с большим трудом. Начиная с 1993 г. с учетом эпидемиологических и экономических обоснований объемы эпидскрининга были сокращены до 120–110 на 1 тыс. населения.

В последующие годы вплоть до настоящего времени лабораторные исследования на ВИЧ проводятся с учетом эпидемиологической значимости контингентов населения и целесообразности проводимых исследований. Обязательными контингентами для обследования являются доноры, беременные, потребители инъекционных наркотиков, больные с клиническими показаниями, выявленными ИППП, и некоторые другие [1, 2].

**Результаты и их обсуждение.** Проведенный эпидемиологический анализ показал, что способствующие эпидемиологическому подъему условия формировались благодаря распространению наркомании среди лиц молодого возраста. Впервые эпидситуация по распространению ВИЧ-инфекции резко осложнилась в г. Пинске в 1998 г., когда в течение одного квартала был выявлен 71 случай ВИЧ-инфекции среди наркоманов. В качестве основного наркотического средства употреблялся отвар маковой соломки, в городе сформировалось несколько группировок с приготовлением и употреблением наркотического вещества из расчета на 10–15 человек одновременно. Случайный занос в их среду инфекционного материала (в раствор для введения была добавлена кровь ВИЧ-инфицированного) обусловил дальнейшую бесконтрольность эпидемиологической цепной реакции.

Сложившаяся ситуация убедительно доказала необходимость постоянного мониторинга за социально уязвимыми группами — в частности, потребителями инъекционных наркотиков. В данном случае инфекционный агент (ВИЧ) благодаря его сочетанию с парентеральным механизмом передачи ярко продемонстрировал существующую эпидемиологическую опасность быстрого распространения. В эпидемический процесс были преимущественно вовлечены молодые люди в возрасте от 18 до 35 лет.

ВИЧ-инфекция относится к числу медленных вирусных инфекций, что способствует ее скрытому клиническому течению. То есть заболевшие выявляются в поздних стадиях, зачастую оставаясь скрытыми длительно действующими источниками инфекции. Происходит постепенное накопление возбудителя в популяции населения, что соответствующим образом влияет на характер развития эпидемического процесса [1, 2].

Так, в Брестской области эпидемия, начавшаяся в 1998 г. в г. Пинске, продолжает интенсивно развиваться. В настоящее время все административные территории области в большей или меньшей мере вовлечены в эпидемический процесс. Наиболее пораженной

зоной продолжает оставаться г. Пинск и прилегающие к нему административные территории, а также крупные города.

По статистическим данным на 1 июля 2012 г. число заболеваний в г. Пинске составило 474 случая, или 45,7% всех случаев от общего количества случаев в области.

Наиболее пораженными территориями в области являются крупные населенные пункты: г. Брест — 170 случаев (16,5%; 53,1); г. Барановичи — 79 случаев (7,7%; 46,5); г. Микашевичи Лунинецкого района — 55 случаев (5,3%; 77,3).

На эти административные территории приходится 75,2% всех зарегистрированных случаев. Большинство ВИЧ-инфицированных — это молодые люди в возрасте от 15 до 29 лет — 563 человека (54,7%). Заболеваемость ВИЧ-инфекцией в возрастной группе 15–19 лет составляет 45 человек (4,4%), в течение последних пяти лет продолжает находиться на низком уровне — по 3–4 случая за год, в 1-м полугодии 2012 г. выявлено 2 случая ВИЧ-инфекции.

Вместе с тем прослеживается тенденция выявления ВИЧ в более старших возрастных группах — у лиц старше сорока лет. В 2007 г. удельный вес ВИЧ-инфицированных в данной возрастной группе составлял 11,2%, в 2008 г. — 18,6%, в 2009 г. — 21,8%, в 2010 г. — 17,6%, в 2011 г. — 24,5%, в первом полугодии 2012 г. — 21,4%.

Если на начальных этапах развития эпидемического процесса основным путем передачи являлся парентеральный, связанный с инъекционным употреблением наркотиков, то в настоящий период неуклонно возрастает число случаев заражения через сексуальные контакты. В 2010 г. данным путем инфицировалось 60,4%, в 2011 г. — 60,2%, за 6 месяцев 2012 г. — 65,7%.

В структуре ВИЧ-инфицированных неуклонно возрастает число женщин. Так, если в 2007 г. женщины составляли 39,3%, то за первое полугодие 2012 г. число ВИЧ-инфицированных женщин составило 47,1%.

С возрастанием числа ВИЧ-инфицированных женщин обозначается проблема рождения ВИЧ-экспонированных детей. Всего в области родилось 106 детей от ВИЧ-инфицированных матерей, диагноз ВИЧ-инфекция установлен 9 детям.

Проведенный анализ структуры обследований по контингентам за 2011 г. показывает, что наибольшее число — 28,8% — составляют доноры (код 108), беременные — 27,1% (код 109), группа прочих — 22,5%.

#### **Выводы:**

– Развитие эпидпроцесса по распространению и накоплению ВИЧ в популяции населения Брестской области носит скрытый характер, что соответствует особенностям распространения медленной вирусной инфекции.

– Снижение уровня заболеваемости среди подростков 15–19 лет позволяет предположить наличие положительного эффекта от проводимой информационно-образовательной работы среди учащейся молодежи [3].

– Не исключено, что уменьшение числа заражений ВИЧ с парентеральными механизмами передачи связано с проводимой широкомасштабной работой среди потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) в рамках проекта ПРООН «Профилактика и лечение ВИЧ/СПИДа в Республике Беларусь» (обмен шприцев, информационно-образовательная работа с целевыми группами ПИН, внедрение метадоновой программы и др.) [4].

– Возрастание числа заражений через сексуальные контакты связано с рискованным поведением, недостаточностью нравственно-полового воспитания, ранним началом сексуальной жизни, начиная с подросткового возраста, низким уровнем знаний о безопасных сексуальных отношениях.

– Намечившаяся тенденция увеличения числа выявляемых случаев среди практически здоровых контингентов и в возрастной группе старше сорока лет, а также в поздних клинических стадиях свидетельствует о том, что происходит процесс накопления возбудителя в

популяции населения области, недооценка серьезности имеющейся проблемы, отсутствие должной настороженности по назначению обоснованного тестирования на ВИЧ.

#### Литература

1. Медико-социальные проблемы ВИЧ-инфекции, парентеральных вирусных гепатитов и инфекций, передаваемых половым путем: материалы респ. конф. – Минск, 2002.
2. Эпидемиологические и социальные аспекты ВИЧ-инфекции в Беларуси / П.Г. Рытик [и др.] // *Здравоохранение*. – 2005. – № 5. – С. 15–18.
3. О деятельности молодежного волонтерского движения по профилактике ВИЧ-инфекции в Брестской области / О.В. Арнауты [и др.] // *Современные проблемы инфекционной патологии: сб. науч. тр.* – Минск, 2009. – Вып. 2. – С. 38–40.
4. Об участии Брестского областного центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья в реализации проекта ПРООН «Профилактика и лечение ВИЧ/СПИД в Республике Беларусь» / О.В. Арнауты [и др.] *Современные проблемы инфекционной патологии: сб. науч. тр.* – Минск, 2009. – Вып. 2. – С. 41–43.

Поступила 20.08.2012

## FEATURES OF HIV-PREVALENCE EPIDEMIC IN THE BREST REGION

**Dovzhuk I.A., P'yasheva E.V., Glebko L.V., Rudaia L.N.**

*Brest Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Brest, Belarus*

The problem of the HIV infection spread in the Brest region remains valid. Over the entire period of observation, from 1988, the epidemiological process has undergone characteristic changes. It beginning with sporadic cases in the late 80's by the mid 90's transformed mainly covering injecting drug users and other marginalized groups. Currently infection cases through sexual contact, involving socio-advantaged groups in the epidemiological process are dominated. With the increasing number of HIV-positive women indicated the problem of HIV-infected children.

**Keywords:** HIV, epidemiological analysis, Brest region.

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ И ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ (ИППП) У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ

**Русанович А.В.<sup>1</sup>, Коломиец Н.Д.<sup>2</sup>, Наройчик Л.К.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья;*

<sup>2</sup>*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В Республике Беларусь основным путем инфицирования ВИЧ является половой контакт, роль которого пока продолжает неуклонно расти. В качестве сопутствующей инфекции наиболее часто встречается вирусный гепатит С, при этом в группе лиц, употребляющих внутривенно психоактивные вещества, каждый четвертый (25,5%) имеет маркеры HCV. Отмечено, что у лиц из мест лишения свободы среди других инфекционных заболеваний чаще встречаются туберкулез и ВГС.

**Ключевые слова:** ВИЧ, HCV, HBV, инфекции, передающиеся половым путем (ИППП), пути инфицирования, туберкулез.

**Введение.** Несмотря на предпринимаемые усилия эпидемиологическая ситуация ВИЧ/СПИД в Республике Беларусь продолжает ухудшаться. Всего зарегистрировано 13726 случаев ВИЧ-инфекции (показатель распространенности составил 114 на 100 тыс. населения). За 7 мес. 2012 г. выявлен 771 ВИЧ-инфицированный (7 мес. 2011 г. — 675). Темп роста составил 14,2%, показатель заболеваемости — 8,1 на 100 тыс. населения (7 мес. 2011 г. — 7,1).

Подавляющее число ВИЧ-инфицированных — это молодые люди в возрасте от 15 до 29 лет. Общее количество случаев ВИЧ-инфекции в этой возрастной группе составляет 8221 (удельный вес в общей структуре ВИЧ-инфицированных — 59,9%). По кумулятивным дан-

ным (1987-01.08.2012) 6277 (45,7%) человек инфицированы ВИЧ при внутривенном введении наркотических веществ; удельный вес лиц, инфицирование которых произошло половым путем, составил 51,8% (7106 случаев). Отмечено, что значимость парентерального пути передачи ВИЧ неуклонно уменьшается и за 7 мес. этого года составила 21,3% (164 человека). К настоящему времени в стране превалирует половой путь передачи ВИЧ, на который приходится 77,2% (595 человек) впервые зарегистрированных инфицированных.

**Цель исследования:** изучить распространенность парентеральных вирусных гепатитов, туберкулеза и инфекций, передающихся половым путем у ВИЧ-инфицированных.

**Материалы и методы.** Для оценки были использованы компьютерные программы «Statistica v.6.0» и «Spectrum». Объем выборки составил 2137 человек, у которых ВИЧ-инфекция была установлена впервые.

**Результаты и их обсуждение.** Анализ причин, по которым ВИЧ-позитивные лица обследовались на наличие маркеров ВИЧ, показал, что чаще всего данная инфекция определялась в результате обращения пациентов по поводу различных клинических признаков инфекции — 589 (27,6±1,0%) и при добровольном тестировании — 534 (25,0±0,9%) пациентов. Следующим по значимости стало обследование лиц из мест лишения свободы — 297 (13,9±0,7%) и беременных — 27 (12,6±0,7%). Наиболее часто ВИЧ-инфекция определялась среди пациентов, обследованных по поводу инфекций, передаваемых половым путем 134 (6,8±0,5%), по эпидемическим показаниям — 145 (6,1±0,7%) и при обращении к наркологу — 89 (4,2±0,4%). Значимость остальных причин, по поводу которых ВИЧ-инфицированные лица прошли тестирование, составила от 0,1 до 2,2%. При этом следует обратить внимание, что в последнюю группу входили дети, рожденные от ВИЧ-инфицированных матерей, и доноры крови (табл. 1).

Таблица 1 — Причины, по которым ВИЧ-позитивные лица прошли первичное тестирование

Причина тестирования	Количество выявленных ВИЧ-позитивных лиц	
	Абс.	%
Тестирование по клиническим показаниям	589	27,6±1,0
Добровольное прохождение тестирования, в том числе анонимно	534	25,0±0,9
Беременные женщины	270	12,6±0,7
Лица из мест лишения свободы	297	13,9±0,7
Наличие инфекций, передаваемых половым путем	134	6,8±0,5
По эпидемическим показаниям	145	6,1±0,7
При обращении к наркологу	89	4,2±0,4
Доноры	48	2,2±0,3
Дети, рожденные ВИЧ-инфицированными матерями	23	1,1±0,2
Другие	8	0,1±0,1
Всего	2137	

Последующее эпидемиологическое расследование возможных причин инфицирования этих пациентов позволило установить следующее:

Из 2137 выявленных случаев ВИЧ-инфекции в результате половых контактов инфицировалось 1659 (77,6±0,9%) человек, парентеральным путем (за счет инъекционного

введения психоактивных веществ) — 431 (20,2±0,9%) пациент, от ВИЧ-позитивных матерей — 23 (1,1±0,2%) ребенка. Пути заражения ВИЧ остались неустановленными у 24 человек (1,1±0,2%).

Значительная часть пациентов кроме ВИЧ имела другие инфекционные заболевания, нередко в виде микст-инфекций. Чаще всего отмечали присутствие маркеров парентеральных вирусных гепатитов. В эту группу вошло 300 (14,4±0,8%) ВИЧ-позитивных. По нозоформам превалировал HCV, который был обнаружен у 275 (12,9±0,7%) пациентов, имеющих маркеры гепатитов. Гораздо реже выявляли маркеры HBV — всего 7 (0,09%) человек, и микст-инфекции (HCV+HBV) — 15 (0,7±0,2%). Такие значительные различия несомненно связаны с успешно проводимой в республике вакцинацией против HBV. Туберкулез выявлен у 143 (6,7±0,5%) и ИППП — у 136 (6,4±0,5%) ВИЧ-инфицированных.

В группе из 136 пациентов ВИЧ+ИППП чаще встречались «классические» венерические заболевания: трихомониаз — 42 (30,9±4,0%), гонорея — 25 (18,4±3,3%) и сифилис — 24 (17,6±3,3%) случая (табл. 2).

Таблица 2 — Распространенность ИППП среди ВИЧ-инфицированных пациентов

Нозологическая форма	Число положительных случаев	
	Абс.	%
Трихомониаз	42	30,9±4,0
Гонорея	25	18,4±3,3
Сифилис	24	17,6±3,3
Бактериальные инфекции	14	10,3±2,6
Кандидозы	11	8,1±2,3
Уреоплазмоз	6	4,4±1,8
Остроконечные кандиломы	6	4,4±1,8
Хламидиоз	5	3,7±1,6
Герпетическая инфекция	3	2,2±1,3
Всего	136	-

Анализ частоты сопутствующих заболеваний у ВИЧ-инфицированных с различными путями инфицирования показал, что лишь отдельные нозологические формы имеют взаимосвязь с путем инфицирования. Так, среди пациентов, зараженных ВИЧ парентеральным путем, достоверно чаще ( $p \geq 0,05$ ) по сравнению с половым путем встречается HCV. Установлено, что среди 431 человека, инфицированных ВИЧ парентеральным путем, вирусный гепатит С был диагностирован у 36 (25,5±3,7%), в то время как ИППП были обнаружены всего у 12 (2,8±1,8%). В группе пациентов, инфицированных ВИЧ половым путем (1659 чел.), маркеры ИППП были определены у 124 (7,5±0,6%) ( $p \geq 0,05$ ).

В результате исследования установлено, что развитие туберкулеза у 143 ВИЧ-позитивных пациентов не связано с путями инфицирования, поскольку заболевание диагностируется с одинаковой частотой как среди лиц, инфицированных ВИЧ парентеральным путем — у 75 (52,4±4,2%), так и половым — 68 (47,6±4,2%) ( $p \geq 0,05$ ).

**Выводы.** В Республике Беларусь основным путем инфицирования ВИЧ является половой, доля которого пока продолжает неуклонно расти. В качестве сопутствующей инфекции наиболее часто встречается вирусный гепатит С, при этом в группе лиц, употребляющих внутривенно психоактивные вещества, каждый четвертый (25,5%), имеет маркеры HCV. Отмечено, что у лиц из мест лишения свободы среди других инфекционных заболеваний чаще встречаются туберкулез и ВГС.

Поступила 20.08.2012

## PREVALENCE OF PARENTERAL VIRAL HEPATITIS AND SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS IN HIV-INFECTED PATIENTS

Rusanovich A.V.<sup>1</sup>, Kolomiets N.D.<sup>2</sup>, Naroychik L.K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Republican Center of Hygiene, Epidemiology and Public Health;

<sup>2</sup>Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

In Belarus, the main route of HIV infection is sexual contact, whose role is still growing steadily. As a co-infection is most common hepatitis C virus, while in the group of people who use psychoactive drugs intravenously every four 25.5%, a marker HCV. It was noted that individuals from prison and from other more common infectious diseases tuberculosis and HCV.

**Keywords:** HIV, HCV, HBV, sexually transmitted infections, infection ways, tuberculosis.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫХ ГЕПАТИТОВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л.

*Пензенский государственный университет, Россия*

**Резюме.** Парентеральные вирусные гепатиты несмотря на определенные успехи вакцино- и химиопрофилактики, остаются одной из самых актуальных медицинских и социально-экономических проблем. Цель исследования: изучение основных клинико-эпидемиологических особенностей заболеваемости вирусными гепатитами с парентеральным путем передачи у пациентов с различными клиническими формами заболевания для обоснования профилактических и противоэпидемических мероприятий по предупреждению распространения гемоконтактных инфекций.

**Ключевые слова:** парентеральные гепатиты, гемоконтактные инфекции, клинико-эпидемиологические особенности.

**Введение.** В последнее десятилетие парентеральные вирусные гепатиты характеризуются постоянно прогрессирующим ростом заболеваемости и широким распространением практически во всех регионах мира. Они представляют глобальную медико-социальную и экономическую проблему. Являясь основной причиной развития всего спектра хронических заболеваний печени, включая цирроз и гепатоцеллюлярную карциному, они представляют поистине глобальную медико-социальную и экономическую проблему. В России проблема вирусных гепатитов усугубляется быстрым ростом показателей заболеваемости среди молодых и трудоспособных людей из-за увеличения числа случаев внутривенного употребления наркотиков и пренебрежения средствами индивидуальной защиты [1].

Для хронических вирусных инфекций в настоящее время характерен наиболее интенсивный рост заболеваемости и распространенности в Российской Федерации. По уровню распространенности среди населения хронические вирусные гепатиты относятся к кризисным инфекциям, угрожающим существованию человеческой популяции. Широкое распространение вирусных инфекций, вовлечение в эпидемический процесс лиц молодого возраста определяет эту медико-социальную проблему как одну из главных угроз национальной безопасности в сфере здравоохранения [2, 3].

На территории Пензенской области отмечается рост суммарной заболеваемости населения острыми формами вирусных гепатитов на 16,7%, составившей 7,7 на 100 тыс. населения, выявлено повышение показателей заболеваемости острыми формами вирусных гепатитов неустановленной этиологии на 66,8%, в 2011 г. заболеваемость составила 2,0 на 100 тыс. населения.

В обл. отмечается широкое распространение хронических вирусных гепатитов. За 12 лет с момента официальной регистрации этих нозологических форм (1999) сформировалась тенденция к неуклонному росту заболеваемости. Заболеваемость за этот период постепенно увеличилась с 12,9 до 17,9 на 100 тысяч [4]. Объективная оценка клинико-эпидемиологических особенностей течения парентеральных вирусных гепатитов на конкретных территориях является необходимым условием для обоснования и разработки регионально-ориентированной комплексной системы оздоровительных, профилактических и противоэпидемических мероприятий [1–3].

**Цель исследования:** изучить основные клинико-эпидемиологические особенности заболеваемости вирусными гепатитами с парентеральным путем передачи на основе статистического анализа материалов инфекционной клиники.

**Материалы и методы.** Материалом для анализа были клинико-лабораторные данные и результаты лабораторной диагностики биохимических изменений внутренней среды организма рутинными методами. Включены 210 пациентов в возрасте от 3 до 78 лет с клиническими проявлениями вирусных гепатитов.

**Результаты и их обсуждение.** При анализе динамики заболеваемости за 2011 г. в Пензенской области установлено, что среди всех форм вирусных гепатитов преобладающим является хронический вирусный гепатит С, который составляет 96,9% всех нозологий; а острый вирусный гепатит — 3,1%. Выявлено 14 случаев инфицирования гепатитом В, из них хронический вирусный гепатит В — 92,8%, а острый вирусный гепатит — 7,2% (рисунок 1).

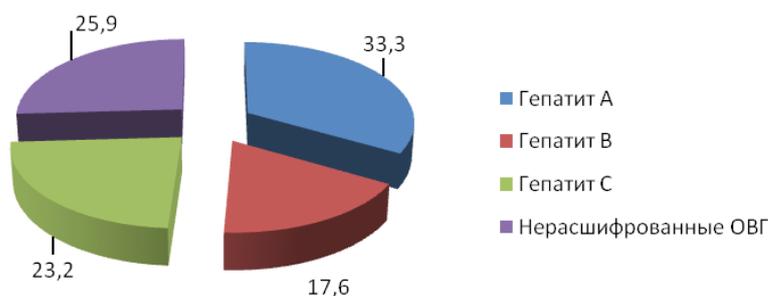


Рисунок 1 — Этиологическая структура вирусных гепатитов в Пензенской области в 2011 г.

В возрастной структуре вирусных гепатитов преобладают пациенты в возрасте 21–30 лет. Наиболее интенсивно при гепатите В вовлечены в эпидемиологический процесс возрастные группы 41–50 лет (29%), при гепатите С лидируют молодые люди в возрасте 21–30 лет (33,7%).

Микстинфекция (хронический гепатит С + гепатит В) зарегистрирована в 1% случаев, в основном среди подростков.

Наркологические заболевания выявлены у 6% пациентов, страдающих гепатитом В, и у 17,4% — гепатитом С. Наркологические заболевания чаще выявляли у лиц в возрасте 21–30 лет (рисунок 2).

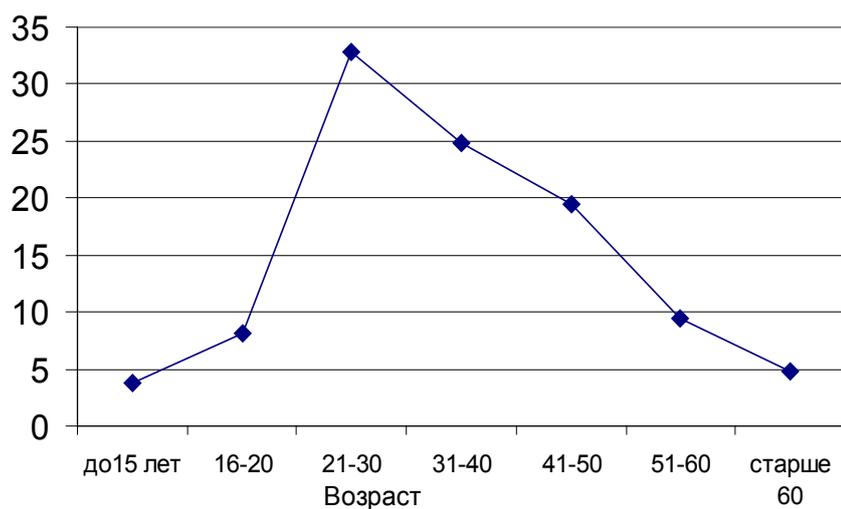


Рисунок 2 — Возрастная структура больных парентеральными вирусными гепатитами (%)

Среди установленных путей передачи вирусных гепатитов уверенно доминирует половой путь передачи: 42,8% случаев заражения вирусным гепатитом В и 24,9% — вирусным гепатитом С. При хирургических операциях и гематотранфузиях заражение гепатитом В произошло у 28,4% пациентов. К факторам риска заражения гепатитом В относится внутривенное введение инъекций и инъекционное употребление наркотиков, что составляет 14,2 и 7,1%, соответственно. Второе место среди путей передачи гепатита С занимают гематотрансфузии (14,8%). Одинаковое процентное соотношение инфицированных лиц замечено при употреблении наркотиков внутривенно (10,7%), при получении стоматологических услуг (10,7%) и пользовании услугами тату-салона (10,7%). При операциях заражение произошло у 8,2%. При манипуляциях по поводу беременности было инфицировано 5,1%.

При анализе заболеваемости среди городского и сельского населения выявлено преобладание горожан — 67,4%, сельское население составило 32,6%. Анализ социальной структуры показал, что при гепатите В наибольшую группу риска составляет безработные граждане — 57,1%; на долю рабочего класса пришлось 14,3%; остальная доля заболевших приходится на служащих — 28,5%, среди которых медицинский персонал составил 7,1%. При гепатите С наибольшую группу риска составляют безработные граждане (51,5%); на долю рабочих пришлось 7,1%; сельхоз-работников 6,6% случаев. Служащие имеют — 34,7%, среди которых медицинский персонал — 6,6%, преподаватели — 3%, др. профессии — 25%. У большинства пациентов с вирусными гепатитами (98%) диагностировали среднетяжелую форму заболевания. При парентеральных вирусных гепатитах наблюдались типичные клинические проявления заболевания, среди которых преобладали следующие симптомы: потеря аппетита — 95–97%, слабость, быстрая утомляемость — 88–89%, боли в суставах и мышцах — 80–87%, увеличение печени — 77%, повышение температуры тела — 68–80%, головная боль — 63% и др. Хронические вирусные гепатиты протекали преимущественно в стертой малосимптомной форме с незначительными отклонениями от нормы биохимических показателей, характеризующих функции печени.

**Выводы.** Эпидемиологическими особенностями парентеральных вирусных гепатитов в Пензенской области являются: снижение заболеваемости острыми формами; рост хронических форм, преимущественно за счет вирусного гепатита С; преобладание среди заболевших возрастных групп 20–39 лет, в основном социально неадаптированного контингента; постепенное увеличение доли полового пути передачи; высокий процент

распространенности различных форм гемоконтактных гепатитов среди персонала лечебно-профилактических учреждений.

Хронические гепатиты С и В имеют преимущественно стертое малосимптомное течение с незначительным нарушением функции печени. У лиц с хроническими вирусными инфекциями имеет место микстинфекция (гепатиты С+В). В группу риска входят неработающие мужчины в возрасте 21–40 лет, в подавляющем большинстве случаев — наркозависимые и медицинские работники.

#### Литература

1. Кириллова, Е.Н. Эпидемиологические особенности распространения вируса гепатита С в Новгородской области / Е.Н. Кириллова, Е.А. Орлова, Г.С. Архипов // Вест. рос. воен.-мед. академии. – Всерос. науч. конф., СПб., 17–18 апр. 2008 г., ч. II (приложение). – 2008. – № 2. – С. 417–418.

2. Трипак, В.М. Эпидемиологические особенности заболеваемости парентеральных вирусных гепатитов В и С на территории Самарской области в 2002–2011 гг. / В.М. Трипак, Л.В. Яковлева, Н.П. Трошкина // Отечественная эпидемиология в XXI веке: приоритетные направления развития и новые технологии в диагностике и профилактике болезней человека (к 75-летию кафедры общей и военной эпидемиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова и 90-летию со дня рождения академика В.Д. Белякова), 19–20 апр. 2012 г.: тр. конф. – СПб., 2012. – С. 85.

3. Характеристика путей инфицирования вирусными гепатитами В и С населения Харьковской области / Т.А. Чумаченко // Проблемы современной эпидемиологии. Перспективные средства и методы лабораторной диагностики и профилактики актуальных инфекций: тр. конф. – СПб., 2009. – С. 215.

4. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Пензенской области в 2011 году: гос. доклад. – Пенза, 2012.

Получена 26.06.2012

## COMPARATIVE ANALYSIS OF CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF VARIOUS ORIGINS PARENTERAL HEPATITIS COURSE

Mitrofanova N.N., Melnikov V.L.

Medical Institute, Penza State University, Penza, Russia

Parenteral viral hepatitis, in spite of some successes, vaccine and chemoprophylaxis, remains one of the most urgent health and socio-economic problems. The aim of the study was to investigate the basic clinical and epidemiological features of viral hepatitis with parenteral transmission in patients with different clinical forms of the disease to support preventive and anti epidemic measures for preventing the spread of hemocontact infections.

**Keywords:** parenteral hepatitis, hemocontact infections, clinical-epidemiological features.

## ИЗУЧЕНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ ЗА 2009–2011 ГГ.

Самойлова Т.И.<sup>1</sup>, Залевская О.С.<sup>1</sup>, Карпук Л.И.<sup>1</sup>, Кулакова М.Н.<sup>1</sup>, Яшкова С.Е.<sup>2</sup>, Ведыньков А.Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;

<sup>2</sup>Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь

**Резюме.** В статье приведены результаты исследования клещей, собранных на территории Беларуси в 2009–2011 гг., с целью выявления антигена вируса клещевого энцефалита с применением метода иммуноферментного анализа и непрямого метода флуоресцирующих антител. Выявлено, что зараженность иксодовых клещей в Республике Беларусь за последние 3 года остается достаточно высокой и составляет для *I. ricinus* 15,5%, а для *D. reticulatus* — 12,6%.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, иксодовые клещи, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, зараженность, иммуноферментный анализ, непрямой метод флуоресцирующих антител.

**Введение.** Для оценки эпидситуации и изучения закономерностей циркуляции вируса клещевого энцефалита (КЭ) в природных очагах Республики Беларусь ежегодно проводится исследование клещей-переносчиков на зараженность их вирусом КЭ [1, 2]. Для изучения вирусофорности клещей в природных очагах в последние годы широко используется экспресс-метод иммуноферментного анализа (ИФА), имеющий высокую чувствительность и не уступающий методу биопробы на животных [3]. Также широко применяется (нМФА) для индивидуального исследования вирусофорности переносчиков, собранных в природных очагах и снятых с людей. Метод дает точный и сравнительно быстрый результат [4].

**Материалы и методы.** Материалом для исследования являлись иксодовые клещи двух видов: *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus*, собранные на территории всех областей республики в 2009–2011 гг. Методом ИФА было исследовано 2030 экземпляров (219 биопроб) *I. ricinus* и 528 (71 биопроба) *D. reticulatus* из природных очагов. Индивидуально методом нМФА было исследовано 107 клещей *I. ricinus* и 32 — *D. reticulatus*, также собранных в природных очагах.

Перед постановкой ИФА иксодовых клещей подвергали первичной биологической обработке. Клещей распределяли по биопробам (б/п) в зависимости от их вида, пола, стадии развития, степени насыщения. В одну биопробу брали 10–15 экземпляров голодных или полунапитавшихся самок; 10 голодных самцов; 2–5 напитавшихся самок или 50–100 нимф иксодовых клещей. Далее членистоногих отмывали фосфатным буферным раствором (рН 7,0), растирали в фарфоровой ступке и готовили суспензии. Приготовленные из клещей суспензии исследовали методом ИФА для выявления в них антигена вируса КЭ с использованием диагностических наборов фирмы Вектор-БЕСТ согласно инструкции производителя. В дальнейшем биопробы давшие положительный результат в ИФА на наличие антигена вируса КЭ, были взяты для выделения возбудителя на лабораторных животных и культуре клеток СПЭВ.

При индивидуальном исследовании клещей нМФА готовили препараты. Для этого переносчиков вскрывали под микроскопом МБС-10, извлекали слюнные железы, фиксировали их охлажденным ацетоном, затем на препарат наносили иммунную асцитическую жидкость (ИАЖ) к вирусу КЭ, отмывали фосфатно-солевым буферным раствором, затем наносили на препарат антивидовую сыворотку, меченную флуоресциин-5-изоционатом (ФИТЦ). Окрашенные препараты после отмывания в ФСБ просматривали под люминесцентным микроскопом для выявления специфического свечения антигена вируса КЭ.

**Результаты и их обсуждение.** В результате проведенных исследований иксодовых клещей в ИФА, собранных в природных очагах, антиген вируса КЭ в целом по республике за 2009–2011 гг. выявляли в клещах *I. ricinus* в 15,5%, а в *D. reticulatus* — 12,6% (таблица).

Таблица — Данные по выявлению антигена вируса КЭ в клещах методом ИФА (2009–2011 гг.)

Области	Клещи по видам					
	<i>Ixodes ricinus</i> б/п / экз.	К-во полож.	% полож.	<i>Dermacentor reticulatus</i> б/п / экз.	К-во полож.	% полож.
1. Витебская	50/410	6	12,0	---	---	---
2. Могилёвская	22/221	3	13,6	12/110	1	8,3
3. Гродненская	39/356	9	23,1	11/80	2	18,2
4. Минская	48/421	6	12,5	16/123	2	16,5
5. Брестская	41/447	9	22,0	---	--	---
6. Гомельская	8/57	0	0	29/314	6	20,7
7. Минск	15/79	2	13,3	5/31	0	0
Всего по РБ	219/2030	34	15,5	87/784	11	12,6

Как видно из таблицы, процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* за три года составил: по Витебской области — 12,0; Могилевской — 13,6; Гродненской — 23,1; Минской — 12,5; Брестской — 22,0; Гомельской — 11,6 и г. Минску — 13,3. В клещах *D. reticulatus* процент антигена вируса КЭ варьировал от 8,3 в Могилевской до 20,7 в Гомельской областях. По Гродненской области процент выявления составил 18,2 и по Минской — 16,5.

Выявление антигена вируса КЭ в иксодовых клещах по годам приведено на рисунке 1.

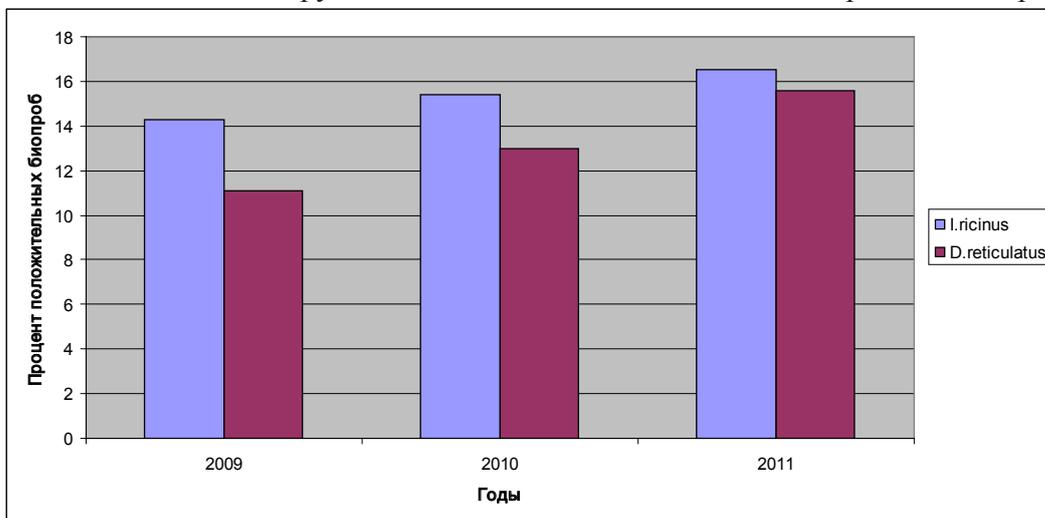


Рисунок 1 — Динамика выявления антигена вируса КЭ в клещах методом ИФА по годам

Как видно из рисунка 1, процент выявления антигена вируса КЭ в иксодовых клещах родов *I. ricinus* и *D. reticulatus* был следующим: в 2009 г. — 14,3 и 11,1; в 2010 г. — 15,4 и 13,0; в 2011 г. — 16,5 и 15,6 соответственно.

В 2009 г. наибольший процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* отмечался по Гродненской области (20,0), в клещах *D. reticulatus* — по Гомельской и Гродненской областях (20,0), а в 2010 г. наиболее высокая зараженность клещей *I. ricinus* была в Брестской области (25,0%), а клещей *D. reticulatus* — в Минской (18,1%).

На рисунке 2 приведен процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* и *D. eticulatus* в 2011 г.

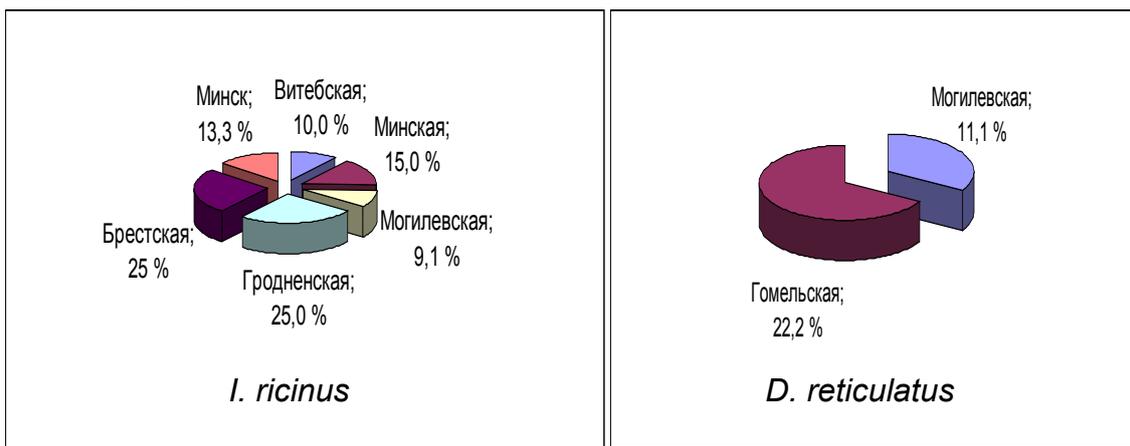


Рисунок 2 — Данные по выявлению антигена вируса КЭ в клещах методом ИФА по областям в 2011 г.

Как видно из рисунка 2, в 2011 г. наибольший процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* был отмечен по Брестской и Гродненской областях (25,0%), а в клещах

*D. reticulatus* — по Гомельской области (22,2%).

Среди исследованных методом нМФА клещей, собранных в природных очагах Беларуси в 2011 г., доля выявления антигена вируса КЭ составлял 18,7 — для *I. ricinus* и 16,9% — для *D. pictus*.

В заключение следует отметить, что зараженность иксодовых клещей в Республике Беларусь за последние 3 года остается достаточно высокой и составляет для *I. ricinus* 15,5%, а для *D. reticulatus* — 12,6%, что свидетельствует о необходимости проведения постоянного эпидемиологического надзора за природными очагами инфекции.

#### Литература

1. Выявление зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита в Беларуси методом иммуноферментного анализа / Т.И. Самойлова [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. 73.
2. Самойлова, Т.И. Современное состояние проблемы арбовирусных инфекций в Республике Беларусь / Т.И. Самойлова // Вест. Уральской гос. мед. академии. — 2010. — Вып. 21. — С. 133-141.
3. Методические рекомендации по выявлению циркуляции арбовирусов // Итоги науки и техники. Сер. Вирусол. — М.: ВИНТИ, 1991. — Т. 25. — 111 с.
4. Мельникова, О.В. Вирусологический мониторинг природных очагов клещевого энцефалита в Прибайкалье на основании индивидуального исследования иксодовых клещей: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Томск, 1995. — 25 с.

Поступила 24.09.2012

## STUDY OF IXODES TICKS INFESTATION WITH TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN BELARUS IN 2009-2011

Samoilova T.I.<sup>1</sup>, Zalevskaya O.S.<sup>1</sup>, Karpuk L.I.<sup>1</sup>, Kulakova M.N.<sup>1</sup>,  
Yashkova S.E.<sup>2</sup>, Vedenkov A.L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Republican Research Centre for Epidemiology & Microbiology;

<sup>2</sup>Republican Centre for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus

In the paper the results of study of ixodes ticks on tick-borne encephalitis virus infestation using ELISA and indirect fluorescent antibody technique in Belarus for the period from 2009 to 2011 are presented. In Belarus for the last 3 years it was revealed quite high ticks infestation amounting 15,5% to *I. ricinus*, and 12,6% to *D. reticulatus*.

**Keywords:** tick-borne encephalitis virus, ixodes ticks, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, infestation, ELISA, indirect fluorescent antibody assay.

## ИНФИЦИРОВАННОСТЬ КРОВОСОСУЩИХ КОМАРОВ И МОШЕК ВИРУСОМ ЗАПАДНОГО НИЛА В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ БЕЛАРУСИ

Самойлова Т.И.<sup>1</sup>, Азарова И.А.<sup>1</sup>, Цвирко Л.С.<sup>2</sup>, Кулакова М.Н.<sup>1</sup>,  
Залевская О.С.<sup>1</sup>, Яшкова С.Е.<sup>3</sup>, Веденьков А.Л.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;

<sup>2</sup>Полесский государственный университет, Пинск;

<sup>3</sup>Республиканский центр гигиены, эпидемиологии общественного здоровья, Минск, Беларусь

**Резюме.** В статье приведены данные по выявлению с помощью метода иммуноферментного анализа зараженности комаров и мошек вирусом Западного Нила в природных очагах Беларуси в 2010-2011 гг.

**Ключевые слова:** вирус Западного Нила, комары, мошки, зараженность, иммуноферментный анализ, природные очаги.

**Введение.** Среди вновь выявленных арбовирусов и вызываемых ими инфекций, наибольшую эпидемиологическую значимость для республики представляет вирус Западного

Нила (ЗН), который широко циркулирует на сопредельных с Республикой Беларусь территориях, а также в других странах [1-5, 6]. В литературе имеются многочисленные сведения об экологической связи вируса Западного Нила с кровососущими комарами [7-10]. О роли мошек в циркуляции вируса ЗН имеются ограниченные сведения.

**Цель исследования:** выявление зараженности комаров и мошек путем обнаружения в них антигена вируса ЗН в природных очагах Беларуси в 2010-2011 гг.

**Материалы и методы.** Для обнаружения антигена вируса Западного Нила было собрано 18211 экз. (271 биопроба) кровососущих комаров 3-х родов: *p. Aedes* — 7730 экз. (112 биопроб), *p. Anopheles* — 6289 экз. (94 биопробы), *p. Culex* — 4192 (65 биопроб), а также 3236 экз. (33 биопробы) мошек сем. *Simulidae*.

Антиген вируса ЗН в кровососущих комарах и мошках выявляли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для постановки ИФА полевой материал подвергали первичной обработке. Кровососущих комаров и мошек перед исследованием в ИФА определяли до рода, раскладывали по биопробам (б/п). В одну биопробу брали от 50 и более экземпляров кровососущих комаров и мошек одного рода, из одного района (деревни) и с учетом даты сбора. Далее членистоногих (комаров и мошек) отмывали фосфатным буферным раствором (рН 7,0), растирали в фарфоровой ступке и готовили суспензии. Приготовленные суспензии исследовали методом ИФА для выявления в них антигена вируса ЗН с использованием диагностических наборов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского (г. Москва, Россия) согласно инструкции производителя.

**Результаты и их обсуждение.** Проведенные исследования кровососущих комаров и мошек, собранных в природных очагах на территории всех областей республики позволили выявить их зараженность вирусам ЗН (табл.).

Таблица — Данные ИФА зараженности кровососущих членистоногих (комаров и мошек) антигеном вируса Западного Нила в 2010-2011 гг.

Области	Кровососущие комары		Мошки	
	Кол-во б/п / кол-во полож.	% полож. б/п	Количество б/п / кол-во полож.	% полож. б/п
1. Витебская	34/3	8,8	2/0	-
2. Могилёвская	48/6	12,5	1/0	-
3. Гродненская	56/6	10,7	8/0	-
4. Минская	17/1	4,5	-	-
5. Брестская	35/5	14,3	9/1	11,1
6. Гомельская	50/9	18,0	10/1	10,0
7. Минск	31/3	9,7	-	-
Всего по РБ	271/33	12,2	33/2	6,1

Как видно из табл., процент выявления антигена вируса ЗН в кровососущих комарах за 2010-2011 гг. составлял: по Витебской — 8,8, Могилевской — 12,5, Гродненской — 10,7, Минской — 4,5, Брестской — 14,3, Гомельской — 18,0 и г. Минску — 9,7. В мошках антиген вируса ЗН был выявлен по Брестской (11,1%) и Гомельской (10,0%) областям.

Выявление антигена вируса ЗН в комарах и мошках по годам приведено на рисунке 1.

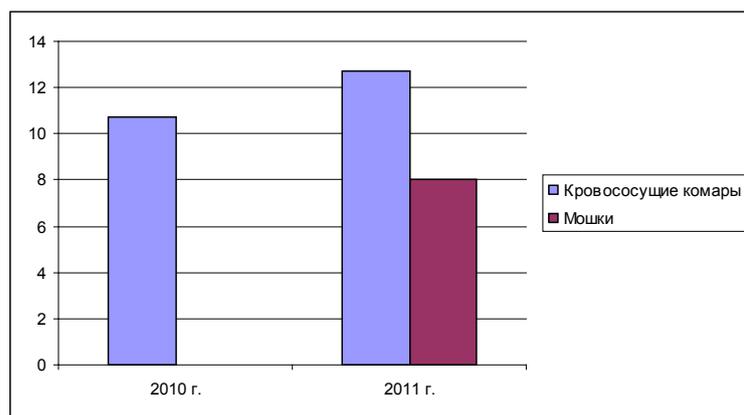


Рисунок 1 — Динамика выявления антигена вируса Западного Нила в комарах и мошках методом ИФА по годам

Как видно из рисунка 1, процент выявления антигена вируса ЗН в кровососущих комарах составлял: в 2010 г. — 10,7 а в 2011 г. — 12,5. Что касается мошек, то их зараженность антигеном вируса ЗН в 2011 г. составила 8,0%. В 2010 г. положительных биопроб среди мошек выявлено не было.

На рисунке 2 показано обнаружение антигена вируса ЗН в кровососущих комарах *pp. Aedes* и *Anopheles* в 2010 г.

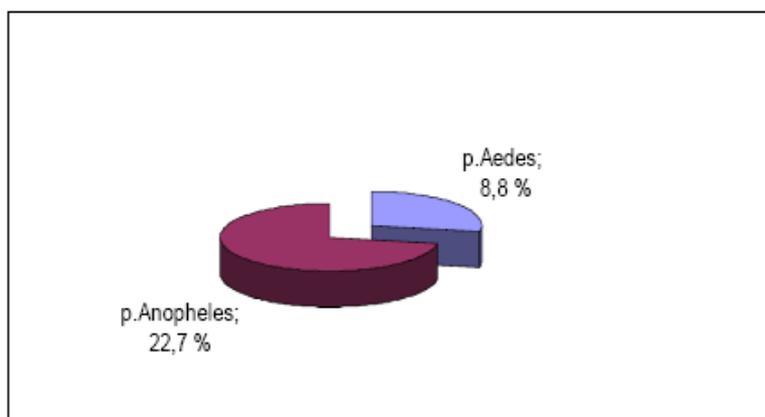


Рисунок 2 — Данные по выявлению антигена вируса Западного Нила в кровососущих комарах в 2010 г.

Как видно из рисунка 2, в целом по республике антиген вируса ЗН в 2010 г. был обнаружен в комарах *p. Anopheles* — 22,7% и в комарах *p. Aedes* — 8,8%. Инфицированные вирусом ЗН комары *p. Anopheles* были выявлены в Брестской (Столинский район), Витебской (Поставский район), Гомельской (Светлогорский, Рогачевский районы), Могилевской (Быховский район) областях, а инфицированные комары *p. Aedes* — в Гродненской (Гродненский, Островецкий районы) области и в г. Минске.

Результаты выявления антигена вируса ЗН в кровососущих комарах и мошках в 2011 г. приведены на рисунке 3.

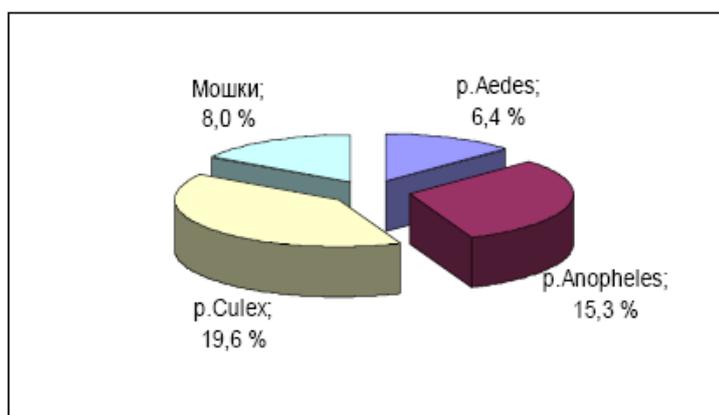


Рисунок 3 — Данные по выявлению антигена вируса ЗН в кровососущих комарах и мошках в 2011 г.

Как видно из рисунка 3, среди исследованных переносчиков в 2011 г. в целом по республике наиболее высокий процент инфицирования вирусом Западного Нила отмечен в комарах *p. Culex* — 19,6 и *p. Anopheles* — 15,3. В комарах *p. Aedes* процент выявления антигена вируса ЗН составил 6,4. В разрезе областей доля выявления антигена вируса ЗН в кровососущих комарах достигала от 7,1% по Витебской до 16,7% по Гомельской областям республики. По районам Брестской области зараженность кровососущих комаров вирусом ЗН была отмечена в Пружанском, Малоритском и Кобринском районах, а в Витебской — Шумилинском и Шарковщинском районах. На территориях других областей зараженность кровососущих комаров выявлена в Гродненском, Свислочском, Зельвенском и Волковысском районах Гродненской области и г. Гродно, а так же Каменецком, Пружанском и Малоритском районах Брестской области.

В 2011 г. антиген вируса Западного Нила был выявлен также в мошках, собранных на территориях Брестской (Малоритский район), Гомельской (Речицкий район) областей республики.

Таким образом, на основании проведенных исследований показано, что кровососущие комары *pp. Aedes, Anopheles, Culex* и мошки, собранные в природных очагах страны, заражены вирусом ЗН. В отдельных областях и в отдельные годы процент выявления антигена достигал: в 2010 г. — 20,0 (*p. Aedes*, Гродненская область), 25 (*p. Anopheles*, Могилевская область), в 2011 г. — 16,7 (*p. Anopheles*, Могилевская область), 16,7 (*p. Culex*, Гродненская область), 11,1 (мошки, Брестская область).

#### Литература

1. Венгеров, Ю.А. Лихорадка Западного Нила / Ю.А. Венгеров, А.Е. Платонов // Леч. врач. — 2000. — № 10. — С. 56-60.
2. Львов, Д.К. Лихорадка Западного Нила / Д.К. Львов // Вопр. вирусологии. — 2000. — № 2. — С. 4-9.
3. Samoilova, T.I. Virologic and serologic investigation of West Nile virus circulation in Belarus / T.I. Samoilova, V.I. Votyakov, L.P. Titov // Centr. Eur. J. Publ. Health. — 2003. — Vol. 11, № 2. — P. 55-62.
4. Hubalek, Z. West Nile fever — a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe / Z. Hubalek, J. Halouzka // Emerg. Infect. Dis. — 1999. — Vol. 5, № 5. — P. 643-650.
5. Savage, H.M. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996 with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes / H.M. Savage // Amer. J. Trop. Med. Hyg. — 1999. — Vol. 61. — P. 600-611.
6. Изоляция, антигенные свойства и биологическая характеристика вируса Западного Нила в Беларуси / Т.И. Самойлова [ и др.] // Профилактика и лечение инфекционных и паразитарных заболеваний: материалы юбил. конф. БелНИИЭМ. — Минск: Наука і тэхніка, 1995. — С. 116-121.
7. Чунихин, С.П. Экология и географическое распространение арбовирусов / С.П. Чунихин, Г.Н. Леонова. — М.: Медицина, 1985. — С. 20-23.
8. Изучение циркуляции некоторых арбовирусов в зонах смешанных и южно-таежных лесов русской равнины и их роли в патологии человека / А.А. Кузнецов [и др.] // Итоги науки и техники. Сер. Вирусол. — М.: ВИНТИ, 1991. — Т. 24. — С. 26-27.

9. Урбанизация эпидпроцесса лихорадки Западного Нила в Астраханской области / В.А. Юшков [и др.] // Здоровье населения и среда обитания: информ. бюл. – 1999. – № 12. – С. 15–17.

10. Изучение роли кровососущих комаров и мошек в циркуляции вирусов Западного Нила и серогруппы калифорнийского энцефалита на территории Беларуси / Т.И. Самойлова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, клиника, вирусология, микробиология, иммунология): материалы НИИЭМ по итогам выполнения ГНТП «Инфекции и медицинские биотехнологии» 2001–2005 гг. – Минск, 2005. – С. 29–34.

Поступила 24.09.2012

## INFECTING OF MOSQUITOES AND MIDGES WITH WEST NILE VIRUS IN THE BELARUS NATURAL FOCI

**Samoilova T.I.<sup>1</sup>, Azarova I.A.<sup>1</sup>, Tsvirko L.S.<sup>2</sup>, Kulakova M.N.<sup>1</sup>, Zalevskaya O.S.<sup>1</sup>,  
Yashkova S.E.<sup>3</sup>, Vedenkov A.L.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Republican Research Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk;*

<sup>2</sup>*Poleski State University, Pinsk;*

<sup>3</sup>*Republican Centre for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus*

The paper presents data on the West Nile virus detection using enzyme immunoassay in mosquitoes and midges in the Belarus natural foci in 2010–2011.

**Keywords:** West Nile virus, mosquitoes, midges, infection, ELISA, natural foci.

## ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ И РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ НА УРАЛЕ НА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПО ТУБЕРКУЛЕЗУ

**Подгаева В.А.<sup>1</sup>, Голубев Д.Н.<sup>1</sup>, Шулев П.Л.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии;*

<sup>2</sup>*Уральская государственная медицинская академия Минздрава России,  
Екатеринбург, Россия*

**Резюме.** Авторами проанализированы итоги деятельности учреждений противотуберкулезной службы по выявлению больных туберкулезом в 11 субъектах Урала за 2003–2011 гг. Изучено влияние организации и результативности выявления больных туберкулезной инфекцией на эпидемиологические показатели туберкулеза. Установлена дифференциация субъектов по коэффициентам, характеризующим организацию и результативность выявления больных туберкулезом. Доказана роль показателей, характеризующих организацию и результативность выявления больных туберкулезной инфекцией, в формировании эпидемиологических коэффициентов по туберкулезу. Полученные результаты используются при разработке мероприятий, направленных на улучшение организации и повышение результативности выявления больных туберкулезом.

**Ключевые слова:** туберкулез, организация, результативность выявления, эпидемиологическая ситуация.

**Введение.** Выявление туберкулеза занимает лидирующее место в комплексе противотуберкулезных мероприятий, результативность которого оценивается путем использования показателей, характеризующих организацию и эффективность обследования населения преимущественно рентгенофлюорографическим методом и проведения туберкулинодиагностики [1–5].

Необходимость оценки итогов работы учреждений, оказывающих первичную медико-санитарную и специализированную фтизиатрическую помощь по выявлению туберкулезной инфекции среди населения, в определенной степени обусловлена ролью

первых в формировании показателей, характеризующих эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу.

**Цель исследования:** характеристика результативности деятельности учреждений общей лечебной сети и противотуберкулезной службы по выявлению среди населения туберкулезной инфекции и определение вклада последнего в формирование коэффициентов, характеризующих эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу в субъектах Урала.

**Материалы и методы.** Для анализа итогов работы учреждений противотуберкулезной службы по выявлению больных туберкулезом на 11 территориях курации Федерального государственного бюджетного учреждения «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ФГБУ «УНИИФ» Минздравсоцразвития России) (Курганская, Кировская, Оренбургская, Свердловская, Тюменская и Челябинская области, Пермский край, Республика Башкортостан и Удмуртская Республика, Ханты-Мансийский-Югра и Ямало-Ненецкий автономные округа) за 2003–2011 гг. нами использовались показатели, рассчитанные на основе данных утвержденной формы государственной статистической отчетности: ф. № 30 «Сведения о лечебно-профилактическом учреждении».

При изучении взаимосвязи между коэффициентами, характеризующими организацию и результативность выявления пациентов, страдающих туберкулезом, и таковыми, определяющими эпидемиологическую ситуацию по туберкулезной инфекции, использовался метод квадратов Пирсона оценки сравниваемых статистических распределений с помощью коэффициента корреляции.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием компьютерной программы SPSS 10.1.

**Результаты и их обсуждение.** При анализе коэффициентов, характеризующих организацию и результативность выявления лиц, страдающих туберкулезом, в субъектах Урала за 2003–2011 гг. установлено, что охват населения всеми методами профилактических осмотров отличался тенденцией роста анализируемого коэффициента в 2003–2004, 2007–2008, 2008–2009, 2009–2010 и 2010–2011 гг., темп прироста которого соответствовал 6,4; 13,6; 4,7; 0,8 и 0,7%, тогда как в 2004–2007 гг. наблюдалось снижение показателя (табл. 1). Темп убыли показателя в течение вышеуказанного периода был неоднозначным и колебался от -2,7% в 2004–2005 гг. до -10,5% в 2005–2006 гг. Охват населения всеми методами профилактических осмотров в 2011 г. был равен 72,8%, что выше аналогичного показателя 2003 г. на 3,9% (70,1%).

Таблица 1 — Динамика показателей, характеризующих организацию и результативность выявления больных туберкулезом на Урале, в 2003–2011 гг.

Наименование показателя	Годы								
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Охват населения всеми методами профилактических осмотров, %	70,1	74,6	72,6	65,0	60,3	68,5	71,7	72,3	72,8
Доля пациентов с туберкулезом, у которых заболевание было выявлено при профосмотрах, %	56,6	59,4	58,5	59,1	59,4	60,9	62,7	61,7	60,0
Охват флюорографическими осмотрами лиц в возрасте 15 лет и старше, %	67,6	65,5	65,9	62,5	65,1	57,2	68,6	67,5	71,6
Выявляемость активного туберкулеза среди населения 15 лет и старше методом профилактической флюорографии, на 1000 обследованных	0,7	0,9	0,8	0,9	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7
Охват детей 0–14 лет туберкулинодиагностикой, %	95,1	95,5	95,8	96,8	84,5	91,7	90,6	98,2	97,7
Выраж туберкулиновых проб, %	1,5	1,4	1,5	1,4	1,6	1,4	1,3	1,0	1,0

Охват населения всеми методами профилактических осмотров в субъектах Урала в 2003–2011 гг. был неоднозначным и колебался от 56,6% в Свердловской области (2003) до 98,4% в Ханты-Мансийском автономном округе — Югре (2005). Различие максимальной и минимальной величин составило 1,7 раза.

В 2011 г. диапазон значений показателя в разрезе субъектов был следующий: наименьший его уровень отмечался в Удмуртской Республике (69%), наибольший — в Ямало-Ненецком автономном округе (86%) (табл. 2). Различие вышеуказанных величин показателя было равно 1,2 раза.

Показатель доли впервые выявленных пациентов, страдающих туберкулезом, у которых заболевание было выявлено при профосмотрах, в течение 2003–2011 гг. на Урале имел негативную динамику в 2003–2004 и 2006–2009 гг. (табл. 1). Темп прироста коэффициента в вышеуказанные периоды времени отличался дисперсией показателя и колебался от 0,3% в 2008–2009 гг. до 4,9% в 2003–2004 гг. В 2004–2005, 2009–2010 и 2010–2011 гг. отмечалось снижение уровня анализируемого показателя, темп убыли которого составил соответственно -1,5; -1,6 и -2,8%. В 2009 г. наблюдался максимальный уровень пациентов, у которых заболевание было выявлено при профосмотрах, за девятилетний период наблюдения, составив 62,7%, что выше аналогичного 2003 г. на 10,8%.

Доля впервые выявленных пациентов, у которых заболевание было обнаружено при профосмотрах, в субъектах Урала в 2003–2011 гг. была неоднозначной и варьировал от 48% в Удмуртской Республике (2003) до 71,2% в Ханты-Мансийском автономном округе — Югре (2009). Различие максимальной и минимальной величин показателя составило 1,5 раза.

В 2011 г. диапазон значений в разрезе субъектов был следующий: наименьший его уровень отмечался в Курганской области (52,5%), наибольший — в Ханты-Мансийском автономном округе — Югре (65,1%) (табл. 2). Различие вышеуказанных величин показателя составило 1,2 раза.

Таблица 2 — Показатели, характеризующие организацию и результативность выявления больных туберкулезом в субъектах Урале, в 2011 г.

Показатель/Территория	А	Б	В	Г	Д	Е
Кировская область	71,3	62,9	74,2	0,4	97,9	1,6
Курганская область	80,8	52,5	66,6	1,0	96,1	1,1
Оренбургская область	74,6	64,0	65,2	0,8	96,6	3,1
Пермский край	73,3	58,5	69,4	0,7	98,6	1,1
Республика Башкортостан	70,8	61,0	64,8	0,4	99,8	0,6
Свердловская область	74,0	59,4	61,2	1,0	99,6	0,8
Тюменская область	80,9	61,5	85,4	0,8	97,1	1,0
Удмуртская Республика	69,0	58,7	65,9	0,6	97,7	0,8
Ханты-Мансийский автономный округ-Югра	75,2	65,1	84,4	0,7	94,8	0,4
Челябинская область	71,2	58,1	65,4	0,8	103,2	0,6
Ямало-Ненецкий автономный округ	86,0	64,6	88,6	0,5	92,7	1,6

Примечание:

1. А — Охват населения всеми методами профилактических осмотров,%;
2. Б — Доля больных туберкулезом, у которых заболевание было выявлено при профосмотрах,%;
3. В — Охват флюорографическими осмотрами лиц в возрасте 15 лет и старше,%;
4. Г — Выявляемость активного туберкулеза среди населения 15 лет и старше методом профилактической флюорографии, на 1000 обследованных;
5. Д — Охват детей 0–14 лет туберкулинодиагностикой,%;
6. Е — Выраж туберкулиновых проб,%.

Основным и эффективным методом выявления туберкулеза среди лиц 15 лет и старше является рентгенофлюорография. Данным методом осуществляются массовые

обследования, как определенных групп населения в результате прохождения обязательных медицинских осмотров, так и пациентов, обратившихся за медицинской помощью в лечебно-профилактические учреждения общей лечебной сети по поводу каких-либо заболеваний. Кроме того, рентгенофлюорографический метод обследования используется при выявлении туберкулеза в группах повышенного риска (эпидемиологических, социальных, медицинских) данного заболевания [3–5].

Динамика показателя охвата флюорографическими осмотрами населения 15 лет и старше в 2003–2011 гг. на Урале свидетельствует о росте показателя в 2004–2005, 2006–2007, 2008–2009 и 2010–2011 гг. (табл. 1). Темп прироста коэффициента в вышеуказанные периоды времени составил соответственно 0,6; 4,2; 19,9 и 6,1%. В 2005–2006, 2007–2008 и 2009–2010 гг. наблюдалось снижение уровня анализируемого показателя, темп убыли которого соответствовал -5,1, -12,1 и -1,6%. В 2011 г. показатель охвата флюорографическими осмотрами населения 15 лет и старше, составив 71,6%, был выше такового 2003 г. на 5,9% (67,6%).

При оценке охвата флюорографическими осмотрами населения 15 лет и старше в разрезе субъектов Урала в 2003–2011 гг. установлено, что величина показателя на протяжении анализируемого периода времени отличалась разбросом первого и находилась в следующем диапазоне: наименьший уровень коэффициента отмечался в 2006 г. в Свердловской области (53,8%), наибольший — в 2007 г. в Ямало-Ненецком автономном округе (93,1%). Различие максимальной и минимальной величин показателя составило 1,7 раза.

В 2011 г. охват флюорографическими осмотрами населения 15 лет и старше варьировал от 61,2% в Свердловской области до 88,6% в Ямало-Ненецком автономном округе (табл. 2). Различие вышеуказанных величин показателя было равно 1,4 раза.

Динамика выявляемости активного туберкулеза среди населения 15 лет и старше методом профилактической флюорографии в 2003–2011 гг. носила разновекторный характер (табл. 1). В 2003–2004 и 2005–2006 гг. отмечался рост величины данного коэффициента, темп прироста показателя соответственно составил 28,6 и 12,5%. Снижение выявляемости активного туберкулеза среди населения 15 лет и старше методом профилактической флюорографии установлено в 2004–2005, 2006–2007 и 2009–2010 гг., темп убыли значений которого в вышеуказанные временные периоды составлял соответственно -11,1, -11,1 и 12,5%. В 2007–2008 и 2008–2009 гг. уровень выявляемости активного туберкулеза среди населения 15 лет и старше методом профилактической флюорографии был неизменен и равен 0,8 на 1000 обследованных данным методом, в 2010–2011 гг. — 0,7 на 1000 обследованных. В 2011 г. величина анализируемого показателя не отличалась от таковой 2003 г., составив 0,7 на 1000 обследованных методом профилактической флюорографии.

Показатель выявляемости активного туберкулеза среди населения 15 лет и старше методом профилактической флюорографии в субъектах Урала в 2003–2011 гг. отличался неоднозначностью значений первого и варьировал от 0,4 на 1000 обследованных в Республике Башкортостан (2008), Кировской области (2011) до 1,5 на 1000 обследованных в Курганской области (2007). Различие максимальной и минимальной величин показателя составило 3,7 раза. В 2011 г. диапазон значений показателя в разрезе территорий был следующий: наименьший его уровень отмечался в Республике Башкортостан (0,4 на 1000 обследованных), наибольший — в Курганской и Свердловской обл. (1,0 на 1000 обследованных) (табл. 2). Различие вышеуказанных величин показателя составило 2,5 раза.

Динамика охвата детей в возрасте 0–14 лет туберкулинодиагностикой в 2003–2011 гг. на Урале свидетельствует о росте показателя в 2003–2006, 2007–2008 и 2009–2010 гг. (табл. 1). Темп прироста показателя отличался дисперсией величины и колебался от 0,3% в 2004–2005 гг. до 8,5% в 2007–2008 гг. В 2006–2007, 2008–2009 и 2010–2011 гг. наблюдалось снижение показателя охвата детей в возрасте 0–14 лет туберкулинодиагностикой.

В 2011 г. охват детей в возрасте 0–14 лет туберкулинодиагностикой, составив 97,7%, не превысил подобный показатель 2003 г. (95,1%) и был ниже последнего на 2,7%.

При оценке охвата детей в возрасте 0–14 лет туберкулинодиагностикой в разрезе субъектов Урала в 2003–2011 гг. установлено, что величина показателя на протяжении анализируемого периода времени была неоднозначной, и находилась в следующем диапазоне: наименьший уровень коэффициента наблюдался в 2007 г. в Республике Башкортостан (60,4%), наибольший — в 2011 г. в Челябинской области (103,2%). Различие максимального и минимального значений составило 1,7 раза. В 2011 г. показатель охвата детей в возрасте 0–14 лет туберкулинодиагностикой в субъектах, курируемых ФГБУ «УНИИФ» Минздравсоцразвития России, колебался от 92,7% в Ямало-Ненецком автономном округе до 103,2% в Челябинской области (табл. 2). Различие вышеуказанных значений составило 1,1 раза.

Выраж туберкулиновых проб в 2003–2011 гг. на Урале характеризовался волнообразной динамикой показателя. Так, в 2003–2004, 2005–2006, 2007–2008 и 2008–2010 гг. отмечалось уменьшение величины последнего, тогда как в 2004–2005 и 2006–2007 гг. — рост (табл. 1). Темп убыли анализируемого коэффициента в течение вышеуказанных периодов времени варьировал от -6,7% в 2003–2004 и 2005–2006 гг. до 23,1% в 2009–2010 гг. Темп прироста показателя в 2004–2005 и 2006–2007 гг. составлял 7,1 и 14,3% соответственно. В 2011 г. выраж туберкулиновой пробы на Урале был равен 1,0%, что ниже такового 2003 г. на 33,3% (1,5%).

Показатель выража туберкулиновых проб в субъектах Урала в 2003–2011 гг. отличался разбросом величины первого и колебался от 0,6% в Челябинской области (2006–2007 и 2011 гг.) и Республике Башкортостан (2011 г.) до 3,3% в Оренбургской области (2009 г.). Различие максимального и минимального значений составило 5,5 раза.

При анализе взаимосвязи между показателями, характеризующими организацию и результативность выявления туберкулеза, и эпидемиологическими данными по туберкулезной инфекции установлено следующее: заболеваемость населения туберкулезом тесно взаимосвязана с показателем выявляемости активного туберкулеза среди населения 15 лет и старше методом профилактической флюорографии ( $r_{xy} = 0,832$ ,  $p < 0,01$ ), а также с таковым выража туберкулиновых проб ( $r_{xy} = 0,374$ ,  $p < 0,01$ ).

Обратная корреляционная связь средней силы выявлена между показателем заболеваемости населения туберкулезом с бактериовыделением (определяемым любым методом) и коэффициентами охвата населения всеми методами медицинских осмотров ( $r_{xy} = -0,319$ ,  $p < 0,01$ ), флюорографическими осмотрами населения 15 лет и старше ( $r_{xy} = -0,369$ ,  $p < 0,01$ ).

Прямая корреляционная связь средней силы установлена между показателем заболеваемости населения туберкулезом с бактериовыделением и выявляемостью активного туберкулеза среди населения 15 лет и старше методом профилактической флюорографии ( $r_{xy} = 0,649$ ,  $p < 0,01$ ).

Заболеваемость туберкулезом органов дыхания с бактериовыделением с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя проявляет прямую корреляционную связь средней силы с показателем выража туберкулиновых проб ( $r_{xy} = 0,340$ ,  $p < 0,01$ ).

С охватом флюорографическими осмотрами населения 15 лет и старше коррелирует коэффициент заболеваемости населения туберкулезом органов дыхания в фазе распада ( $r_{xy} = -0,310$ ,  $p < 0,01$ ).

Прямые корреляционные связи различной силы установлены между показателем выявляемости активного туберкулеза среди населения 15 лет и старше методом профилактической флюорографии и таковыми заболеваемости населения фиброзно-кавернозным туберкулезом легких ( $r_{xy} = 0,875$ ,  $p < 0,01$ ), туберкулезом органов дыхания в фазе распада ( $r_{xy} = 0,691$ ,  $p < 0,01$ ), заболеваемости детским туберкулезом 0–14 и 15–17 лет ( $r_{xy} = 0,384$ ,  $p < 0,01$  и  $r_{xy} = 0,667$ ,  $p < 0,01$ , соответственно).

Показатель виража туберкулиновых проб наряду с вышеуказанными зависимостями взаимосвязан с коэффициентами заболеваемости деструктивным туберкулезом органов дыхания ( $r_{xy} = 0,346$ ,  $p < 0,01$ ), заболеваемостью туберкулезом детей в возрасте 0–14 и 15–17 лет ( $r_{xy} = 0,493$ ,  $p < 0,01$  и  $r_{xy} = 0,458$ ,  $p < 0,01$  соответственно).

При анализе взаимосвязи между показателями, характеризующими организацию и результативность выявления туберкулеза, и таковыми распространенности туберкулеза среди населения установлено, что показатель выявляемости активного туберкулеза среди населения 15 лет и старше методом профилактической флюорографии коррелирует с коэффициентами распространенности туберкулеза среди населения ( $r_{xy} = 0,627$ ,  $p < 0,01$ ), распространенности туберкулеза органов дыхания в фазе распада ( $r_{xy} = 0,655$ ,  $p < 0,01$ ), распространенности туберкулеза легких с бактериовыделением ( $r_{xy} = 0,550$ ,  $p < 0,01$ ), распространенности туберкулезом детей 0–14 лет ( $r_{xy} = 0,373$ ,  $p < 0,01$ ). Обратная средней силы корреляционная связь определена между показателем распространенности фиброзно-кавернозного туберкулеза и выявляемостью активного туберкулеза среди населения 15 лет и старше методом профилактической флюорографии ( $r_{xy} = -0,460$ ,  $p < 0,01$ ), что указывает на выявление вышеуказанным методом в случае своевременного применения последнего при неосложненных формах заболевания.

Показатель распространенности туберкулеза детей 15–17 лет проявляет корреляционную связь с коэффициентами охвата населения всеми методами профилактических осмотров и детей 0–14 лет туберкулинодиагностикой ( $r_{xy} = 0,214$ ,  $p < 0,01$  и  $r_{xy} = 0,577$ ,  $p < 0,01$  соответственно). Вышеуказанные установленные корреляционные связи доказывают необходимость проведения медицинских осмотров, включая туберкулинодиагностику, с целью выявления и последующего лечения заболевания, особенно у наиболее подверженных туберкулезу групп населения.

Прямые средней силы корреляционные связи установлены между показателем виража туберкулиновых проб и коэффициентами распространенности туберкулеза среди населения ( $r_{xy} = 0,344$ ,  $p < 0,01$ ), деструктивного туберкулеза органов дыхания ( $r_{xy} = 0,502$ ,  $p < 0,01$ ), туберкулеза органов дыхания с бактериовыделением и множественной лекарственной устойчивостью возбудителя ( $r_{xy} = 0,439$ ,  $p < 0,01$ ), туберкулеза легких с бактериовыделением ( $r_{xy} = 0,388$ ,  $p < 0,01$ ), туберкулеза детей 0–14 и 15–17 лет ( $r_{xy} = 0,324$ ,  $p < 0,01$  и  $r_{xy} = 0,402$ ,  $p < 0,01$  соответственно).

При оценке коэффициентов корреляции между показателями смертности населения от туберкулеза и таковыми, характеризующими организацию и результативность выявления заболевания, определено, что между охватом населения всеми методами профилактических осмотров и долей умерших от туберкулеза впервые выявленных лиц с активными формами заболевания, состоящих на учете в противотуберкулезных учреждениях менее 1 года, существует обратная средней силы корреляционная связь ( $r_{xy} = -0,384$ ,  $p < 0,01$ ).

С показателем выявляемости туберкулеза при профосмотрах коррелируют такие показатели смертности, как удельный вес умерших от туберкулеза впервые выявленных лиц с активными формами заболевания, состоящих на учете в противотуберкулезных учреждениях менее 1 года ( $r_{xy} = -0,653$ ,  $p < 0,01$ ), доля умерших от туберкулеза впервые выявленных пациентов, диагноз у которых установлен посмертно ( $r_{xy} = -0,456$ ,  $p < 0,01$ ).

Коэффициент охвата флюорографическими осмотрами населения 15 лет и старше проявляет прямую корреляционную связь средней силы с показателем смертности населения от туберкулеза, что, по-видимому, связано с привлечением к прохождению вышеуказанных медицинских осмотров групп риска по данному инфекционному заболеванию, включая социально незащищенные слои населения.

Обратные корреляционные связи средней силы установлены между показателем охвата населения флюорографическими осмотрами населения 15 лет и старше и таковыми доли умерших от туберкулеза впервые выявленных больных активными формами заболевания,

состоящих на учете в противотуберкулезных учреждениях менее 1 года ( $r_{xy} = -0,483$ ,  $p < 0,01$ ), удельного веса умерших от туберкулеза впервые выявленных пациентов, диагноз у которых установлен посмертно ( $r_{xy} = -0,398$ ,  $p < 0,01$ ), что доказывает целевую направленность проведения первых — своевременное выявление заболевания туберкулезом.

Показатель выявляемости активного туберкулеза среди населения 15 лет и старше методом профилактической флюорографии коррелирует с коэффициентом смертности населения от туберкулеза ( $r_{xy} = +0,674$ ,  $p < 0,01$ ), а также долей умерших в туберкулезных стационарах от активных форм туберкулеза состоящих на учете в противотуберкулезных учреждениях ( $r_{xy} = -0,726$ ,  $p < 0,01$ ). Данные корреляционные связи, с одной стороны, объясняют возможность выявления вышеуказанным методом различных форм заболевания, включая трудноизлечимые, с другой стороны, в результате своевременного использования первого позволяют выявлять заболевание на ранних стадиях с последующим лечением в учреждениях, использующих стационарзамещающие технологии, и амбулаторно-поликлинических медицинских организациях.

Обратные средней силы корреляционные связи установлены между показателем виража туберкулиновых проб и коэффициентами доли умерших от туберкулеза впервые выявленных лиц с активными формами заболевания, состоящих на учете в противотуберкулезных учреждениях менее 1 года ( $r_{xy} = -0,332$ ,  $p < 0,01$ ), удельного веса умерших от туберкулеза впервые выявленных пациентов, диагноз у которых установлен посмертно ( $r_{xy} = -0,349$ ,  $p < 0,01$ ).

**Выводы.** На Урале при оценке деятельности противотуберкулезной службы установлена дифференциация субъектов по коэффициентам, характеризующим организацию и результативность выявления туберкулеза.

Доказана роль показателей, характеризующих организацию и результативность выявления туберкулезной инфекции, в формировании эпидемиологических показателей по данной патологии.

Полученные результаты исследования используются федеральным научно-исследовательским институтом, руководителями противотуберкулезных учреждений при разработке мероприятий, направленных на улучшение организации и повышение результативности лечения и излечения больных туберкулезом.

#### Литература

1. Аксенова, В.А. Туберкулез у детей и подростков / В.А. Аксенова, С.А. Стерликов, Е.М. Белиловский // Туберкулез в Российской Федерации, 2010 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации. – М., 2011. – С. 94–110.
2. Белиловский, Е.М. Заболеваемость туберкулезом в Российской Федерации / Е.М. Белиловский, С.Е. Борисов, И.М. Сон // Туберкулез в Российской Федерации, 2010 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации. – М., 2011. – С. 27–67.
3. Горбунов, А.В. Выявление больных туберкулезом при использовании малодозовых цифровых флюорографических установок / А.В. Горбунов, А.Б. Казаков // Приоритетные направления в обеспечении результативности системы противотуберкулезных мероприятий в современных эпидемиологических условиях. – Екатеринбург: Полиграфист, 2008. – С. 23–25.
4. Морозова, Т.И. Выявление туберкулеза как способ контроля за эпидемической ситуацией / Т.И. Морозова // Приоритетные направления в обеспечении результативности системы противотуберкулезных мероприятий в современных эпидемиологических условиях. – Екатеринбург: Полиграфист, 2008. – С.35–36.
5. Нечаева, О.Б. Проблемы выявления туберкулеза органов дыхания в Свердловской области / О.Б. Нечаева, Е.И. Скачкова, Э.В. Арефьева // Приоритетные направления в обеспечении результативности системы противотуберкулезных мероприятий в современных эпидемиологических условиях. – Екатеринбург: Полиграфист, 2008. – С. 38–44.

Поступила 20.07.2012

# INFLUENCE OF THE ORGANIZATION AND PRODUCTIVITY OF IDENTIFICATION OF THE TUBERCULAR INFECTION ON EPIDEMIOLOGICAL INDICATORS OF TUBERCULOSIS IN THE URAL

Podgayeva V.A.<sup>1</sup>, Golubev D.N.<sup>1</sup>, Shulev P.L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Ural Research Institute for Phthiziopulmonology;*

<sup>2</sup>*Ural State Medical Academy, Minzdravsocrazvitia Rossii, Yekaterinburg, Russia*

In the paper results of activity of antituberculosis service institutions on identification of tuberculosis patients in 11 subjects of Ural for the period of 2003–2011 have been analyzed. It was studied an influence of the organization and productivity of identification of patients with tuberculosis on epidemiological indicators of tuberculosis. Differentiation of the subjects under the factors characterizing the organization and productivity of identification of patients with tuberculosis was established. It was proved the role of the indicators characterizing the organization and productivity of identification of patients with tuberculosis in formation of epidemiological tuberculosis factors. The research results obtained are used under developing the actions directed on improvement of the organization and increase of productivity of identification of patients with tuberculosis.

**Keywords:** tuberculosis, organization, productivity of identification, epidemiological situation.

## ТИСК-ВЕКТОРНЫЕ ИНФЕКЦИИ (КЛЕЩЕВОЙ ВИРУСНЫЙ ЭНЦЕФАЛИТ И ИКСОДОВЫЕ КЛЕЩЕВЫЕ БОРРЕЛИОЗЫ) В УСЛОВИЯХ МЕГАПОЛИСА. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА

Голубкова А.А.<sup>1</sup>, Дорогина Ю.В.<sup>2</sup>, Шашина Н.И.<sup>3</sup>, Корначев А.С.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России, Екатеринбург;*

<sup>2</sup>*ЦЕФ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области», Екатеринбург;*

<sup>3</sup>*ФГУН «Научно-исследовательский институт дезинфектологии»*

*Роспотребнадзора, Москва;*

<sup>4</sup>*ФГУН «Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии», Тюмень, Россия*

**Резюме.** На основании результатов комплексных эпидемиологических и зоолого-энтомологических исследований определены эколого-эпидемиологические особенности сочетанного очага клещевого вирусного энцефалита (КВЭ) и иксодовых клещевых боррелиозов, сформировавшегося на территории мегаполиса. Дана оценка эпидемиологической эффективности специфической профилактики КВЭ в условиях разных стратегий иммунизации. Установлены приоритеты в мероприятиях по неспецифической профилактике с учетом поведенческих рисков отдельных возрастных групп, вероятности их инфицирования и ведущих путей распространения инфекции.

**Ключевые слова:** Тиск-векторные инфекции, мегаполис, профилактика.

**Введение.** Тиск-векторные, или передающиеся иксодовыми клещами природно-очаговые инфекции (ПОИ), такие как клещевой вирусный энцефалит (КВЭ) и иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБО и их микст-формы, представляют серьезную проблему для здравоохранения ряда стран и прежде всего России [1, 2]. По мнению большинства исследователей, повсеместный рост заболеваемости ПОИ в последней четверти XX в. был обусловлен антропогенной трансформацией лесных ландшафтов, увеличением контактов населения с природными очагами, свертыванием в 90-е гг. мероприятий по контролю численности клещей и их прокормителей [3–5].

Ограниченные возможности для специфической профилактики большинства ПОИ,

поскольку вакцина существует только при КВЭ, пока что не могут реально изменить ситуацию [2, 6, 7]. Необходим комплексный подход с гармонизацией мероприятий по специфической и неспецифической профилактике ПОИ. Несмотря на повсеместно реализуемые программы вакцинопрофилактики КВЭ, по сию пору не определены те уровни охвата прививками и стратегии иммунопрофилактики, которые способны повлиять на эпидемический процесс (ЭП). Не в полной мере дана оценка современных средств и методов дезинфекционной профилактики, в т.ч. индивидуальной защиты людей от нападения клещей при использовании барьерных и химических средств.

Эмергентные характеристики эпидемического процесса КВЭ и ИКБ в сочетанном очаге, сформировавшемся на территории мегаполиса, обусловили наш интерес к определению приоритетных направлений эпидемиологического контроля этих двух наиболее распространенных ПОИ.

**Цель исследования:** определить эколого-эпидемиологические особенности сочетанного очага КВЭ и ИКБ на территории мегаполиса для оптимизации мероприятий эпидемиологического контроля.

**Материалы и методы.** Эколого-эпидемиологические и зоолого-энтомологические исследования проведены в период с 1999 по 2010 гг. (12 лет) на территории крупного промышленного центра, расположенного в границах природного очага КВЭ и ИКБ. Они включали анализ заболеваемости, изучение ландшафтов по численности грызунов с определением их видового состава, заклещевленности территорий, и вирусофорности клещей.

С целью изучения влияния на заболеваемость КВЭ разных стратегий вакцинопрофилактики за 1990–2010 гг. (20 лет) по г. Екатеринбург проанализированы данные отчетов «О проведенных профилактических прививках» (ф 005).

В рамках клинического метода анализировали проявления болезни у лиц с разным прививочным анамнезом. В процессе исследования обработаны данные 32934 лабораторных анализов (ИФА) на пациентов, госпитализированных в специализированные отделения с диагнозами КВЭ и ИКБ.

В рамках социологического метода по специально разработанной анкете изучали информированность жителей о правилах поведения на неблагополучных по ПОИ территориях с дифференциацией мест присасывания клещей.

Экспериментальный метод включал использование защитных свойств специального костюма марки «Биостоп» в различных погодных условиях и при разной степени заклещевленности территории.

В работе использованы общепринятые приемы статистической обработки материала с вычислением стандартной ошибки ( $m$ ), среднеквадратичного отклонения ( $\delta$ ). Достоверность различий рассчитывали по  $t$ -критерию Стьюдента, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . При расчете были использованы методы вариационной статистики и дисперсионного анализа. С помощью диаграммы рассеивания определяли детерминационную зависимость между охватом прививками жителей города и заболеваемостью КВЭ. Расчет относительных рисков проводили по дискретным и интервальным данным. Данные, представленные дискретными переменными, анализировали с помощью таблиц сопряженности, а интервальными (количественными) — с помощью методов вариационной статистики:  $t$ -критерий для парных выборок и однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

**Результаты и их обсуждение.** Ландшафтно-экологическая характеристика г. Екатеринбурга имела ряд отличительных особенностей, которые позволяли объяснить те условия, которые сложились на территории мегаполиса для циркуляции вируса клещевого энцефалита (КВЭ) и спирохеты — *B. burdorferi*. Так, лесопарковое кольцо г. Екатеринбурга — самое крупное в пределах Уральского региона, общей площадью более 13 тыс. га. При этом все

парки и лесопарки находятся в городской черте, занимая одну четвертую часть его площади. Особенность лесопарков в том, что на пригородных территориях они переходят в леса и граница между ними нивелируется, а все парки города расположены внутри селитебной территории. Преобладание смешанных хвойно-лиственных лесов с выраженным подлеском и высоким травостоем создает оптимальные условия для жизнедеятельности основных прокормителей клещей. Следует отметить, что континентальный климат территории является достаточно благоприятным и для развития клещей. Богатые природные ресурсы в пригороде г. Екатеринбурга активно используются горожанами для коттеджного строительства, сбора грибов и ягод.

В условиях сочетанного очага КВЭ и ИКБ можно говорить как об общих закономерностях эпидемического процесса этих инфекций, так и об особенностях, характеризующих каждую из них. В целом заболеваемость проявляла умеренную тенденцию к снижению, преимущественно за счет КВЭ. Доля ИКБ составляла до 70%. В динамике за 12-летний период можно было выделить незначительные подъемы общей заболеваемости КВЭ и ИКБ с интервалами 3–4 года и 2 наиболее значимых по уровню заболеваемости года (1999 и 2009 гг.) с интервалом между ними в 11 лет. Внутри календарного года общая заболеваемость КВЭ и ИКБ распределялась достаточно неравномерно и коррелировала с сезоном активности переносчиков. В течение календарного года продолжительность времени регистрации этих двух природно-очаговых инфекций в среднем составляла 27–28 недель при несколько большей продолжительности у ИКБ (31 неделя). Среди заболевших преобладали взрослые, доля которых в отдельные годы составляла от 83,1 до 95,5%, а среднемноголетняя заболеваемость соответствовала  $37,3 \pm 0,5$  на 100 тыс. жителей. Более половины из них (54,8%) составляли лица в возрасте старше 50 лет. Возраст заболевших определял их социальную ориентацию, так как доля неработающих составляла до 42,0%.

При раздельном анализе каждой из нозологических форм были установлены различия в уровне заболеваемости, ее тенденциях, продолжительности сезонного подъема и месяцах с наиболее высоким уровнем заболеваемости, интенсивности ЭП среди детей и взрослых, гендерной характеристике и др. (табл. 1).

Таблица 1 — Основные характеристики эпидемического процесса клещевого вирусного энцефалита и иксодовых клещевых боррелиозов за 1999–2010 гг.

Показатели	Общая заболеваемость КВЭ и ИКБ	Клещевой вирусный энцефалит	Иксодовые клещевые боррелиозы
	1	2	3
Средний многолетний уровень (СМУ)	$34,3 \pm 0,4\%_{000}$ (p1,p2<0,05)	$10,6 \pm 0,2\%_{000}$ (p2,p3<0,05)	$23,6 \pm 0,4\%_{000}$ (p2,p3<0,05)
Тенденция	умеренное снижение	выраженное снижение	умеренный рост
Продолжительность сезона	31 нед.	25 нед.	31 нед.
Месяцы наибольшего подъема	3 (июнь-август)	3 (май-июль)	3 (июнь-август)
СМУ заболеваемости взрослого населения	$37,3 \pm 0,5\%_{000}$ (p1,p2<0,05)	$11,4 \pm 0,3\%_{000}$ (p2,p3<0,05)	$25,8 \pm 0,4\%_{000}$ (p1,p3<0,05)
СМУ заболеваемости детей	$18,1 \pm 0,8\%_{000}$ (p1,p2<0,05)	$6,6 \pm 0,5\%_{000}$ (p2,p3<0,05)	$11,4 \pm 0,6\%_{000}$ (p1,p3<0,05)
Соотношение мужчин/женщин	1,2 / 1	1,4 / 1	1,1 / 1
Доля лиц старше 50 лет	54,8% (p1,p2<0,05)	45,0% (p2,p3<0,05)	59,2% (p1,p3>0,05)
Доля лиц старше 60 лет	63,0% (p1,p2>0,05)	62,7% (p2,p3>0,05)	63,1% (p1,p3>0,05)

При изучении зоолого-энтомологических особенностей сочетанного очага КВЭ и ИКБ, сформировавшегося на территории города, была установлена высокая заклещевленность

парков, находящихся в селитебной зоне города, и лесопарков (от 10 до 32 клещей на 1 фл/км). В результате доля подвергшихся нападению клещей в пределах городской черты составляла  $32,7 \pm 0,4\%$  и в динамике увеличивалась.

В целом среднее многолетний показатель пострадавших от нападения клещей составил  $690,3 \pm 2,1\text{‰}$ , а в годы подъемов заболеваемости он увеличивался до  $1081\text{‰}$ . Для большинства городских парков была характерной высокая вирусофорность клещей, которая составляла в среднем  $3,0\%$ , с колебаниями в отдельные годы от  $1,4$  до  $8,8\%$ , при этом клещей обнаруживали в разных стадиях развития, что свидетельствовало о формировании «оседлой» популяции клещей в пределах городской черты при стабильно высокой заселенности территории грызунами. Относительный показатель «численности грызунов на 1000 кв. м. строений» в течение последних 8 лет наблюдения постоянно держался в градации «много». Видовой состав грызунов был представлен домовый мышью и серой крысой, на пригородных территориях дополнительно обнаруживались лесные мыши и рыжие полевки.

Постоянно увеличивалась и доля горожан, заразившихся КВЭ в черте города. Так, если в 2002 г. она составляла  $24,7\%$ , то в 2010 г. — уже  $42,1\%$  ( $t > 2$ ,  $p < 0,05$ ). При ИКБ доля заразившихся боррелиозами в городской черте колебалась по годам от  $30,2$  до  $49,8\%$  ( $t > 2$ ). За 2008–2010 гг. была определена частота развития различных клинических форм КВЭ среди заболевших, в зависимости от места нападения клещей (в черте города или за пределами городской черты). Было установлено, что при нападении клещей в черте города у заболевших КВЭ в  $1,5$  чаще развивались более тяжелые формы инфекции (очаговые и менингеальные) по сравнению с лицами, подвергшимися нападению клещей за пределами городской черты.

Таким образом, на территории крупного промышленного центра сформировался совершенно иной по своим характеристикам сочетанный очаг КВЭ и ИКБ, критериями высокой степени активности которого мы считали 5 его характеристик, а именно: заклещевленность территории (более 1 клеща на фл/км), вирусофорность (более  $3\%$ ), заселенность территории грызунами (более 1 на 1000 кв. м строений), факты нападения клещей в пределах селитебной территории и заболеваемость КВЭ и ИКБ более 6 на 1000 пострадавших от укусов клещей.

На активность очага влияли не только природные факторы, но и метеоусловия. Они определяли как активность клещей и грызунов, так и частоту посещения опасных территорий жителями. В результате построения диаграммы рассеивания при ИКБ была выявлена детерминационная зависимость между анализируемыми показателями в  $90,9\%$ , что свидетельствовало о сильной корреляционной связи. При КВЭ такая зависимость была менее выраженной и составляла  $32,7\%$ , что свидетельствовало о том, что на заболеваемость КВЭ помимо метеоусловий, оказывали влияние и другие факторы, например, привитость населения мегаполиса (рисунок 1).

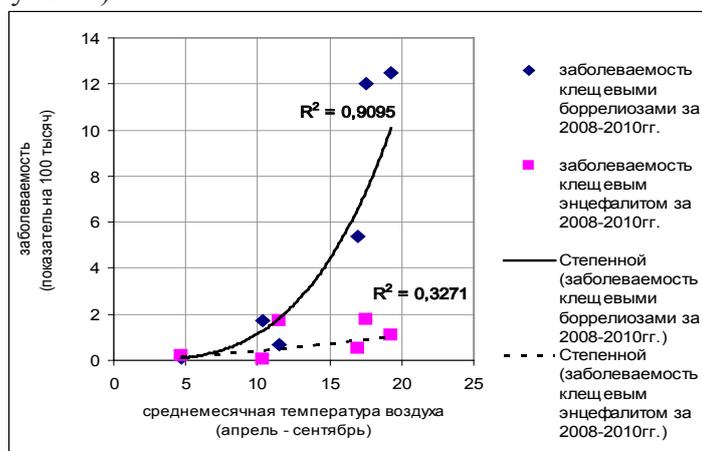


Рисунок — Оценка связи между влиянием среднемесячных температур и заболеваемостью иксодовыми клещевыми боррелиозами и клещевым вирусным энцефалитом за 2008–2010 гг.

Влияние на заболеваемость КВЭ привитости было исследовано в течение 3-х временных интервалов, разделяющихся по стратегиям иммунизации (селективная иммунизация — 1990–1996 гг.; иммунизация по эпидемическим показаниям — 1997–2003 гг.; плановая иммунизация — с 2004 по 2010 гг.).

Было установлено, что по мере увеличения полноты охвата прививками жителей мегаполиса произошли существенные изменения в эпидемиологии этой инфекции, а также в частоте регистрации отдельных ее клинических форм (табл. 2).

Таблица 2 — Сравнительная характеристика эпидемического процесса клещевого вирусного энцефалита в разные периоды иммунизации

Показатели	Период селективной иммунизации	Период иммунизации по эпидемическим показаниям	Период плановой иммунизации
Средний многолетний уровень (СМУ)	27,8±0,5‰	20,4±0,4‰	8,1±0,3‰
Тенденция	Рост	Снижение	Снижение
Темп роста/снижения	25,0%	- 17,0%	- 13,3%
Продолжительность времени регистрации	22–23 недели	22–23 недели	22–23 недели
Обращаемость городских жителей в травмпункты	2 158,3±12,3‰	620,3±6,6‰	714,0±2,7‰
Доля лиц старше 55 лет среди заболевших	41,4%	35,0%	32,6%
Доля привитых лиц среди заболевших	-	12,4%	15,8%
Лихорадочные формы	65,0±0,5%	77,6±1,0%	69,1±1,0%
Менингеальные формы	24,0±1,0%	18,6±2,5%	21,1±5,0%
Очаговые формы	1,3±0,2%	3,8±0,5%	9,8±3,4%

В период селективной иммунизации, когда охват прививками не превышал 20,0%, заболеваемость КВЭ соответствовала 27,8±0,5‰, при значительной доле в ее структуре менингеальных и очаговых форм (35%) и летальности 1,3%.

Во второй период при достижении охвата прививками в 64,3%, произошло снижение заболеваемости до уровня 20,4±0,4‰ и изменения в структуре регистрируемых клинических проявлений инфекции, в сторону увеличения легких (лихорадочных) форм и снижения летальности до 0,7%.

В третий период, когда против КВЭ были привиты 85% жителей, СМУ заболеваемости составил 8,1±0,3‰. Среди заболевших КВЭ доля привитых не превышала 15%, а инцидентность соответствовала 1,2±0,1‰, против 6,9±0,2‰ у непривитых. Коэффициент эффективности прививок составил 82,6%, а индекс эффективности 5,6. Степень детерминированной зависимости между заболеваемостью КВЭ и охватом прививками соответствовала 71,3% и только 28,9% приходилось на другие причины (экологические, социально-экономические и др.).

Наряду с проводимой кампанией по иммунизации жителей мегаполиса против КВЭ были активизированы и мероприятия по неспецифической профилактике в части индивидуальной и комплексной защиты.

При проведении акарицидных обработок мы руководствовались критериями, определяющими степень опасности территории: клещевленность, вирусофорность клещей, частота их нападения на людей, заболеваемость КВЭ и ИКБ среди пострадавших от нападения клещей на этих участках. Все это делало обработки более адресными и повышало их эффективность.

Из мероприятий индивидуальной защиты людей от нападения клещей была проведена апробация опытных партий специальных костюмов марки «Биостоп», обеспечивающих практически 100% защиты от нападения клещей, и оценка знаний жителей мегаполиса, в части применения химических средств защиты от клещей. Согласно проведенным нами исследованиям ни одно из направлений неспецифической профилактики в сочетании очаге КВЭ и ИКБ не позволяло в полной мере обеспечить контроль за Tick-векторными инфекциями на территории мегаполиса.

#### **Выводы:**

1. Эпидемический процесс Tick-векторных инфекций в условиях сочетанного очага имеет ряд общих характеристик и ряд особенностей, определяющих специфику эпидемического процесса каждой из них.

2. Степень активности природно-антропоургического очага определяется по показателям заклещевленности территории, вирусофорности клещей, заселенности грызунами, фактам нападения клещей в пределах селитебной территории и заболеваемости среди пострадавших от укусов клеща.

3. Вакцинопрофилактика КВЭ является действенным мероприятием контроля и позволяет на 71,1% снизить уровень заболеваемости, изменить структуру регистрируемых клинических форм за счет увеличения легких (лихорадочных) форм болезни. Коэффициент эффективности прививок составил 82,6%, а индекс эффективности 5,6.

4. Отсутствие средств специфической профилактики для других Tick-векторных инфекций и высокая активность очага на территории мегаполиса предполагает усиление мер неспецифической профилактики в части индивидуальной защиты людей от нападения клещей (химические и барьерные мероприятия), адресных акарицидных обработок. Степень влияния этих мероприятий на заболеваемость составляла не более 30%.

#### **Литература**

1. Злобин, В.И. Эпидемиологическая обстановка и проблемы борьбы с клещевым энцефалитом в Российской Федерации: этиология, эпидемиология и стратегия профилактики / В.И. Злобин // Terra Medica Nova. – 2010. – № 2. – С. 13–21.
2. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, в Пермском крае (этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение и профилактика) / Э.И. Коренберг [и др.] – Пермь, 2007. – С. 44.
3. Волкова, Л.И. Клещевой энцефалит на Среднем Урале: клинико-эпидемиологический анализ острых и хронических форм, пути оптимизации оказания специализированной медицинской помощи в эндемичном очаге: авторефер. дис. ... д-ра мед. наук / А.В. Валицкая. – Екатеринбург, 2009. – С. 3–4.
4. Онищенко, Г.Г. Об усовершенствовании эпидемиологического надзора и профилактических мероприятий в отношении клещевого вирусного энцефалита: Постановление № 53 [подписано 12.05.2011]. – С. 7.
5. Львов, Д.К. 70 лет открытию вируса клещевого энцефалита на Дальнем Востоке России. – *Вопр. вирусол.* – 2007. – № 5. – С. 4.
6. Романенко, В.В. Новая стратегия специфической профилактики клещевого энцефалита: опыт организации массовой вакцинации населения Свердловской области / В.В. Романенко, О.Г. Прохорова, В.И. Злобин // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* – 2005. – № 5. – С. 24–27.
7. Шашина, Н.И. Современные средства и методы дезинфекционной профилактики клещевых инфекций / Н.И. Шашина, О.М. Германт // *Журн. инфекц. патол.* – 2012. – Т. 19, № 3. – С. 63–64.

Поступила 23.07.2102

## **TICK-VECTOR INFECTION (TICK-BORNE ENCEPHALITIS AND IXODES TICK-BORNE BORRELIOSIS) IN MEGALOPOLIS. SPECIFIC AND NONSPECIFIC PROPHYLAXIS**

**Golubkova A.A.<sup>1</sup>, Dorogina Yu.V.<sup>2</sup>, Shashina N.I.<sup>3</sup>, Kornachev A.S.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>*Ural State Medical Academy of Ministry of Health of Russia, Yekaterinburg;*

<sup>2</sup>*Centre of Hygiene and Epidemiology in Sverdlovsk Region, Yekaterinburg;*

<sup>3</sup>*Research Institute of Disinfectology of Rosпотребнадзор, Moscow;*

<sup>4</sup>*Tyumen Research Institute of Regional Infectious Diseases, Tyumen, Russia*

Based on the comprehensive epidemiological, zoological and entomological investigations results obtained the ecological and epidemiological features of the combined of tick-borne

encephalitis virus (TBVE) and Ixodes tick-borne borreliosis focus formed in the megalopolis have been determined. The epidemiological effectiveness of specific TBVE prophylaxis under different immunization strategies have been estimated. Priorities in efforts of non-specific prophylaxis, taking into account behavioral risks in different age groups, the probability of their infection and the leading ways of spreading infection have been determined.

**Keywords:** tick-borne infections, megalopolis, prophylaxis.

## ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫЕ ИНФЕКЦИИ БЕЛОРУССКОГО ПОЛЕСЬЯ

Цвирко Л.С.<sup>1</sup>, Мишаева Н.П.<sup>2</sup>, Самойлова Т.И.<sup>2</sup>, Азарова И.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Полесский государственный университет, Пинск;

<sup>2</sup>РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

**Резюме.** Авторами представлены результаты исследования трансмиссивных природно-очаговых заболеваний человека на территории Белорусского Полесья. Из трансмиссивных инфекций вирусной природы в Полесье зарегистрированы клещевой и западно-нильский энцефалиты, из инфекций бактериальной природы — клещевой боррелиоз, туляремия, сибирская язва. Кроме того, в последние десятилетия с применением метода ПЦР выявлена зараженность иксодовых клещей анаплазмами (возбудители гранулоцитарного анаплазмоза человека), эрлихиями (возбудители моноцитарного эрлихиоза человека), бабезиями, риккетсиями.

**Ключевые слова:** Полесье, вирусные и бактериальные инфекции, иксодовые клещи.

**Введение.** Оценка прошлого и современного состояния природно-антропогенных экосистем Белорусского Полесья свидетельствует о его уникальности. Регион отличается разнообразным сочетанием растительных сообществ (от бореальных до неморальных сообществ европейского типа) и животного мира, характеризуется значительными площадями освоенных земель и высоким уровнем развития сельскохозяйственного производства и мелиоративного строительства. Несмотря на региональные существенные преобразования, здесь по-прежнему еще сохранились обширные болотные массивы в естественном состоянии и соответствующие благоприятные климатические условия.

С севера на юг Белорусское Полесье простирается почти на 200 км, занимая значительную часть Брестской и Гомельской обл., на юге граничит с Украинским Полесьем. Общая площадь Белорусского Полесья 6,1 млн га, что составляет 29% территории республики.

Полесье отличается своеобразием различных типов растительности (лесной, луговой, лугово-болотной, болотной). Здесь самая высокая лесистость территории (42,1%), доходящая в отдельных регионах до 68%. Леса преимущественно широколиственно-хвойные (в т.ч. сосновые, дубово-сосновые, широколиственно-еловые), произрастают в основном на водоразделах и надпойменных террасах, расположенных на высоте 100–150 м над уровнем моря. На ровных территориях встречаются дубравы, переходящие на плодородных участках почв в ясеневодубовые и ясеневые, а на низинных болотах — в черноольховые и пушистоберезовые леса.

В целом Полесье характеризуется близким к поверхности уровнем залегания грунтовых вод, в наиболее пониженной его части встречаются крупные массивы болот. Наличие большого количества болот и заболоченных земель, занимающих свыше 40% (в отдельных районах до 65% всей площади) — характерная особенность Полесской низменности.

Полесье, занимающее южную часть республики и расположенное в центральной части Европы, отличается также своеобразным климатом. Здесь самое продолжительное и самое теплое лето в Беларуси, наиболее короткая и более теплая зима. Климат теплый, неустойчиво-влажный, на юго-востоке приближающийся к лесостепному [1].

Лесистость территории Белорусского Полесья и теплый климат создают благоприятные условия для существования иксодовых клещей — переносчиков и хранителей

возбудителей инфекции, патогенных для человека. Из вирусных инфекций клещевой трансмиссии на территории Брестской и Гомельской областей зарегистрированы очаги клещевого энцефалита (КЭ) [2], а также доказана циркуляция вирусов Укуниеми, Тягиня, Инко, Батаи (сем. *Bunyaviridae*) и Западного Нила (сем. *Flaviviridae*) [3, 4]. Из бактериальных инфекций активно изучается Лайм-боррелиоз [5], выявлена новая нозоформа, связанная с иксодовыми клещами — гранулоцитарный анаплазмоз человека [6, 7], широко распространенный в сопредельных с Республикой Беларусь странах [8–10].

**Цель исследования:** провести ретроспективный анализ распространения вирусных и бактериальных инфекций человека, переносимых иксодовыми клещами, и исследовать с помощью современных технологий иксодовых клещей на носительство новых и малоизвестных для медицинской практики возбудителей инфекций, патогенных для человека.

**Материалы и методы.** В основу настоящей работы положены результаты изучения эпидемической ситуации по природно-очаговым зоонозам в Белорусском Полесье с середины прошлого столетия по сегодняшнее время. Основой разведки и изучения очагов инфекций служили эпидемиологические, паразитологические и зоологические исследования, при которых собирался материал для бактериологических, вирусологических и серологических анализов.

Для ретроспективного анализа заболеваемости людей в Белорусском Полесье было отобрано и проанализировано 1366 задокументированных случаев заболеваний людей трансмиссивными зоонозами. Всего добыто и исследовано 5337 экземпляров мелких млекопитающих 14 видов (4875 грызунов и 462 насекомоядных). Осмотрено на клещевленность 1918 домашних и 605 крупных диких животных. На зараженность эктопаразитами осмотрено 547 экземпляров птиц 26 видов и 214 гнезд. Всего с крупных и мелких млекопитающих, домашних животных и птиц собрано и определено 14 995 экземпляров иксодовых клещей. С людей снято 848 иксодовых клещей. Проведено 962 человека-часа учета численности активно нападающих иксодовых клещей разных фаз развития. При этом собрано и определено 7658 экземпляров (1513 имаго, 2826 нимф, 3319 личинок). Исследовано на зараженность боррелиями 1326 иксодовых клещей. Для исследования на зараженность туляремией собрано 8547 проб погадок птиц и экскрементов хищных млекопитающих.

Методом ПЦР исследовано 379 клещей наиболее многочисленных в республике видов (*Ixodes ricinus* L. и *Dermacentor reticulatus* Herm.). Клещей исследовали на наличие возбудителей клещевого энцефалита, клещевых боррелиозов и риккетсиозов, анаплазмоза, эрлихиоза, бабезиоза, туляремии, лихорадки Ку. Из 379 исследованных клещей 82 было отловлено в Брестской обл., 297 — в Гомельской. К *I. ricinus* принадлежали 314 клещей, *D. reticulatus* — 65 особей. Самки составляли 61,1%, самцы — 38,9%. Часть клещей исследованы индивидуально (205 особей), остальные — в пулах, по 3–5 клещей в пуле (174 клеща в 43 пулах). Кроме того, индивидуально исследовано 43 клеща *I. ricinus* разных фаз развития, присосавшихся к людям.

#### **Результаты и их обсуждение**

**1. Анализ заболеваемости людей трансмиссивными вирусными и бактериальными инфекциями в Белорусском Полесье.** В результате исследований на изучаемой территории установлена циркуляция возбудителей 5 трансмиссивных зоонозов вирусной и бактериальной природы, которые регистрировались в прошлом или активны в настоящее время [8]. Из зоонозов вирусной природы к трансмиссивным инфекциям относятся клещевой энцефалит — *Encephalitis acuta* и лихорадка Западного Нила (ЛЗН) — *West Nile febris*, из трансмиссивных бактериальных инфекций выявлены иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) — *Morbus Lyme*, туляремия — *Tularemie* и сибирская язва — *Anthrax pistula maligna*.

По данным официальной статистики случаи заболевания клещевым энцефалитом людей в Полесье регистрируются с 1953 г. по сегодняшний день. С 1993 г. отмечается ежегодный рост заболеваемости. В Гомельской обл. в период с 1953 по 2010 гг. отмечено

259 случаев КЭ. Все они имели место на территории 7 административных р-нов. Основная часть переболевших зарегистрирована в Светлогорском (33,6%), Житковичском (32,8%) и Речицком (31,7%) р-нах. Единичные случаи клещевого энцефалита регистрировались в разные годы в Ельском, Гомельском, Мозырском и Жлобинском районах. В Брестской обл. за последние десятилетия (1993–2009 гг.) зарегистрировано 504 случаев заболеваний, что составляет 50,9% от числа всех случаев клещевого энцефалита в республике. Заболеваемость людей КЭ с 2000 г. возросла более чем в 3,5 раза с 0,69 до 2,51 на 100 тыс. населения.

Возбудитель клещевого энцефалита является типичным вирусом клещевой трансмиссии. Основными хранителями и переносчиками возбудителей КЭ в Беларуси являются пастбищные виды иксодовых клещей *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus*. На изучаемой территории нами обнаружено 8 видов иксодовых клещей: *I. trianguliceps* Bir., *I. apronophorus* Sch., *I. ricinus* L., *I. lividus* Koch., *I. frontalis* Panz., *I. crenulatus* Koch., *I. arboricola* P.Sch. et Sch., *D. reticulatus* Hirm. Абсолютно доминирующим является *I. ricinus*, на его долю в Брестской области приходится 88,2%, в Гомельской — 89,0% от числа собранных клещей. *D. reticulatus* в сборах соответственно составляет 11,4 и 9,7%. В целом на долю пастбищных видов иксодовых клещей из числа собранных нами в регионе приходится 99,1%. В сборах с мышевидных грызунов на долю *I. ricinus* приходится 84,4% собранных личинок и нимф, *D. reticulatus* — 11,2%. В сборах с насекомоядных *I. ricinus* составляет 93,5%, *D. reticulatus* — 2,9%. Остальные виды в сборах с грызунов составляют 4,4%, с насекомоядных — 3,6%. Основными прокормителями имаго *I. ricinus* являются: из домашних животных — крупный рогатый скот, из диких копытных — лось и косуля. В прокормлении имаго *D. reticulatus* кроме указанных копытных существенную роль играет дикий кабан. Основным резервуаром возбудителей вирусных и бактериальных инфекций среди мышевидных грызунов и насекомоядных в природных очагах зоонозов является рыжая полевка (28,5 попаданий на 100 л/с). В лесах рыжая полевка прокармливает 69% преимагинальных фаз развития *I. ricinus*, из них 48% личинок и 21,6% нимф (индексы обилия соответственно 2,15 и 0,18); желтогорлая мышь — 18,3% личинок и 23,8% нимф, лесная мышь — 18,9% личинок и 16,6% нимф. В процессе массового вирусологического исследования иксодовых клещей содержащие вирус КЭ клещи обнаружены в Житковичском очаге, относящемся к Белорусскому Полесью.

Временем установления циркуляции в республике нового патогенного агента — вируса лихорадки Западного Нила считаются 1985–1986 гг. Первые штаммы вируса ЛЗН выделены из птиц, добытых в Петриковском и Житковичском р-нах Гомельской обл. К 1995 г. было зарегистрировано уже 9 серологически подтвержденных заболеваний людей ЛЗН. Для выявления антигена вируса Западного Нила в возможных хранителях и переносчиках — иксодовых клещах специалистами БелНИИЭМ в 1989–92 гг. проведено исследование в ИФА клещей, собранных на территории Гомельской и Брестской обл., в районах, где выделялся вирус от теплокровных и диагностировались больные среди жителей. В Брестской области при групповых исследованиях антиген вируса ЛЗН чаще обнаруживался в клещах *I. ricinus*, в Гомельской обл. — *D. reticulatus*. При индивидуальном исследовании клещей (слюнные железы) антиген в очагах заболевания Гомельской обл. встречался у 2,3–3,8% исследованных клещей, в целом по области, порядка 1%.

В это же время в эксперименте установлена способность широко распространенных в Беларуси клещей *I. ricinus* воспринимать вирус от инфицированных животных, предавать его в процессе метаморфоза трансфазово и трансвариально. На основании этих данных, зоолого-паразитологических и вирусологических материалов, предложена схема циркуляции вируса лихорадки Западного Нила в природных очагах, включающая иксодовых клещей, как элемент жизненного цикла вируса.

Сравнительно новым для Белорусского Полесья является трансмиссивное заболевание, связанное с иксодовыми клещами — иксодовый клещевой боррелиоз. Из голодных клещей *I. ricinus* в 1996 г. в Беларуси выделен возбудитель клещевого боррелиоза.

Пациенты с ИКБ в Полесье регистрируются с 1993 г. За первые 2 года наблюдений (1996–1997 гг.) в регионе зарегистрировано уже 98 случаев этого заболевания, при этом заболеваемость продолжает быстро расти, достигнув в 2003 г. — 171, а в 2008 — 253 случая, что составило 40,0% от всех заболевших в республике. С 1996 по 2008 гг. заболеваемость Лайм-боррелиозом в Гомельской обл. возросла в 5,6 раза с 1,45 до 8,74 на 100 тыс. населения, в Брестской — в 6,7 раза с 1,11 до 8,97 на 100 тыс. населения. Резкий подъем заболеваемости (более 300 случаев в год) регистрируется с 2006 г. Количество заболевших достигло и превысило аналогичные показатели по клещевому энцефалиту.

По нашим данным (Житковичский, Петриковский, Лельчицкий р-ны) инфицированные возбудителем ИКБ клещи *I. ricinus* составляют соответственно 13,3, 11,1 и 4,5% от числа исследованных. Эти показатели несколько ниже, чем в отдельных районах Брестской области (Свислочский, Каменецкий и Пружанский), где инфицированность клещей боррелиями составляет соответственно 15,0%; 14,3% и 26,7%.

В прошлом на исследуемой территории регистрировались вспышки особо опасного заболевания — туляремии. В Белорусском Полесье заболевания туляремией людей зарегистрированы в 31 (из 37) административном районе. В годы максимальной заболеваемости количество заболевших туляремией в регионе составляло 81,8% всей заболеваемости в республике. В Гомельской обл. до периода 1964 г. вспышки туляремии охватили 49 населенных пунктов. Больше всего заболеваний отмечено в Петриковском р-не — 253 случая. По годам самой крупной (250 чел.) была вспышка 1963 г. (в одном Петриковском р-не 54 заболевших). Всего же в области переболело туляремией 1254 человека. Резкое снижение заболеваемости отмечается после 1963 г. Лишь в 1965 и 1966 гг. здесь было по одному случаю заболеваний все в том же Петриковском р-не. С 1970 г. заболевания не регистрировались. В Брестской обл. переболело туляремией 697 человека, из которых в Лунинецком р-не — 33,9%. Последний случай заболевания туляремией людей здесь зарегистрирован в 1994 г.

В период 1964–1975 гг. из искодовых клещей, собранных в Гомельской обл. в 1272 групповых биопробах выделено 42 штамма *F. tularensis*, из воды открытых водоемов — 39 штаммов, что свидетельствовало о продолжении эпизоотического процесса в природных очагах. В 1964 г. количество положительных биопроб из клещей *I. ricinus*, собранных с крупного рогатого скота составляло 3,7%. Дальнейший уровень бактерионосительства у клещей неравномерно колебался в пределах от полного отсутствия до 2,8% в 1970 г. Но с 1972 г. туляремийный микроб в клещах не обнаруживался и не обнаруживается по сегодняшний день. В Брестской обл. возбудитель туляремии из искодовых клещей выделялся до 1978 г. Всего за 24 года выделено 383 штамма, из которых 247 — в Пинском р-не. На территории региона до настоящего времени сохраняются условия существования природных очагов этого заболевания. Циркуляция туляремийного микроба подтверждается положительными результатами серологических исследований по выявлению туляремийного антигена в мышевидных грызунах, погадках птиц и помете хищных млекопитающих. В Гомельской обл. среднегодовое количество антигенсодержащих погадок колеблется от 1,2 до 5,0% (в среднем 3,1%). Наибольшее количество антигенсодержащих погадок (12,7%) обнаружено в 1987 г., через 20 лет после регистрации последнего случая заболевания людей туляремией в регионе. Тем не менее, в клещах *I. ricinus* методом ПЦР установлено носительство *Francusella tularensis* — возбудителя туляремии у людей.

К ранее широко распространенным в регионе, но на сегодняшний день практически не проявляющимся относится сибирская язва. Всего, начиная с 1946 г. в Беларуси зарегистрировано 236 заболеваний людей сибирской язвой, из которых 61 (25,8%) — на территории Гомельской обл. В различные годы заболевания отмечены в 16 из 21 р-не. В Брестской обл. было всего 14 случаев заболеваний (5,9% от числа заболеваний по республике).

В настоящее время туляремия и сибирская язва в районах расположения Белорусского Полесья не регистрируются. Но в случае изменения эпизоотической ситуации или заноса

с эндемичных территорий могут иметь место заболевания человека, домашних и диких животных, что требует постоянного мониторинга инфекций.

Таким образом, в конце XIX — начале XX вв. на территории Белорусского Полесья было выявлено 5 трансмиссивных инфекций, переносимых иксодовыми клещами. Из них до сих пор интенсивно изучаются КЭ и ЛБ, остальные инфекции не регистрируются.

**2. Выявление новых и малоизвестных инфекций, переносимых иксодовыми клещами и патогенных для человека и животных.** Применение метода ПЦР позволило выявить в исследованных клещах Белорусского Полесья нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК) к 9 патогенам, относящихся к разным систематическим группам (вирус клещевого энцефалита, боррелии, риккетсии, анаплазмы, бабезии). Чаще всего в клещах выявлялись риккетсии (24,8%), реже боррелии (9,31%), анаплазмы (4,1%), вирус клещевого энцефалита (3,5%) и бабезии (1,0%). Кроме того, в клещах выявлены новые и малоизвестные для здравоохранения республики патогенные агенты, переносимые клещами — возбудитель лихорадки Ку (0,99%), туляремии (0,79%), бартонеллеза (0,79%), эрлихиоза человека (0,5%). Указанные инфекции, патогенные для человека, в медицинской практике Республики Беларусь не диагностируются, хотя в сопредельных странах они зарегистрированы и интенсивно изучаются [9–11].

Установлено, что наиболее часто носителями инфекционных агентов являются клещи *I. ricinus*, в которых обнаружены все 9 групп возбудителей. Среди клещей *D. reticulatus* выявлены особи, зараженные боррелиями (3%), бартонеллами (0,5%) и риккетсиями (43,8%). Заслуживает внимания тот факт, что носительство риккетсий клещами *D. reticulatus* (43,8%) было в 3,9 раза выше, чем у клещей *I. ricinus* (11,2%).

Индивидуальное исследование на боррелиоз клещей *I. ricinus* (5177 экз.) и *D. reticulatus* (144 экз.), снятых с людей, показало, что зараженность боррелиями клещей *I. ricinus* (17,6%) была в два раза выше, чем *D. reticulatus* (8,3%). Тем не менее, этот факт заслуживает пристального внимания, так как в присосавшихся к людям клещах *D. reticulatus* боррелии были выявлены не только в самках, но и в самцах и нимфах эктопаразитов, при этом зараженность этого вида в отдельные годы достигала до 13,5%, что считается очень высоким показателем.

**Выводы.** Как видно из результатов проведенных исследований, иксодовые клещи в Республике Беларусь являются переносчиками как минимум 9 возбудителей инфекций человека и животных, при этом среди клещей выявлены особи, содержащие одновременно по 2–3 возбудителя, чаще всего боррелии с анаплазмами или риккетсиями, реже с вирусом КЭ. При присасывании такого «мультизараженного» клеща у человека может развиваться микст-инфекция с продолжительным лихорадочным периодом и тяжелым течением, что подтверждается серологическими исследованиями и клиническими наблюдениями [5, 9].

Исследования выполнены при финансовой поддержке ФФИ РБ (проект 612-091).

#### Литература

1. Ландшафты Белоруссии / под ред. Г. И. Марцинкевич, Н. К. Клицуновой. – Минск: Университетское, 1989. – 115 с.
2. Вотяков, В.И. Западный клещевой энцефалит / В.И. Вотяков, В.И. Злобин, Н.П. Мишаева. – Новосибирск: Наука, 2002. – 437 с.
3. Зараженность иксодовых клещей патогенными для человека возбудителями инфекций в Минске / Н.П. Мишаева [и др.] // Здравоохранение. – 2011. – № 1. – С. 26–29.
4. Изучение роли арбовирусов семейства Bunyaviridae в этиологии сезонных недифференцированных лихорадок в Республике Беларусь / Т.И.Самойлова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. – Минск, 2010. – Вып. 3. – С. 320–325.
5. Клинические варианты микст-инфекций (КЭ+ЛБ) / С.О. Вельгин [и др.] // Журн. эпидемиол. и инфекц. болезней. – 2007. – № 3. – С. 38–41.
6. Мишаева, Н.П. Гранулоцитарный анаплазмоз человека в Республике Беларусь / Н.П. Мишаева, И.И. Протас, В.В. Щерба // Здравоохранение. – 2010. – № 11. – С. 19–21.
7. Новые арбовирусные инфекции, выявленные в Беларуси: методические рекомендации / Т.И. Самойлова [и др.]. – Минск, 1998. – 23 с.
8. Цвирко, Л.С. Особо охраняемые природные территории Белорусского Полесья: проблемы эпидемической безопасности. – Мозырь: УО МГПУ, 2006. – 234 с.

9. Smetanova, K. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s. l. in ticks, and wild-living animals in western and middle Slovakia / K. Smetanova, K. Schwarzova, E. Kocianova // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2006. – Vol. 1078. – P. 312–315.

10. Spitalska, E. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected in Slovakia and Hungary / E. Spitalska, E. Kocianova // Eur. J. Epidemiol. – 2003. – Vol. 18. – P. 263–266.

11. Radzijeuskaja, J. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia divergens* in *Ixodes ricinus* ticks from Lithuania and Norway / J. Radzijeuskaja, A. Paulauskas, O. Rosef // Int. J. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 298. – P. 218–221.

Поступила 13.09.2102

## NATURAL FOCAL HUMAN INFECTIONS IN BELARUS POLESIE

**Tsvirko L.S.<sup>1</sup>, Mishaeva N.P.<sup>2</sup>, Azarova I.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Poleski State University, Pinsk;*

<sup>2</sup>*Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus*

Results obtained on study of natural foci of human diseases in Belarus Polesie are presented. The natural foci of viral and bacterial infections such as tick-borne encephalitis, West Nile fever, Lyme borreliosis, tularemia and anthrax was known in the late of 19th and early 20th centuries. The authors have established infestation of ticks caught in Brest and Gomel Polesie with causative agents of human: *Anaplasma*, *Rickettsia*, Ehrlich, *Babesia*, etc. by PCR method.

**Keywords:** Belarus Polesie, viral and bacterial infections, natural foci, ticks.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ БИОГЕЛЬМИНТОЗАМИ РЫБ (ОПИСТОРХОЗОМ И ДИФИЛЛОБОТРИОЗАМИ) СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**Корзан А.И.**

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

**Резюме.** Эпидемические очаги описторхоза на территории области сосредоточены в бассейне реки Припять и ее притоков, соединяющих их каналов; на долю бассейна р. Щара приходится незначительное количество. В бассейне р. Западный Буг — эпидемические очаги данной инвазии не установлены. Фактор риска — речная рыба местных пород, в отдельных случаях озерная, преимущественно в вяленом виде или недостаточно термически обработанная. В 50% случаев контингентами риска являются лица, занимающиеся рыбной ловлей на непрофессиональной основе и профессиональные рыбаки. Случаи заболеваний дифиллоботриозами среди населения на территории области связаны с завозом данной инвазии из-за пределов Республики Беларусь.

**Ключевые слова:** биогельминтозы, очаги, пути и факторы, мероприятия.

**Введение.** Описторхоз — трематодоз, широко распространенный среди людей и протекающий с поражением желчевыделительной системы. Возбудитель трематода *Opisthorchis felinus* (двуустка сибирская или кошачья) паразитирует в желчных ходах, желчном пузыре и протоках поджелудочной железы человека и ряда плотоядных млекопитающих (кошка, собака, свинья домашняя и др.). Яйца паразита вместе с желчью выделяются в кишечник и с фекалиями попадают в окружающую среду. Дальнейшее их развитие возможно только в воде. Источником заражения для человека служит термически не обработанная или плохо просоленная рыба, пораженная метацеркариями [1].

Природные очаги описторхоза на территории Брестской области были установлены В.Я. Линником и приурочены к бассейну р. Припять. Отмечено, что в данном бассейне широко распространена трематода *Opisthorchis felinus* [2].

Исследованиями, проведенными в 80-х годах В.Я. Линником с сотрудниками и Л.В. Скриповой, установлены первые промежуточные хозяева трематод — брюхоногие моллюски рода *Bithynia* [2, 3].

По данным белорусских гельминтологов, вторыми промежуточными хозяевами были карповые рыбы 10 видов. Так, по среднему течению р. Припять и ее притоков на территории области (Лунинецкий, Столинский, Пинский р-ы) зараженность метацеркариями описторхиса дополнительных хозяев паразита составила: язей — 25,1–46,6%, лещей — 5,2%, плотвы — 3,6–12,5%, уклей — 3,7–4,7% [4].

Эпидемиология заболеваний биогельминтозами рыб среди населения на территории области ранее нами не изучалась в связи с недостаточным количеством наблюдений — в среднем регистрировалось 1–3 случая заболеваний в год.

Невысокий уровень знаний клинико-эпидемиологических особенностей описторхоза среди специалистов различного профиля медицинских учреждений не способствовал более полному выявлению и санации инвазированных лиц и не обеспечивал планомерное подавление природных очагов данного вида биогельминтоза, который также представляет социально-гигиеническое значение, требуя решения вопросов благоустройства населенных мест, охраны водоемов от фекального загрязнения, повышения общей и санитарной культуры населения.

Усовершенствование системы эпид. надзора за биогельминтозами рыб на территории области, в основе которого лежит изучение закономерностей развития эпидемического процесса этих инвазий в различных ландшафтных зонах, является основной целью данного исследования и будет способствовать повышению эффективности профилактических и противоэпидемических мероприятий.

**Материалы и методы.** Материалом для эпидемиологического анализа заболеваемости описторхозом и дифиллоботриозом, а также их географического распространения явились данные о случаях этой инвазии, зарегистрированные на территории Брестской области за период с 1960 по 2011 гг. Эпидемиологический материал для исследования включал 81 случай описторхоза среди населения и 99 случаев заболеваний дифиллоботриозами.

О пораженности населения описторхозом судили по результатам двукратного серологического скрининга лиц с заболеваниями желчевыделительной системы, а также лиц, занимающихся любительской рыбалкой и ловлей рыбы на профессиональной основе. Всего обследовано 505 человек. Лабораторные исследования проводилась на базе паразитологической лаборатории ГУ «Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» методом ИФА — определение IgG к антигенам описторхисов.

Паразитологическая диагностика по выявлению в фекалиях и дуоденальном содержимом яиц описторхиса проводилась на базах клинико-диагностических лабораторий организаций здравоохранения области с обязательным подтверждением в паразитологической лаборатории областного центра гигиены и эпидемиологии; аналогично проводилась диагностика дифиллоботриоза — определялись находки яиц в фекалиях, изучались фрагменты гельминта.

В работе использованы методы эпидемиологической диагностики: описательно-оценочные, аналитические, статистические и эпидемиолого-картографический метод.

**Результаты и их обсуждение.** Проведенный анализ накопленных данных по случаям описторхоза на территории области в период с 1961 по 2011 гг. показал, что из 81 случая 43 были местными (53,1%), 32 привозными (39,5%), в 6 место заражения было не установлено (7,4%). Все 43 местных эпидемических очага были единичными.

Ареал заболеваний описторхозом среди населения не совпадал с ареалом распространения возбудителя этой паразитарной инвазии и был шире в 2,1 раза, что требует дальнейшего изучения природных очагов данного вида биогельминтоза на территории области.

По результатам исследования можно судить, что наиболее интенсивным природным и эпидемическим очагом описторхоза на территории области является бассейн р. Припять (центральная и юго-восточная часть области), на долю которого пришлось 93% случаев инвазии: в Лунинецком районе (рыба из р. Припять в районе дд. Лахва, Ситница, Синкевичи, Намокрово, Дребск) — 27,9%; Столинском (р. Горынь в р-не дд. Коробье, Стахово, Речица, Рубель) — 30,2%; Ивановском (д. Мотоль — р. Ясельда, д. Тышковичи — озеро, д. Осовцы — р. Ясельда, д. Переруб — Днепро-Бугский канал) — 13,9%; Пинском (дд. Кочановичи, Городище, Лемешевичи — р. Ясельда) — 9,3%; Дрогичинском (д. Хомск — водоем «Кажинь» и р. Ясельда) — 7,0%; Березовском районах (оз. Споровское) — 4,7%. Данные территории можно обозначить как эндемичные.

На долю бассейна р. Щара (северо-восточная часть области — в Ивацевичском р-не: д. Озерцо — р. Гривда и водоемы Телеханской зоны) пришлось 4,7% случаев заболеваний.

Не установлено место заражения заболевших в 2,3% случаев.

Пока не подтверждается активность природного очага описторхоза в бассейне р. Западный Буг (юго-западная часть области), эпидемические очаги этой инвазии не установлены на данной территории [3].

В целях выявления контингентов повышенного риска заболевания описторхозом в 2005 г. нами проведен эпидемиологический скрининг лиц с заболеваниями желчевыделительной системы, проживающих в зоне влияния рек и озер, употребляющих вяленую рыбу домашнего приготовления местных пород, а также среди лиц, занимающихся любительской рыбалкой и ловлей рыбы на профессиональной основе. Обследовано 375 человек, выявлено 3 серопозитивных лица (0,8%) — IgG: у 1 человека были установлены клинические симптомами заболевания, у 2-х симптомов заболевания не было. В 2011 г. также был проведен эпидемиологический скрининг — обследовано 130 человек, выявлено 4 серопозитивных лица (3,3%); IgM определены у 2-х человек, IgG у 2-х, из которых двое состояли на диспансерном учете с заболеваниями печени и желчевыделительной системы (в одном случае была произведена холецистэктомия).

В одном случае диагноз «описторхоз» установлен у состоявшего на диспансерном учете с заболеванием печени жителя г. Бреста 42 лет, употреблявшего рыбу местных пород в сыром и вяленом виде при посещении г. Тюмень 19 лет назад. При лабораторном исследовании кала заболевшего (на базе паразитологической лаборатории областного центра гигиены и эпидемиологии) в препаратах выявлено одно яйцо *Opisthorchis felineus*, в методе ИФА результат был отрицательным при наличии клинических симптомов заболевания и длительности его течения.

Из данных эпидемиологического анамнеза установлено, что случаи заболеваний регистрировались в возрасте от 11 до 57 лет, преимущественно, в возрастной группе 40–49 лет. Среди заболевших женщины составили 59,0%, мужчины — 41%. В социально-профессиональном составе заболевших доминировали группы «служащие», занимающиеся рыбной ловлей на непрофессиональной основе (29,4%) и профессиональные рыбаки (23,3%). Заражение местных жителей происходило в основном при употреблении вяленой рыбы местных пород домашнего приготовления, в отдельных случаях плохо прожаренной рыбы. В двух случаях имело место употребление вяленой рыбы, купленной на рынке. и рыбы, приобретенной у неизвестных частных лиц.

В историях болезни пациентов с описторхозом патология печени и желчевыделительной системы отмечена в 71% случаев, не имели клинических симптомов 29% заболевших при наличии яиц гельминта в кале (от 1 до 8), положительном ИФА (от 1:100 до 1:800) и незначительной эозинофилии крови (от 2 до 6).

Анализ завозных случаев описторхоза с целью установления факторов риска заболевания показал: за пределами Республики Беларусь в Российской Федерации произошло заражение в 30 случаях (работа по найму и студенческих строительных отрядах и др.), что

было связано с приобретением гражданами Республики Беларусь рыбы на рынках у неизвестных лиц на стоянках поездов, в ларьках. Это требует разъяснительной работы среди различных контингентов, направляемых на работу в эндемичные по данной инвазии территории. В 8 случаях данные о конкретных местах заражения не удалось установить по причине того, что указать место приобретения рыбы могли не все — во время кратких остановок поезда в пути следования, у случайных людей во время переездов на нефтепромыслы и др. Все заболевшие в основном употребляли строганину, вяленую рыбу (язь, лещ, щуку, плотву, чебак и др.). Территориями повышенного риска заражения для наших граждан в Российской Федерации были Тюменская область — 51,7% (гг. Нижневартовск, Тюмень, Сургут, Нагань, пос. Игрим, г. Ханты-Мансийск), Ямало-Ненецкий автономный округ — 13,8% (гг. Солохор, Уренгой), Республика Коми — 3,4%, Ростовская область (г. Таганрог) — 3,4%.

На Украине произошло заражение в Ровенской области 3,4% случаев (д. Нобель), в Казахстане — в 3,4% (г. Астана).

Дифиллоботриозы — группа кишечных гельминтозов с хроническим течением и преимущественным поражением тонкой кишки, нарушением функций верхнего отдела пищеварительного тракта, при тяжелом течении — анемией пернициозного типа. Из 10 видов широкий лентец (*Diphyllobothrium latum*) самый распространенный вид. Возбудитель включает окончательных (рыбоядные животные и человек), ряд промежуточных хозяев (веслоногие рачки и рыбы) и свободноживущих стадий паразита (яйцо гельминта и выходящий из него в воде корацидий) [1].

По данным официальной статистики, начиная с 50-х гг. прошлого столетия по настоящее время, на территории области не установлены местные эпидемические очаги дифиллоботриоза, хотя по данным В.П. Пашука (1968) в других регионах республики допускалась вероятность их существования.

Анализ случаев дифиллоботриоза, выявленных в организациях здравоохранения области в период с 1960 по 2009 гг. показал, что данное заболевание диагностировано в 99 случаях на 18 административных территориях из 19 (за исключением Жабинковского района): г. Брест — 39 (40,2%), Кобринских р-н — 8 (8,3%), Ивановский — 6 (6,2%), гг. Барановичи, Пинск, Ивацевичском и Пружанском районах — по 5 (5,2%), Каменецком, Ляховичском и Барановичском районах — по 4 (4,1%), на остальных территориях — от 1 до 3 случаев.

Среди 99 случаев заболеваний на вид *Diphyllobothrium latum* пришлось 98 случаев (99%), на *Diphyllobothrium dendriticum* — 1 случай (1%). В данном случае заболевшим был ребенок 4 лет, ранее проживавший в районе озера Байкал, которому родители давали сосать вяленую рыбу местных пород.

Все случаи дифиллоботриозов были завозные — из различных регионов Российской Федерации. Основными факторами передачи в последние 10 лет были: употребление речной рыбы в виде строганины и вяленом виде в Красноярском и Краснодарском краях, Якутии, Тюменской области, а также икры щуки в Астраханской и Ленинградской областях. Установлен факт заражения также при употреблении лососевой икры в «негерметичной упаковке», купленной на рынке в г. Бресте у не установленного лица.

В одном случае возникло предположение о местном заражении гражданина г. Бреста при употреблении свежепосоленной икры щуки, выловленной из рек Лесная (или Муховец), а также употреблении им вяленой щуки и окуня из данных рек. Не исключено, что, возможно, имеет место формирование местного очага данной инвазии в южном регионе области в результате ее завоза из-за пределов республики нашими гражданами или иными лицами.

**Выводы.** Результаты исследования позволяют обозначить бассейн р. Припять и ее притоки как эндемичный по описторхозу регион области. Имеются различия в распространении природных и эпидемических очагов данной инвазии на территории области.

В бассейне р. Западный Буг эпидемические очаги описторхоза не установлены.

Улучшение качества клинической диагностики данного заболевания будет способствовать более полному выявлению и санации инвазированных лиц, обеспечит целенаправленное проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий по территориям повышенного риска заражения и среди контингентов риска, в т.ч. среди лиц выезжающего на сезонные работы в эндемичные по данной инвазии регионы Российской Федерации.

Случаи заболеваний дифиллоботриозами среди населения в основном завозные, однако, не исключается формирование местных природных и эпидемических очагов данного гельминтоза на территории области.

#### **Литература**

1. Клиническая паразитология: руководство / А.Я. Лысенко [и др.]; под общ. ред. А.Я. Лысенко. – Женева: ВОЗ, 2002. – С. 485–492.
2. Линник, В.Я. Гельминтозоонозы в Белоруссии, передающиеся от рыб (эпизоотология, патогенез, профилактика): авторефер. дис. ... д-ра вет. наук / В.Я. Линник. – М., 1984. – 37 с.
3. Скрипова, Л.В. Эколого-эпидемиологическая характеристика описторхоза в Белорусском Полесье: авторефер. дис. ... канд. биол. наук / Л.В. Скрипова. – М., 1990. – 22 с.
4. Шималов, В.В. Трематоды описторхиды (Trematoda, Opisthorchiidae) Беларуси, паразитирующие у человека / В.В. Шималов // Современные аспекты патогенеза, клиники, диагностики, лечения и профилактики протозоозов, гельминтозов и арахноэнтомозов человека, животных и растений: сб. науч. тр. VII Междунар. науч.-практ. конф. – Витебск: ВГМУ, 2010. – С. 320.

Поступила 20.08.2012

## **RESULTS OF EPIDEMIOLOGY STUDYING OF FISH BIOHELMINTHIASES (OPISTHORCHIASIS AND DIPHYLLOBOTHRIASIS) IN POPULATION IN BREST REGION OF BELARUS**

**Korzan A.I.**

*Brest Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Brest, Belarus*

Epidemic foci of opisthorchiasis in the Brest region of the Republic of Belarus are concentrated in the basin of the Pripyat River, its tributaries, and their connecting channels. The small number of the foci are shared to the basin of the Schara River. In the basin of the Western Bug River the epidemic foci of the invasion is not revealed. Risk factor is river fish of native species, in some cases, lake fish, mostly in dried form or not heat-treated. In 50,0% of cases contingent risk are persons engaged in fishing on the basis of non-professional and professional fishermen. Disease cases of diphyllbothriasis among population in the region associated with the importation of the invasion from outside the Republic of Belarus.

**Keywords:** biohelminthiases, natural foci, ways and factors, prophylactic measures.

РАЗРАБОТКА СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ГРИППА А ПОДТИПА H5N1  
МЕТОДОМ ПЦР И ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Аканина Д.С., Гребенникова Т.В., Плетенева Т.В.

*Кафедра фармацевтической и токсикологической химии  
Российского университета дружбы народов, Москва, Россия*

**Резюме.** В статье описывается разработка двух тест-систем для обнаружения РНК вируса гриппа А подтипа H5N1: тест-системы для диагностики вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР и ПЦР в реальном времени. В ходе работы подобраны олигонуклеотиды, специфичные консервативным участкам гена гемагглютинаина и нейраминидазы. Эффективность полученных тест-систем проверена на референтных штаммах вируса гриппа разных типов и подтипов, выделенных от человека, животных и птиц.

**Ключевые слова:** Грипп А, H5N1, ПЦР, диагностика.

**Введение.** Грипп А является опасным, высококонтагиозным заболеванием, распространенным по всему миру и вызывающим заболевание у человека, многих видов млекопитающих и птиц [1]. Периодически в человеческую популяцию вносятся совершенно новые антигенные подтипы вируса гриппа, что приводит к крупномасштабным глобальным вспышкам заболевания с высокой смертностью. Долгое время считалось, что ограниченный круг переносчиков (природных очагов инфекции) вируса птичьего гриппа исключает прямую передачу вируса птичьего гриппа человеку, и что для появления пандемического штамма требуется генетическая рекомбинация между птичьим и человеческим штаммами. Тем не менее, в последние годы все чаще сообщалось о прямой передаче вируса птичьего гриппа от птицы к человеку, что привело к недавней вспышке вируса гриппа А подтипа H5N1 среди домашней птицы в ряде азиатских стран с ассоциированным инфицированием человека [2]. Исследования ученых показали, что для передачи вируса гриппа А подтипа H5N1 воздушно-капельным путем от человека к человеку достаточно всего пяти аминокислотных замен в геноме вируса. В настоящее время существует серьезная угроза пандемии вируса гриппа А подтипа H5N1 [3]. Своевременная диагностика является одним из основных средств мониторинга и предупреждения распространения заболевания.

**Цель исследования:** разработка тест-системы для обнаружения вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР и ПЦР в реальном времени.

**Материалы и методы** исследования. Выделение РНК из культуральных и полевых образцов. Выделение РНК из культуры клеток и полевых образцов проводили с использованием неорганического сорбента (Silica). К 300 мкл образца добавляли 600 мкл раствора лизирующего буфера с гуанидинтиоционатом и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин при равномерном перемешивании на шейкере. Затем центрифугировали 5 мин, 13000 об/мин, переносили надосадочную жидкость (если формировался осадок) в чистые пробирки и добавляли 40 мкл сорбента, тщательно перемешивали и снова инкубировали 10 мин при комнатной температуре на шейкере. Центрифугировали 30 с, 13000 об/мин, удаляли надосадок. Затем промывали осадок сорбента с РНК 2 раза 200 мкл промывочного буфера, и 2 раза 70% этанолом. Осадок подсушивали в течение 10 мин при 56 °С и элюировали РНК с сорбента 30–40 мкл воды, обработанной диэтилпиракарбонатом.

Проведение обратной транскрипции и ПЦР. Реакционная смесь содержала 5 мкл РНК, 4 мкл 10-кратного ТАЕ-буфера с 0,25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,25 мМ каждого dNTP, по 10 pmol каждого праймера, 0,5 мкл IRNase, 0,25 ед. Taq-полимеразы, 50 ед. MMLV-ревертазы. Объем доводили водой до 25 мкл.

Реакцию обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени проводили в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5–7 мкл РНК, 10 pmol каждого праймера, 10 pmol зонда, 12,5 мкл смеси “TaqMan One-Step Rt-PCR Master Mix Reagents” (Applied Biosystems).

Праймеры и зонды. Набор специфических олигонуклеотидов для обнаружения мРНК гена гемагглютинина (НА) и мРНК гена нейраминидазы (NA) вируса гриппа А подтипа H5N1 был разработан на основе консенсусной последовательности геномов референтных штаммов, представленных в Генбанке. Для обнаружения мРНК гена НА вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР использовали праймеры F-H5 ACAAGGTCCGACTACAGCTT и R-H5 TGATTCCAATTTACTCCAC, а для обнаружения гена NA вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР использовали праймеры F-N1 CAGAACAATGAGTTGTCCT и R-N1 TCTCAGTATGTTGTCCTCCAA. Температурные условия проведения реакции были таковы: 40 мин при 50 °С и 3 мин при 95 °С для реакции обратной транскрипции, 20 с при 95 °С, 20 с при 57 °С и 20 с при 72 °С в течение 40 циклов, затем 5 мин при 72 °С.

Для обнаружения мРНК гена НА вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР в реальном времени использовали праймеры H-F CACCATCGGAGAATGTCCCAAA, H-R TACCCATACCAACCGTCTACCA и зонд H-Probe AGGACTGTTTGGAGCCATAGCAGGTT, а для обнаружения мРНК гена NA вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР в реальном времени использовали праймеры N-F GGTGAGTCTGTTGCTTGGTC, N-R GCAAGAGCCATTTACACATGCAC и зонд N-Probe TTGCCATGATGGCACCAGTTGGTT. Температурные условия проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени были следующими: 40 минут при 50 °С, затем 3 мин при 95 °С для обратной транскрипции и 20 с при 95 °С, 20 с при 57 °С и 20 с при 72 °С в течение 40 циклов.

Анализ результатов ПЦР проводится методом электрофореза в агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

Анализ результатов ПЦР в реальном времени. Результаты ПЦР в реальном времени автоматически выводились на экран монитора компьютера в виде графика зависимости интенсивности флуоресценции от порогового цикла. Базовую линию выбирали как среднее значение флуоресценции в широком диапазоне циклов до появления репортерной флуоресценции (т.е. до начала детекции экспоненциальной фазы). Уровень пороговой флуоресценции определяли вручную. При этом за пороговый уровень выбирали минимальный уровень флуоресценции, который во всех проведенных с данной парой праймеров реакциях соответствует началу экспоненциальной фазы.

Эффективность и специфичность разработанных тест-систем была проверена на референтных штаммах вируса гриппа различных типов и подтипов (табл.)

Таблица 1 – Результаты определения вируса гриппа А подтипа H5N1 в эпидемических штаммах вируса гриппа, выделенных от человека и животных

№	Тип вируса	Название штамма	Реакция обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени		Реакция обратной транскрипции и ПЦР	
			Наличие РНК вируса гриппа подтипа H5	Наличие РНК вируса гриппа подтипа N1	Наличие РНК вируса гриппа подтипа H5	Наличие РНК вируса гриппа подтипа N1
1	А(Н3N2)	А/Москва/54/89	-	-	-	-
2		А/Сичуань/2/87	-	-	-	-
3		А/СССР/382/86	-	-	-	-
4		А/Владимир/137/03	-	-	-	-
5		А/Владимир/34/05	-	-	-	-
6		А/Томск/26/04	-	-	-	-
7		А/Москва/11/03	-	-	-	-
8		А/Филиппины/2/82	-	-	-	-

9	A(H1N1)	A/СССР/90/77	-	+	-	+
10		A/Пекин/262/95	-	+	-	+
11		A/Новая Каледония/20/99	-	+	-	+
12		A/Хабаровск/51/05	-	+	-	+
13		A/Ставрополь/56/05	-	+	-	+
14	B	B/Виктория/2/87	-	-	-	-
15		B/Москва/1/04	-	-	-	-
16	A(H1N1)	A/WSN/33	-	+	-	+
17	A(H2N3)	A/Шилохвость/ Приморье/695/76	-	-	-	-
18	A(H2N9)	A/Черноголовый Хохотун/ NJ/75/85	-	-	-	-
19	A(H3N8)	A/Утка/Украина/1/63	-	-	-	-
20	A(H4N6)	A/Утка/ЧССР/56	-	-	-	-
21	A(H5N2)	A/Mallard/Pensylvania/10218/84	+	-	+	-
22	A(H7N1)	A/FPV/Росток	-	+	-	+
23	A(H9N2)	A/Swine/Hong Kong/9/98	-	-	-	-
24	A(H10N7)	A/Цыпленок/Германия/49	-	-	-	-
25	A(H13N2)	A/Кит/Мэйн/328/84	-	-	-	-
26	A(H5N1)	A/Grebe/Novosibirsk/29/05	+	+	+	+
27	A(H5N1)	A/курица/Покров/09	+	+	+	+

**Результаты и их обсуждение.** Результаты исследования эпидемических штаммов вируса гриппа, выделенных от людей, показали возможность определять наличие РНК вируса гриппа А подтипа N1 и дифференцировать его от других типов и подтипов вируса гриппа. В частности, было установлено, что с помощью разработанных тест-систем можно определить наличие РНК вируса гриппа А подтипа H5N1. При определении вируса гриппа А подтипа H3N2 и вируса гриппа В перекрестных реакций не обнаружено (таблица). С помощью разработанных тест-систем показано наличие РНК вируса гриппа А подтипа H5 в эталонных штаммах A/Mallard/Pensylvania/10218/84 и A/Grebe/Novosibirsk/29/05, а также РНК вируса гриппа А подтипа N1 в эталонных штаммах A/WSN/33, A/FPV/Росток и A/Grebe/Novosibirsk/29/05. Необходимо отметить, что с использованием разработанных тест-систем можно детектировать также вирусы, выделенные в более поздний период времени A/курица/Покров/09. Особый интерес представляли исследования тест-систем с эталонными штаммами вируса, хранившимися в замороженном состоянии длительное время. Так, эпидемические штаммы A/СССР/90/77 (H1N1) и A/WSN/33 (H1N1) при обнаружении РНК вируса гриппа А подтипа N1 с помощью разработанных тест-систем показали положительные результаты.

**Выводы.** С помощью разработанных тест-систем возможно обнаружение вируса гриппа А подтипа H5N1 у человека и животных и его дифференциация от других типов и подтипов вируса гриппа.

#### Литература

1. Слепушкин, А.Н. Профилактика гриппа и ОРВИ / А.Н. Слепушкин, Л.Н. Власова // Русский мед. журн. – 2001. – Т. 9, № 16. – С. 717-719.
2. De Jong, M.D. Avian influenza A (H5N1) / M.D. de Jong, T.T. Hien // J. Clin. Virol. – 2006. – Vol. 35. – P. 2-13.
3. The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host / C.A. Russell [et al.] // Science. – 2012. – Vol. 336, N 6088. – P. 1541-1548.

Поступила 23.07.2012

## THE DEVELOPMENT OF THE DETECTION METHODS OF INFLUENZA A SUBTYPE H5N1 BY PCR AND REAL-TIME PCR.

Akanina D.S., Grebennikova T.V., Pleteneva T.V.

*Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia*

In the paper the development of two test systems for detection of RNA of influenza A virus subtype H5N1 have been described: a test system for the diagnosis of influenza A virus subtype H5N1 by PCR and a test-system for the diagnosis of influenza A virus subtype H5N1 by PCR in real time. The specific oligonucleotides complementary to the conservative areas of hemagglutinin and neuraminidase genes were designed during the work. The effectiveness of the obtained test systems was tested on reference strains of influenza viruses of different types and subtypes isolated from humans, animals and birds.

**Keywords:** influenza A, H5N1, PCR, real-time PCR.

## ГРИПП И ОРВИ: СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ

Кареткина Г.Н.

*Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва, Россия*

**Резюме.** Эпидемиологическая ситуация в России в настоящее время характеризуется социркуляцией нескольких подтипов вируса гриппа А, типа В и множества возбудителей острых респираторных вирусных инфекций (аденовирусы, вирусы парагриппа, респираторно-синцитиальной вирусной инфекции и др.). Среди препаратов, используемых для лечения и профилактики этих инфекций, особое место занимает новый российский инновационный препарат Кагоцел, терапевтическая и профилактическая эффективность, а также безопасность которого убедительно доказаны.

**Ключевые слова:** грипп, острые респираторные вирусные инфекции, лечение и профилактика, интерфероны, индукторы интерферонов, пандемия.

**Введение.** Несмотря на несомненные успехи вирусологии, эпидемиологии, химиотерапии, вакцинологии, грипп и острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) остаются самыми массовыми заболеваниями человека в мире, в том числе и в России, где их доля в общей структуре инфекционной заболеваемости превышает 90%. Связанный с ними экономический ущерб только в Москве в 2011 г. составил 29,4 млрд. руб., в то время как на долю всех остальных инфекционных болезней приходится 3,4 млрд. руб.\* Особую актуальность проблема гриппа приобрела во время недавней пандемии.

Обширная группа ОРВИ включает ряд самостоятельных, сходных по клиническим проявлениям болезней. Все они вызываются вирусами (их более 200), имеют воздушно-капельный путь передачи возбудителя, характеризуются поражением органов дыхания. К числу наиболее значимых ОРВИ относятся: грипп; аденовирусные заболевания; парагрипп; респираторно-синцитиальная вирусная инфекция (РСВ-инфекция); риновирусная и короновиральная инфекции [1–3].

Ежегодно регистрируются сезонные вспышки ОРВИ и гриппа. В 2009 г. ситуация существенно осложнилась в связи с появлением нового, прежде не встречавшегося в человеческой популяции вируса А/Н1N1/Калифорния, вызвавшего пандемию и продолжающего циркулировать в человеческой популяции до сих пор. Для всех ОРВИ, включая грипп, характерно сочетание общеинфекционного синдрома с признаками поражения дыхательных путей [1, 2, 4].

Практическим врачам зачастую невозможно клинически с уверенностью диагностировать ту или иную ОРВИ у конкретного больного, тем более что в ряде случаев имеет место смешанная инфекция (например, грипп и парагрипп и др. сочетания).

Именно поэтому в распоряжении клиницистов должны быть препараты, одинаково эффективные для профилактики и лечения как гриппа, так и других острых респираторных вирусных инфекций.

В последние годы в арсенале клиницистов появились новые лекарственные препараты для лечения и профилактики гриппа и других ОРВИ – индукторы интерферонов (ИИ).

Как известно, сами интерфероны (ИФН) являются медиаторами иммунитета (цитокинами), обладающими универсально широким спектром биологической активности, в частности антивирусным и иммуномодулирующим эффектом. Образование и действие ИФН составляет важнейший механизм врожденного (естественного) иммунитета.

Выработка ИФН – первая линия защиты клетки от вирусной инфекции, значительно опережающая синтез специфических антител и другие факторы иммунитета. ИФН ингибируют внутриклеточные этапы репродукции вирусов в зараженных клетках и обеспечивают невосприимчивость к вирусам окружающих здоровых клеток.

Наиболее детально изучены взаимоотношения системы ИФН с вирусами гриппа. Последние обладают способностью угнетать выработку ИФН инфицированными клетками, что способствует быстрому прогрессированию инфекции. Установлено также подавление защитного действия ИФН при РСВ-инфекции. Указанные факты послужили основанием для использования препаратов ИФН в лечении и профилактике гриппа и ОРВИ, а в последующем – для применения с этой целью ИИ [5, 6].

Механизм действия и спектр активности индукторов интерферона и ИФН аналогичны, однако ИИ имеют целый ряд преимуществ перед экзогенными ИФН. В частности, образование эндогенного ИФН при введении ИИ является более физиологичным процессом, нежели повторное введение ИФН, которые к тому же быстро выводятся из организма и угнетают образование собственных (аутологичных) ИФН по принципу отрицательной обратной связи. Все наиболее известные ИИ разработаны отечественными учеными [5, 6].

**Материалы и методы.** За период 2000–2012 гг. проведены клинические плацебо-контролируемые исследования с участием более чем 2000 как взрослых, так и детей старше 3-х лет нового инновационного российского препарата Кагоцел, который относится к индукторам ИФН.

Кагоцел вызывает в организме человека образование смеси так называемых «поздних» ИФН-α и ИФН-β, обладающих высокой противовирусной активностью, и стимулирует длительную продукцию ИФН: при однократном применении препарата ИФН циркулируют в организме пациента на терапевтическом уровне в течение целой недели, что позволяет эффективно использовать Кагоцел для профилактики и лечения ОРВИ.

Клинические исследования эффективности профилактического действия Кагоцела проводились в период сезонного подъема заболеваемости ОРВИ. Кагоцел или плацебо назначали в течение 4 недель по следующей цикловой схеме: 2 дня по 2 табл., затем 5 дней перерыв.

Для лечения больных гриппом и другими ОРВИ, в том числе и при осложнении бактериальной инфекцией (ангина), использовалась следующая схема применения Кагоцела: по 2 таблетки 3 раза в день в течение первых 2 дней, в последующие 2 дня — по 1 таблетке 3 раза в день [7, 8].

Для лечения детей старше 6 лет Кагоцел назначали по 1 таблетке 3 раза в день в течение первых двух дней, затем по 1 таблетке 2 раза в день в течение последующих 2-х дней. Суммарная доза за 4 дня составляла 120 мг препарата (10 таблеток).

**Результаты и их обсуждение.** Первые широкомасштабные рандомизированные слепые плацебо-контролируемые многоцентровые клинические испытания эффективности препарата Кагоцел при лечении гриппа и других ОРВИ, а также для их профилактики были проведены в 2000–2003 гг.

В последующие годы Кагоцел с успехом применялся в клинической практике.

Профилактическая и терапевтическая эффективность Кагоцела подтверждены и во время пандемии гриппа 2009–2010 гг. В частности, из 580 медицинских сотрудников Инфекционной клинической больницы № 1 г. Москвы, имевших контакт с больными пандемическим гриппом (число которых составило 874 человек), и принимавших с профилактической целью Кагоцел, только одна медсестра заболела гриппом А/Н1N1/–2009 и вскоре выздоровела [9].

Проведенные клинические исследования продемонстрировали высокую эффективности Кагоцела, что проявлялось в укорочении лихорадочного периода, более быстром исчезновении симптомов интоксикации и катарального синдрома по сравнению с плацебо. По клиническим данным и лабораторным параметрам установлено отсутствие побочных явлений, токсических реакций, иммуносупрессивного влияния Кагоцела на показатели гуморального и клеточного иммунитета [2, 8].

Полученные убедительные данные об эффективности Кагоцела для лечения и профилактики ОРВИ (включая грипп) у взрослых, а самое главное — отсутствие у препарата токсичности, т.е. безопасность Кагоцела, послужили основанием для изучения его терапевтической эффективности у детей [10].

Исследователи констатировали более быстрое исчезновение симптомов интоксикации, лихорадки, сокращение длительности катарального и воспалительного синдромов со стороны верхних дыхательных путей у больных, получавших Кагоцел, отсутствие побочных эффектов и хорошую переносимость препарата. Обоснованной является их рекомендация к применению Кагоцела для профилактики и лечения гриппа и ОРВИ у детей с 6-ти летнего возраста [10].

На протяжении более чем 10-ти лет по данным компании производителя ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС» препарат Кагоцел получили более 5 млн. пациентов, при этом не зарегистрировано ни одного случая каких-либо серьезных побочных реакций. В ходе проводимых по разрешению Минздравсоцразвития РФ клинических плацебо-контролируемых исследований с участием в общей сложности более 2 000 пациентов не были зарегистрированы нежелательные явления при применении препарата Кагоцел. (В соответствии со ст. 64–66 Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» «НИАРМЕДИК ПЛЮС» проводит сбор данных по нежелательным явлениям, связанных с приемом препарата Кагоцел. С этой целью в компании создана и функционирует система фармаконадзора. Уполномоченным по фармаконадзору все данные по безопасности применения препарата Кагоцел, в том числе во время проведения клинических исследований, регистрируются и подаются в Росздравнадзор. ПОБЛС № 2 (периодический отчет по безопасности лекарственного средства) за отчетный период с 01.07.2009 по 30.06.2012 был подготовлен и представлен в Росздравнадзор 18.07.2012).

**Выводы.** Таким образом, новый российский препарат Кагоцел является высокоэффективным средством для лечения и профилактики ОРВИ и гриппа, вызванного различными типами и штаммами вируса, включая пандемические. С профилактической целью препарат может применяться планомерно в период сезонного подъема заболеваемости ОРВИ, а также экстренно, непосредственно после контакта с больными.

Кагоцел имеет ряд преимуществ по сравнению с другими препаратами, применявшимися прежде: наилучший профиль безопасности, удобство применения, отсутствие побочных реакций. Существенно, что Кагоцел обладает прямым противовирусным эффектом, даже будучи назначен относительно поздно — до четвертых суток от начала болезни.

За период 2000–2012 гг. клинические плацебо-контролируемые исследования с участием как взрослых, так и детей старше 3-х лет продемонстрировали высокую терапевтическую и профилактическую эффективность Кагоцела как при гриппе, вызванном различными типами и подтипами вируса (в том числе пандемического), так и при прочих

ОРВИ, что выразилось в достоверном снижении заболеваемости гриппом/ОРВИ, а в случаях его возникновения — в более легком течении, уменьшении числа осложненных форм.

#### Литература

1. Деева, Э.Г. Грипп. На пороге пандемии: руководство для врачей / Э.Г. Деева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 208 с.
2. Кареткина, Г.Н. Применение индукторов интерферонов для лечения и профилактики гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций / Г.Н. Кареткина // Леч. врач. – 2009. – № 10. – С. 36-41.
3. Лыткина, И.Н. Применение индукторов интерферонов в профилактике гриппа и острых респираторных вирусных инфекций / И.Н. Лыткина // Леч. врач. – 2006. – № 9. – С. 88-89.
4. Максакова, В.Л. Применение препарата «Кагоцел» для лечения и профилактики гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций / В.Л. Максакова, И.А. Васильева, М.К. Ерофеева // Медлайн-экспресс. – 2009. – № 1. – С. 42-45.
5. Ершов, Ф.И. Антивирусные препараты: 2-е изд.: справочник / Ф.И. Ершов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 312 с.
6. Ершов, Ф.И.. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств) / Ф.И. Ершов, О.И. Киселев. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2005. – 368 с.
7. Современные подходы к повышению эффективности терапии и профилактики гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций / Н.А. Малышев [и др.] // Consilium medicum. – 2005. – Т. 7, № 10. – С. 831-835.
8. Терапевтическая эффективность Кагоцела при лечении больных не осложненным гриппом и гриппом, осложненным ангиной / Л.Н. Меркулова [и др.] // Клин. фармакол. и терапия. – 2002. – Т. 11, № 5. – С. 21-23.
9. Лыткина, И.Н. Профилактика и лечение гриппа и острых респираторных вирусных инфекций среди эпидемиологически значимых групп населения / И.Н. Лыткина, Н.А. Малышев // Леч. врач. – 2010. – № 10. – С. 66-69.
10. Клиническая эффективность препарата Кагоцел при гриппе и ОРВИ у детей с 2 до 6 лет / Р.С. Харламова [и др.] // Детские инфекции. – 2010. – № 4. – С. 1-7.

Поступила 13.09.2012

## INFLUENZA AND ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS: A MODERN APPROACH TO PREVENTION AND TREATMENT

Karetkina G.N.

*Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia*

At the present time the epidemiological situation in Russia is characterized by co-circulation of several subtypes of influenza A, type B, and many agents of acute respiratory viral infections (adenovirus, parainfluenza viruses, respiratory syncytial virus infection, etc.). Among the drugs used for the treatment and prevention of these infections, a special place is Russian new innovative drug Kagocel, therapeutic and prophylactic efficacy and safety of which is well documented.

**Keywords:** influenza, acute respiratory viral infection, treatment and prevention, interferons, interferon inducers, the pandemic.

## АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКЦИИ ВИРУСНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Сивец Н.В.<sup>1</sup>, Бабенко А.С.<sup>2</sup>, Шмелева Н.П.<sup>1</sup>, Грибкова Н.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РНИЦ эпидемиологии и микробиологии;

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**Резюме.** Методы выделения ДНК или РНК должны обеспечивать полноценный лизис биологического материала и селективную экстракцию (сорбцию), а также обеспечивать высокий процент выхода ДНК/РНК. Проведенный сравнительный анализ экстракции ДНК/РНК показал, что все использованные в работе наборы обеспечивают лизис биологического материала и селективную экстракцию (сорбцию). Отделение компонентов, которые ингибируют ПЦР и концентрирование из больших объемов, данные наборы обеспечивают неравноценно.

**Ключевые слова:** экстракция ДНК/РНК, ПЦР, биологический материал.

**Введение.** Острые респираторные инфекции (ОРВИ) занимают ведущее место среди инфекционных болезней человека. Актуальность проблемы определяет чрезвычайно высокий

уровень заболеваемости, приводящий к высоким экономическим затратам, за счет частичной потери трудоспособности [1]. Этиологическими агентами ОРВИ являются респираторные вирусы: рино-, корона-, адено-, энтеровирусы, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирусы гриппа и парагриппа, а также бока- (HCoV) и метапневмовирусы человека (МПВ) [2]. Практически все вирусные заболевания респираторного тракта имеют сходную клиническую симптоматику, поэтому использование современных методов лабораторной диагностики играет значительную роль в выявлении этиологического агента заболевания. Одним из перспективных методов исследований является полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая обладает высокой чувствительностью и позволяет в достаточно короткие сроки получить информацию о возбудителе заболевания. В настоящее время предпочтение отдается ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Принципиальным преимуществом ПЦР-РВ является возможность снижения количества манипуляций с исследуемым образцом, упрощение анализа и снижение вероятности ошибок, а также оценка исходного количества копий ДНК в исследуемом образце [3]. ПЦР-РВ не проводится непосредственно на биологических образцах без предварительной экстракции нуклеиновых кислот, поэтому выделение ДНК и РНК является важным шагом подготовки проб перед проведением реакции. Техника выделения нуклеиновых кислот должна обеспечивать полноценный лизис биологического материала, селективную экстракцию и сорбцию, концентрирование из больших объемов, разделение ДНК и РНК с отделением компонентов, которые ингибируют ПЦР [4].

Методы выделения нуклеиновых кислот по основным физическим и биохимическим признакам делятся на 2 класса: жидкофазные и твердофазные методы. Стандартная методика получения чистого препарата жидкофазными методами основана на использовании фенол-хлороформной экстракции. ДНК является полярной молекулой и не растворяется в органических растворителях. При перемешивании клеточного лизата и фенола формируются две фазы. ДНК находится в верхней (водной) фазе, а денатурированные белки — в нижней (органической) фазе. В твердофазных методах выделения нуклеиновых кислот используется твердый сорбент, содержащий функциональные группы, которые связывают нуклеиновые кислоты. Твердофазные системы, адсорбирующие нуклеиновые кислоты — это частицы на основе кварца. Нуклеиновая кислота обратимо связывается с сорбентом в присутствии высокой концентрации хаотропных солей. Примеси отмываются хаотропной солью, а хаотропная соль удаляется 80% этанолом. Очищенная нуклеиновая кислота снимается со стекла буфером с низкой ионной силой.

Учитывая развитие современных методов диагностики и необходимость максимального упрощения процедур проведения исследований, целью данной работы стал подбор наиболее адекватного способа проведения пробоподготовки ДНК/РНК с помощью коммерческих наборов, присутствующих на рынке страны для дальнейшего их использования при работе с клиническим материалом.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служили назофарингеальные мазки, полученные от пациентов в первые дни после госпитализации в стационары республики. Назофарингеальные мазки собирали в транспортную среду следующего состава: 500 мл раствора Хенкса, 0,5% бычьего сывороточного альбумина V фракции (БСА), 1 мл 4%-ного раствора гентамицина.

Выделение вирусной ДНК/РНК из клинического материала проводили наборами «ДНК-сорб» (АмплиСенс, Россия), «Рибо-сорб» (АмплиСенс, Россия), «РНК-ВТК», «ДНК-ВК» (Институт биоорганической химии НАН Беларуси), «QIAamp Viral RNA Kit», (Qiagen, Германия). ДНК экстрагировали наборами «ДНК-сорб», «Рибо-сорб», «ДНК-ВК», выделение РНК из клинического материала проводили наборами «Рибо-сорб», «РНК-ВТК», «QIAamp Viral RNA Kit» согласно инструкции производителей. В основе этих наборов

лежит модификация метода выделения нуклеиновых кислот (НК), предложенная R. Boom с соавт. [5]. Метод предполагает лизис клеточной мембраны в концентрированном растворе гуанидинтиоцианата, кроме этого, обеспечивается сорбция ДНК или РНК на частицах силикагеля в суспензии. Далее после четырех промывок и центрифугирования суммарную нуклеиновую кислоту элюируют с высушенного силикагеля водой или слабосоленым буфером. В наборах «ДНК-ВК», «РНК-ВТК», «QIAamp Viral RNA Kit» для выделения НК используется колонки с мембранными фильтрами. Метод работает по аналогичной схеме (сорбция ДНК/РНК из лизата — промывание — элюция).

Определение концентрации и чистоты препарата ДНК/РНК. Определение концентрации ДНК/РНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Для исследования использовали 5 мкл образца НК. Метод определения концентрации нуклеиновых кислот с помощью спектрофотометра в растворе основан на том, что максимальная фотометрическая адсорбция НК в растворе наблюдается при 260 нм и непосредственно коррелирует с концентрацией ДНК и РНК. Соотношение поглощения при длинах волн 260/280 нм показывает чистоту препарата НК. Коэффициент чистоты ДНК равен — 1,8; для РНК — 2,8. Меньшие значения коэффициента чистоты говорят о содержании примесей белка или других контаминирующих агентов, имеющих значительное поглощение при 280 нм.

**Результаты и их обсуждение.** Выделение ДНК было проведено из 24 клинических образцов. В каждом случае для выделения использовали 3 аликвоты одного и того же образца. Полученная ДНК, выделенная из одной пробы тремя тест-системами, была проанализирована на спектрофотометре NanoDrop2000.

Анализ результатов экстракции ДНК из образцов клинического материала показал, что наиболее чистый препарат ДНК обеспечивает набор «Рибо-сорб», среднее значение коэффициента 260/280 нм составил 1,5 (требуемое значение — 1,8). Для набора «ДНК-сорб» и «ДНК-ВК» коэффициент равен 1,1. Значение коэффициента ниже 1,8 может свидетельствовать о загрязнении препарата компонентами, остающимися после выделения НК. Сравнение эффективности экстракции ДНК данными наборами представлено в табл. 1.

Таблица 1 — Сравнение эффективности экстракции ДНК разными наборами реагентов

Наборы реагентов	«Рибо-сорб»	«ДНК-сорб»	«ДНК-ВК»
Концентрация нг/мл	27,1	1,6	19,5
Соотношение поглощения 260/280 нм	1,6	1,1	1,1

Сравнительный анализ экстракции РНК из проб клинического материала проводили с использованием набора реагентов «Рибо-сорб», (компания «Амплисенс», РФ), «РНК-ВТК» (Институт биоорганической химии НАН Беларуси) и «QIAamp Viral RNA Kit» (Qiagen, Германия). С данными реагентами было исследовано 24 клинических образца. Полученная РНК анализировалась на спектрофотометре NanoDrop2000. Результаты эффективности экстракции РНК представлены в табл. 2.

Таблица 2 — Сравнение эффективности экстракции РНК разными наборами реагентов

Наборы реагентов	«Рибо-сорб»	«QIAamp Viral RNA Kit»	«РНК-ВТК»
Концентрация нг/мл	16,8	53,7	16,4
Соотношение поглощения 260/280 нм	1,1	2,4	1,1

Спектрофотометрический анализ экстракция РНК из образцов клинического материала самый чистый препарат РНК обеспечивает набор «QIAamp Viral RNA Kit», значение соотношения поглощения при 260/280 нм составляет 2,4 (требуемое значение — 2,8). Для набора «Рибо-сорб» этот коэффициент равен 1,1. Для набора «РНК-ВТК» — 1,6.

Значение коэффициента ниже 2,8 также свидетельствует о загрязнении препарата РНК компонентами, остающимися после выделения НК.

**Заключение.** Проведенный сравнительный анализ экстракции ДНК («ДНК-сорб», Россия, «Рибо-сорб», Россия, «ДНК-ВК», Беларусь) и РНК («Рибо-сорб», Россия, «РНК-ВТК», Беларусь, «QIAamp Viral RNA Kit», Германия) показал, что все наборы обеспечивают лизис биологического материала и селективную экстракцию (сорбцию). Отделение компонентов, которые ингибируют ПЦР и концентрирование из больших объемов, лучше обеспечивают наборы «Рибо-сорб» и «QIAamp Viral RNA Kit». Наборы «РНК-ВТК», «ДНК-ВК» «QIAamp Viral RNA Kit» позволяют сократить риск контаминации и временные затраты.

#### Литература

1. Зайцев, А.А. Острые респираторные инфекции: перспективы вирусной терапии / А.А. Зайцев, О.И. Горелов, О.И. Клочков // Вест. семейной медицины. – 2009. – № 5. – С. 2-6.
2. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections / B.G. Williams [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2002. – Vol. 2. – P. 25-32.
3. ПЦР «в реальном времени» / под ред. Д.В. Ребрикова. – 2-е изд. – М., 2009. – 223 с.
4. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии / О.С. Антонова [и др.] // Науч. приборостроение. – 2010. – Т. 20, № 1. – С. 3-9.
5. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R. Boom [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1990. – Vol. 28, N 3. – P. 495-503.

Поступила 04.09.2012

## ANALYSIS EFFICIENCY OF EXTRACTION VIRAL NUCLEIC ACIDS

**Sivets N.V.<sup>1</sup>, Babenko A.S.<sup>2</sup>, Shmialiova N.P.<sup>1</sup>, Gribkova N.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;

<sup>2</sup>Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Methods for isolation of DNA or RNA should provide a complete lysis of the biological material and selective extraction (sorption), as well as to provide a high DNA/RNA yield. The comparative analysis of DNA/RNA extraction showed that all kits used provided the lysis of biological material and selective extraction (sorption). These kits provided separation of components that inhibit PCR and the concentration of large volumes unequally.

**Keywords:** DNA/RNA extraction, PCR, biological material.

## КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ГРИППА А (H1N1–2009) У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ

**Сергиенко Е.Н., Германенко И.Г.**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В работе представлены клинические и лабораторные особенности течения гриппа А (H1N1) pdv-09 у детей, госпитализированных в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница» г. Минска. Выявление особенностей базировалось на проведении сравнительного анализа клинико-лабораторных проявлений с гриппом А в допандемический период (до 2009 г.).

**Ключевые слова:** грипп, дети, лихорадка, респираторные проявления, осложнения.

**Введение.** Появление в 2009 г. нового штамма вируса гриппа типа А вызвало большой

интерес к изучению особенностей течения заболевания, возникающего при инфицировании этим вирусом [1–4]. Несмотря на то, что согласно данным зарубежной и отечественной литературы клиническая картина гриппа А (H1N1) pdv-09 характеризуется «классическими» для гриппа синдромами — интоксикационным и респираторным, однако интерес к данной проблеме имеет основания. По мнению некоторых авторов клиническими особенностями гриппа А (H1N1) pdv-09 являются быстрое развитие острого респираторного дистресс-синдрома, которому предшествует выраженная одышка, кашель нередко кровавистого характера [2, 3]. Согласно мнению других авторов клиническая картина характеризуется кроме основных синдромов гриппа частым развитием поведенческих реакций, особенно у детей раннего возраста, редким развитием конъюнктивита, насморка, артралгий, носовых кровотечений [1]. Именно при гриппе А (H1N1) pdv-09 многими авторами описываются симптомы поражения желудочно-кишечного тракта (боли в животе, рвота, диарея), причем с частотой от 10 до 30% [1, 3]. Согласно данным некоторых авторов заболевание протекало в основном в субклинических или легких формах, что может затруднять клиническую диагностику гриппа [2, 4].

С целью изучения клинико-лабораторных особенностей течения гриппа А (H1N1) pdv-09 у детей, проводилось наблюдение за пациентами в возрасте от 1 месяца до 18 лет, находившихся на лечении в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница» и «3-ья Городская детская клиническая больница» г. Минска, с клиническим диагнозом «Грипп А (H1N1) pdv-09».

**Материалы и методы.** В исследование было включено 118 детей с гриппом А (H1N1) pdv-09 (основная группа). Группу сравнения составили пациенты с гриппом А в допандемический период (n=113). По возрастному составу пациенты распределились следующим образом: до 1 года — 14,5% (основная группа) и 19% (группа сравнения), 1–4 года — 47% и 48%, 5–6 лет — по 11%, 7–14 лет 14,5% и 15%, 15–17 лет — 13% и 7% соответственно.

Критериями включения в группы детей послужили: наличие клинических проявлений гриппа у пациентов и обнаружение методом иммунофлюоресценции антигена вируса гриппа А в назофарингеальных мазках, взятых у пациентов, а в основной группе подтверждение этиологии заболевания проводилось также с применением метода ПЦР — выявлена РНК вируса гриппа А (H1N1) pdv-09.

У наблюдаемых пациентов при поступлении и при необходимости в динамике проводились лабораторные и инструментальные обследования:

1. Всем пациентам проводился общий анализ крови и мочи, по показаниям — биохимический анализ крови, коагулограмма, кислотно-основное состояние крови.

2. Для уточнения этиологии респираторного заболевания в вирусологической лаборатории УЗ «ГДИКБ» проводили исследование мазка из носоглотки методом иммунофлюоресцентного анализа на антигены вирусов гриппа А и В, аденовирусов, вирусов парагриппа и респираторно-синцитиального вируса, по показаниям — исследование методом ПЦР на наличие респираторных вирусов — грипп А, В, парагрипп, адено-, рино-, бока-, метапневмо-, корона- респираторно-синцитиального вирусов (исследования проводили в лаборатории гриппа и гриппоподобных заболеваний ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии»).

3. По показаниям проводились: рентгенологическое исследование органов грудной клетки, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, сердца, электрокардиография, электроэнцефалография, осмотры врачом-отоларингологом, врачом-неврологом.

Статистический анализ выполнен на персональном компьютере с использованием коммерческого пакета программы Statistica 6.0, адаптированного для медико-биологических исследований, фирмы StatSoft. Описательная статистика качественных признаков представлена абсолютными и относительными частотами, а количественных признаков — в формате: среднее значение параметров (M), доверительный интервал (95%ДИ)

при нормальном распределении признаков; медиана (Me) и интерквартильный размах (P25–P75) при ненормальном распределении признаков. Проверка гипотезы о виде распределения количественных признаков осуществлялась с помощью критерия Шапиро–Уилка. Сопоставление частоты появления клинических качественных признаков основывалось на сравнении эмпирических распределений с помощью критерия  $\chi^2$  с поправкой Йетса. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ , высоко достоверными — при  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ , недостоверными при  $p > 0,05$ . Достоверность различий между статистическими величинами определялась с использованием параметрического критерия Стьюдента (t) и непараметрического критерия Манна–Уитни (U). Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ , высоко достоверными — при  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ , недостоверными при  $p > 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Наблюдение за пациентами показало, что больные с гриппом в стационар поступали в основном в первые 2–3 дня заболевания, с признаками токсикоза разной степени выраженности и/или респираторными проявлениями. При поступлении у 15 пациентов (13%) в группе пациентов с гриппом А (H1N1–2009) и у 13 (12%) — с гриппом А в допандемический период состояние было оценено как тяжелое за счет интоксикации, явлений дыхательной недостаточности или сопутствующей патологии. В большинстве случаев (60% и 70% соответственно) тяжелое течение гриппа отмечалось у детей первых 4-х лет жизни, тяжесть в основном была обусловлена токсикозом или наличием признаков дыхательной недостаточности на момент поступления в стационар.

Заболевание в 99% (n=113) случаев при гриппе А (H1N1) pdv-09 и в 90% (n=102) при гриппе А в допандемический период начиналось остро с повышения температуры, причем у 96% (основная группа) и 86% (группа сравнения) пациентов отмечалась фебрильная лихорадка ( $p=0,0001$ ). Среднее значение максимальной температуры в группе пациентов с гриппом А (H1N1) pdv-09 составило 39,2 °C (39,1–39,3 °C), что было достоверно выше, чем при гриппе А в допандемический период — 38,9 °C (38,7–39,0 °C) ( $p=0,0011$ ). Длительность лихорадки при гриппе А (H1N1) pdv-09 была также достоверно больше, чем при гриппе А в допандемический период ( $p=0,0012$ ) (табл. 1).

Таблица 1 — Характеристика клинических симптомов при гриппе А (H1N1) pdv-09 и гриппе А в допандемический период

Признак	грипп А (H1N1) pdv-09			грипп А в допандемический период			p
	n	M (95%ДИ)	Min-Max	n	M (95%ДИ)	Min-Max	
Максимальная температура (°C)	117	39,2 (39,1–39,3)	37,2–41,0	102	38,9 (38,7–39,0)	37,2–40,2	0,0011
Длительность лихорадки (дни)	117	4,1 (3,8–4,4)	1–9	102	3,3 (3,0–3,7)	1–8	0,0012
Сроки появления респираторных проявлений (день)	114	1,4 (1,2–1,5)	1–5	95	1,2 (1,1–1,3)	1–3	0,063
Длительность респираторных проявлений (дни)	114	8,8 (8,0–9,6)	2–25	94	6,7 (6,1–7,3)	2–17	0,0001

Респираторный синдром при гриппе А (H1N1) pdv-09 характеризовался наличием сухого или малопродуктивного кашля в 86% случаев, заложенности носа/ринита — в 84%,

а при гриппе А в допандемический период в 64% и 77% соответственно (табл. 2). Длительность респираторных проявлений в основной группе составила 8,8 (8,0–9,6) дней, что значимо выше, чем в группе сравнения — 6,7 (6,1–7,3) дней ( $p=0,0001$ ). Среди других проявлений гриппа выявлены: аденоидит (у 3 пациентов в основной группе и у 1 — в группе сравнения), конъюнктивит (у 1 и 3 пациентов, соответственно) и катаральный тонзиллит (у 2 пациентов с гриппом А в допандемический период).

Таблица 2 — Частота развития клинических симптомов при гриппе А (H1N1) pdv-09 и гриппе А в допандемический период

Признак	Грипп А (H1N1) pdv-09 n/относительная частота в %	Грипп А в допандемический период n/относительная частота в %	p
Наличие T °C	117/99	102/90	0,006
Наличие фебрильной T °C	113/96	88/86	0,0001
Наличие респираторных проявлений	114/97	95/84	0,003
Наличие кашля	101/86	72/64	0,0002
Наличие заложенности носа/ринита	99/84	87/77	0,247
Наличие признаков поражения ЖКТ	15/13	9/8	0,334
Наличие фебрильных судорог	3/3	6/6	0,455
Наличие гемор. синдрома	10/8	7/6,5	0,681

Как видно из табл. 2 геморрагический синдром (в виде носовых кровотечений, мелко-точечной геморрагической или петехиальной сыпи на коже туловища, лица, конечностей), как один из симптомов гриппа, появление которого обусловлено воздействием вируса на эндотелий сосудов, отмечен у 8% пациентов с гриппом А (H1N1) pdv-09 и у 6,5% — гриппом А в допандемический период; судорожный синдром на фоне повышения температуры тела свыше 38,0 °C наблюдался в 3% и 6%, соответственно. 15 пациентов (13%) с гриппом А (H1N1) pdv-09 и 9 (8%) — в группе сравнения имели клинические симптомы поражения ЖКТ (рвота 1–2 раза в сутки, жидкий без патологических примесей стул до 4–5 раз в сутки), однако, говорить однозначно, что данные признаки связаны с переносимым гриппом невозможно, так как лечение пациентов включало назначение антибактериальных препаратов или с этиотропной целью при гриппе А (H1N1) pdv-09 озельтамивира, применение которых может сопровождаться развитием побочных явлений в виде диспепсических расстройств.

Кроме того, 7 детей (6%) в возрасте старше 2 лет с гриппом А (H1N1) pdv-09 и 10 пациентов (9%) с гриппом А в допандемический период предъявляли жалобы на головную/мышечные боли, боли в глазных яблоках; слабость, вялость и сонливость наблюдались в 14% и 8% случаев соответственно. По 1 пациенту в основной группе и группе сравнения среди симптомов выявлены бред и галлюцинации, что при гриппе А (H1N1) pdv-09 было связано с развитием осложнения со стороны нервной системы — энцефалита, а у больного с гриппом А в допандемический период — с токсикозом.

Как видно из табл. 3 основной клинической формой гриппа А (H1N1) pdv-09 были фаринготрахеит/ринофаринготрахеит (56%), что статистически значимо выше чем при гриппе А в допандемический (21%) период ( $p<0,0001$ ). Поражение гортани наблюдалось достоверно чаще ( $p<0,0001$ ) у пациентов с гриппом в допандемический период (26%) причем в возрастной группе до 4 лет, что связано, как с тропностью вируса гриппа

к эпителию верхних дыхательных путей, так и анатомо-физиологическими особенностями строения дыхательных путей у детей данного возраста. Бронхит (в т.ч. обструктивный), как клиническая форма заболевания, зарегистрирован у 26% пациентов основной группы и 17% — в группе сравнения. Достоверно чаще ( $p=0,0025$ ) при гриппе А в допандемический период наблюдался фарингит.

Таблица 3 — Клинические формы гриппа А (H1N1) pdv-09 и гриппа А в допандемический период

Клиническая форма	Грипп А (H1N1) pdv-09 п/относительная частота (%)	Грипп А в допандемический период п/относительная частота (%)	p
Фарингит	4/3	18/16	0,0025
Ринофарингит	13/11	23/20	0,076
Фаринготрахеит/ Ринофаринготрахеит	66/56	24/21	<0,0001
Ларинготрахеит	5/4	29/26	<0,0001
Обструктивный бронхит/ Бронхит	30/26	19/17	0,15
Всего	118/100	113/100	-

Сопутствующая патология в виде врожденных пороков развития, заболеваний ЖКТ (хронический гастрит/гастродуоденит), почек (хронический пиелонефрит), сердечно-сосудистой системы (вегето-сосудистая дистония, искусственный водитель ритма), гепатобилиарной системы (цирроз печени), бронхо-легочной системы (бронхиальная астма, облитерирующий бронхоальвеолит), ЛОР-патологии (хронический синусит, хронический тонзиллит) и неврологической патологии (детский церебральный паралич, эпилепсия, опухоль мозжечка) выявлена у 19% пациентов в основной группе и группе сравнения.

Среди наблюдаемых пациентов развитие осложнений зарегистрировано у 35 (30%) с гриппом А (H1N1) pdv-09 и у 29 (26%) с гриппом А в допандемический период. Причем в большинстве случаев (74%) развитие осложнений при гриппе А (H1N1) pdv-09 наблюдалось у пациентов первых четырех лет жизни. Анализ медицинских карт стационарного больного (форма 003/у) пациентов обеих групп, у которых зарегистрированы осложнения, позволил выявить наличие сопутствующей патологии (ВПС, ДЦП, хронический гастродуоденит, облитерирующий бронхоальвеолит, БРА) у 11% и 14% пациентов соответственно.

Таблица 4 — Характеристика осложнений при гриппе А (H1N1) pdv-09 и гриппе А в допандемический период

Осложнения	Грипп А (H1N1) pdv-09 (n=35) п/относительная частота (%)	Грипп А в допандемический период (n=29) п/относительная частота (%)
Пневмония	17/49	5/17
Отит	7/20	16/55
Пневмония+Отит	3/8	0/0
Пневмония+Плеврит	3/8	0/0
Сепсис (отит+пневмония+плеврит)	1/3	0/0
Синусит	0/0	2/7
Отит+Синусит	0/0	1/3,5
Миокардит	0/0	1/3,5
Кардиомиодистрофия	1/3	0/0
Энцефалит	1/3	0/0

Гнойный аденоидит	0/0	1/3,5
Лимфаденит	0/0	1/3,5
Токсический гепатит	1/3	1/3,5
Инфекционно-токсическая почка	1/3	1/3,5

Как видно из табл. 4 достоверно чаще при гриппе А (H1N1–2009) развивались осложнения в виде пневмоний ( $p=0,0001$ ), при гриппе А в допандемический период — отит ( $p=0,05$ ). Анализ историй болезней пациентов с осложненным течением показал, что при гриппе А (H1N1–2009) ( $n=24$ ) пневмонии носили односторонний характер (50%) с локализацией очага воспаления в левом легком (67%), у 42% пациентов — двусторонний и у 8% — интерстициальный. У 4 пациентов (17%) отмечено развитие синпневмонического плеврита. В группе сравнения ( $n=5$ ) отмечен в основном односторонний (80%) правосторонний характер поражения легких. Сравнительный анализ всех случаев гриппа, осложненного отитами, показал более частое развитие двусторонних отитов (82%) в основной группе ( $n=11$ ), при этом каждый третий носил гнойный характер, а в группе сравнения ( $n=16$ ) отиты с двусторонним катаральным характером поражения зарегистрированы лишь у 50% пациентов ( $p=0,434$ ), у 31% — односторонний, 19% — туботит.

Таким образом, данное наблюдение подчеркивает, что для гриппа А (H1N1–2009) характерным является поражение как верхних, так и нижних дыхательных путей с нередким развитием патологического процесса в легких.

При сравнении данных гемограмм выявлено, что у детей с гриппом А (H1N1) pdv–09 воспалительные изменения были статистически значимо менее выраженными, чем у детей с гриппом А в допандемический период. Так характерными для гриппа А (H1N1) pdv–09 были более низкие значения лейкоцитов  $7,5 (6,8–8,1) \times 10^9/\text{л}$  против  $10,2 (9,1–11,2) \times 10^9/\text{л}$  при гриппе А в допандемический период ( $p=0,00003$ ), нейтрофилов  $4,4 (3,8–4,9) \times 10^9/\text{л}$  против  $6,2 (5,3–7,2) \times 10^9/\text{л}$  ( $p=0,0007$ ), лимфоцитов  $2,6 (2,4–2,9) \times 10^9/\text{л}$  против  $3,2 (2,9–3,5) \times 10^9/\text{л}$  ( $p=0,008$ ) и моноцитов  $0,4 (0,3–0,5) \times 10^9/\text{л}$  против  $0,5 (0,5–0,6) \times 10^9/\text{л}$  ( $p=0,003$ ) при более высоких показателях СОЭ  $12,6 (10,9–14,4)$  мм/час против  $8,6 (7,3–9,9)$  мм/час ( $p=0,0004$ ).

Известно, что для вирусных инфекций характерными изменениями является наличие лейкопении с лимфоцитозом при нормальном СОЭ в общем анализе крови. С целью интерпретации изменений в гемограммах детей с гриппом с учетом возрастных норм все пациенты были разделены на следующие группы: до 1 года ( $n=17$  и  $n=22$  соответственно в основной группе и группе контроля), 1–3 года ( $n=44$  и  $n=47$ ), 4–7 лет ( $n=27$  и  $n=22$ ) и старше 8 лет ( $n=29$  и  $n=22$ ).

Анализ гемограмм показал, что в группе пациентов с гриппом А (H1N1) pdv–09 в 30% наблюдений регистрировалась лейкопения против 25% при гриппе А в допандемический период ( $p=0,468$ ), у 45% пациентов против 28% — ускоренная СОЭ ( $p=0,011$ ), практически у каждого второго пациента ПЯС (46% и 51% при  $p=0,514$ ) и относительная лимфопения (50% и 57%,  $p=0,417$ ), относительный нейтрофиллез (50% против 53%), реже — лейкоцитоз (13% и 35% соответственно,  $p=0,0001$ ), относительный моноцитоз — в 9% случаев против 4% ( $p=0,281$ ). Анализируя абсолютные значения клеток крови, выявлена лимфопения (48%) у каждого второго пациента при гриппе А (H1N1) pdv–09, что достоверно выше, чем при гриппе А в допандемический период ( $p=0,045$ ), при нормальном содержании нейтрофилов — у 53% пациентов.

Таким образом, сравнительный анализ клинических проявлений и лабораторных изменений у пациентов с гриппом А (H1N1) pdv–09 и гриппом А в допандемический период позволил выявить следующие особенности:

1) Течение гриппа А (H1N1) pdv–09 у большинства пациентов, госпитализированных в стационар, среднетяжелое. Тяжелое течение отмечено в 13% случаев у детей первых

4-х лет жизни и обусловлено токсикозом или наличием признаков дыхательной недостаточности на момент поступления в стационар.

2) Клиническая картина гриппа А (H1N1–2009) характеризуется наличием двух основных синдромов — респираторного и гипертермического. Кроме того, сравнительный анализ позволил выявить следующие особенности течения гриппа А (H1N1–2009):

– острое начало заболевания (96% пациентов) с повышением температуры тела до фебрильных цифр, что статистически значимо выше, чем при гриппе А в допандемический период (86%),  $p=0,0001$ ;

– длительность лихорадки составляет в среднем 4,1 (3,8–4,4) дня, что достоверно больше ( $p=0,0012$ ), чем при гриппе А в допандемический период — 3,3 (3,0–3,7);

– респираторный синдром характеризуется наличием у большинства пациентов сухого или малопродуктивного кашля (86%), что достоверно больше, чем при гриппе А в допандемический период ( $p=0,0002$ );

– основными клиническими формами заболевания являются фаринготрахеит, ринофаринготрахеит (56%), что является статистически значимо чаще, чем при гриппе А в допандемический период (21%) при  $p<0,0001$ ;

– редкое поражение гортани (4% пациентов) с развитием ларингита/ларинготрахеита, что достоверно ниже, чем при гриппе А в допандемический период ( $p<0,0001$ );

3) У 13% пациентов имеются признаки поражения ЖКТ в виде многократной рвоты, жидкого стула до 4–5 раз в сутки, без патологических примесей, что не приводит к дегидратации.

4) Редкое развитие геморрагического и судорожного синдрома (8% и 3% соответственно), что не имеет достоверных различий по сравнению с гриппом А в допандемический период.

5) У каждого третьего пациента с гриппом А (H1N1) pdv–09, как и в группе сравнения, зарегистрированы осложнения. Однако достоверно чаще наблюдалось развитие пневмоний ( $p=0,0001$ ) с преимущественным односторонним характером поражения с локализацией воспалительного очага в левом легком. Среди других осложнений при гриппе А (H1N1) pdv–09 отмечено развитие плеврита, сепсиса, энцефалита, что не наблюдалось при гриппе А в допандемический период.

6) Каждый четвертый пациент (19%) с гриппом А имеет сопутствующую патологию, которая может усугублять течение заболевания и тем самым способствовать госпитализации пациентов в стационар.

7) Характерными для гриппа А (H1N1) pdv–09 в гемограмме пациентов являются: лейкопения или нормальное содержание лейкоцитов (87%), у каждого второго ребенка — относительная лимфопения (50%), ПЯС лейкоцитарной формулы (46%) и нейтрофиллез (50%), что не имеет достоверных различий с гриппом А в допандемический период. Однако статистически значимо реже при гриппе А (H1N1) pdv–09 регистрировался лейкоцитоз (13% против 35%,  $p=0,0001$ ), чаще — нейтропения (20% против 8%,  $p=0,0177$ ) и ускоренная СОЭ (28% против 11%,  $p=0,0114$ ).

8) Сравнительный анализ гематологических показателей позволил выявить при гриппе А (H1N1) pdv–09 достоверно были более низкие абсолютные значения лейкоцитов ( $p=0,00003$ ), нейтрофилов ( $p=0,0007$ ), лимфоцитов ( $p=0,008$ ) и моноцитов ( $p=0,003$ ) при более высоких значениях СОЭ ( $p=0,0004$ ).

#### Литература

1. Adolescent with neuropsychiatric symptoms associated with novel influenza A (H1N1) virus infection / M. German-Diaz [et al.] // *Pediat. Infect. Dis. J.* – 2010. – Vol. 29, № 6. – P. 570-571.
2. Clinical and epidemiologic characteristic children hospitalized with 2009 pandemic H1N1 influenza A infection / S. Kumar [et al.] // *Pediat. Infect. Dis. J.* – 2010. – Vol. 29, № 7. – P. 591-594.

3. Clinical and microbiologic features associated with novel swine-origin influenza A pandemic 2009 (H1N1) virus in children / P.A. Bryant [et al.] // *Pediat. Infect. Dis. J.* – 2010. – Vol. 29, № 8. – P. 694-698.

4. Clinical presentation of influenza in unselected children treated as outpatients / H. Silvernoinen [et al.] // *Pediat. Infect. Dis. J.* – 2009. – Vol. 28, № 5. – P. 372-375.

Поступила 19.07.2012

## CLINICAL AND LABORATORY MANIFESTATIONS OF INFLUENZA A (H1N1–2009) IN HOSPITALIZED CHILDREN

Serhiyenka K., Germanenka I.

*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

The paper presents clinical and laboratory features of the course of influenza A (H1N1–2009) in children hospitalized at Children's infections diseases hospital in Minsk. Revealing the features based on the comparative analysis of clinical and laboratory manifestations of influenza A in the pre-pandemic period (until 2009).

**Keywords:** influenza, children, fever, respiratory manifestations, complications.

## ЛАБОРАТОРНАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ ЭКЗАНТЕМНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Ермолович М.А.

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Для установления роли различных возбудителей в структуре экзантемных заболеваний в республиканской лаборатории по кори и краснухе в 2011 г. выявлены IgM антитела к вирусам кори, краснухи, парвовирусу В19, энтеро- и аденовирусу в сыворотке крови лиц с острой экзантемой независимо от первичного диагноза. Из 390 обследованных у 204 (52,3%) выявлены IgM антитела к одному из указанных возбудителей. На долю парвовирусной инфекции пришлось 82 (21,0%), кори — 51 (13,1%), краснухи — 20 (5,1%), аденовирусной инфекции — 33 (8,5%), энтеровирусной инфекции — 18 (4,6%) лабораторно верифицированных случаев. Все изученные инфекции были лабораторно подтверждены как у детей, так и у взрослых без четких сезонных различий, что свидетельствует о необходимости постоянной настороженности практических врачей в отношении каждой из них. Вакциноуправляемые инфекции корь и краснуха достоверно чаще встречались у взрослых, чем у детей.

**Ключевые слова:** экзантемные инфекции, лабораторная диагностика, ИФА.

**Введение.** Острая макуло-папулезная сыпь является одним из симптомов, сопровождающих развитие целого ряда инфекционных и неинфекционных заболеваний. Возникновение сыпи может быть обусловлено вирусными и бактериальными инфекциями, поражением сосудов, кровеносной системы, лекарственными и пищевыми аллергиями, а также другими причинами. Наиболее распространенными причинами вирусных экзантем в странах умеренного климата являются такие заболевания, как корь, краснуха, а также инфекции, обусловленные парвовирусом В19, энтеровирусом, аденовирусом, вирусом Эпштейна–Барр и вирусом герпеса человека 6 типа [1, 2].

Для каждой из вирусных инфекций описаны этапность появления сыпи и ее локализация, наличие таких сопутствующих симптомов как лихорадка, аденопатия, воспалительные изменения верхних дыхательных путей и внутренних органов и т.д. Однако для многих нозологических форм на основании только клинических данных постановка этиологического диагноза в случае острой экзантемной инфекции оказывается затруднительной вследствие сходства указанных симптомов [3]. Ряд вирусных инфекций, в том числе корь, краснуха, инфекционная эритема традиционно считались «детскими»,

и при возникновении у взрослых они нередко имеют нетипичное клиническое течение, что также создает трудности при диагностике. Наиболее надежным средством, позволяющим обеспечить дифференциальную диагностику экзантемных инфекций, является лабораторное обследование пациента [4].

В течение многих десятилетий на территории Беларуси были широко распространены корь и краснуха, диагностика которых основывалась преимущественно на клинико–эпидемиологических данных. В этих условиях другие заболевания, имеющие сходные клинические проявления, практически не регистрировались. В результате успешной вакцинопрофилактики число случаев кори и краснухи в последние годы снизилось в стране до единичных случаев [4]. В настоящее время в рамках выполнения региональной программы Европейского бюро ВОЗ в Беларуси поставлена цель элиминации этих двух инфекций. Для оценки успешности проводимых профилактических мероприятий и установления истинной заболеваемости корью и краснухой в стране введена обязательная лабораторная верификация каждого случая заболевания, которая осуществляется республиканской лабораторией по кори и краснухе, аккредитованной ВОЗ.

Согласно рекомендациям ВОЗ основным критерием подтверждения диагноза кори и краснухи является выявление специфических IgM антител в сыворотке крови у лиц с подозрением на данную инфекцию, при этом в течение года должно быть выявлено и обследовано не менее 2 заболевших на 100000 населения независимо от возраста [5]. Низкая заболеваемость корью и краснухой в Беларуси привела к тому, что ежегодно основная доля случаев, клинически сходных с этими заболеваниями, определялась как «ни корь, ни краснуха» и оказывалась окончательно не верифицированной. В связи с этим в 2011 г. было проведено данное исследование, целью которого являлось установление роли различных возбудителей вирусных инфекций в структуре острых экзантемных заболеваний в Республике Беларусь.

**Материалы и методы.** В исследование были включены сыворотки крови 390 лиц с острой экзантемой, собранные во всех регионах Беларуси в 2011 г. в рамках национального надзора за корью и краснухой и поступившие в республиканскую референс-лабораторию по кори и краснухе (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Пациенты были в возрасте от 3 мес. до 50 лет, забор образцов проводился через 2–14 дней от момента появления сыпи.

Все сыворотки крови были исследованы на наличие специфических IgM антител к вирусам кори и краснухи. Негативные к кори и краснухе образцы были в дальнейшем исследованы на наличие IgM антител к парвовирусу В19, адено- и энтеровирусу.

Выявление специфических IgM антител проводили в иммуноферментном анализе с использованием коммерческих тест-систем для выявления IgM антител к вирусу кори (Siemens, Германия), вирусу краснухи (Siemens, Германия), парвовирусу В19 (Virion/Serion, Германия), энтеровирусу (Virion/Serion, Германия), аденовирусу (DRG, Германия).

**Результаты и их обсуждение.** Лица с острой экзантемой, обследованные в 2011 г. на наличие специфических IgM антител к вирусам кори, краснухи, парвовирусу В19, энтеро- и аденовирусу, имели различные первичные клинические диагнозы, наиболее распространенными из которых являлись экзантема неясной этиологии, краснуха, корь, ОРИ с экзантемой (табл.).

Таблица — Результаты выявления специфических IgM антител к вирусам кори, краснухи, парвовирусу В19, энтеровирусу, аденовирусу у лиц с острыми экзантемными заболеваниями, Республика Беларусь, 2011 г.

Клинический диагноз	Обследовано, n	Имели IgM антитела к вирусам				
		кори	краснухи	парвовирусу В19	энтеровирусу	аденовирусу
Аденовирусная инф.	9		5		2	

Аллергич. дерматит	34		1	6	3	5
Вирусная экзантема	3		1			
Иерсиниоз	7		1	2		1
Инф. мононуклеоз	6			2		2
Корь / корь?	56	45	1	1	3	1
Краснуха	72		6	23	5	6
ОРИ с экзантемой	59	5	2	11		6
Парвовирусная инф.	18		1	5	1	
Скарлатина	10		1	2	1	
Экзантема неясной этиологии	110	1	1	29	3	11
Энтеровирусная инфекция	6			1		1
Всего	390	51 (13,1%)	20 (5,1%)	82 (21,0%)	18 (4,6%)	33 (8,5%)

Во всех случаях изучение специфических антител проводилось независимо от предварительного диагноза, указанного в сопроводительных документах. В первую очередь осуществлялось выявление серологических маркеров кори и краснухи, поскольку в настоящее время эти инфекции имеют наибольшую эпидемиологическую значимость. Всего из 390 обследованных у 204 (52,3%) были выявлены IgM антитела к одному из возбудителей (кори, краснухе, парвовирусу В19, энтеро- и аденовирусу), при этом для всех инфекций лабораторно подтвержденные случаи выявлялись у лиц с различными первичными клиническими диагнозами.

IgM антитела к вирусу кори были обнаружены в 51 (13,1%) из 390 образцов, полученных от лиц с диагнозом: корь, ОРИ с экзантемой и экзантема неясной этиологии. Большинство (46 из 51) случаев кори в 2011 г. относились к одному очагу инфекции в Минской области, поэтому после подтверждения там кори у первых заболевших, имевших предварительный диагноз ОРИ с экзантемой, в остальных случаях при направлении на обследование устанавливался диагноз корь или корь? Единичные завозные случаи кори были первично расценены как корь?, ОРИ, экзантема неясной этиологии.

В 20 лабораторно подтвержденных случаях краснухи наиболее распространенными первичными диагнозами являлись краснуха и аденовирусная инфекция, однако в половине случаев заболевшие имели другие диагнозы, включая аллергический дерматит, иерсиниоз и скарлатину.

Среди всех обследованных с острой экзантемой наибольшее число случаев пришлось на долю парвовирусной инфекции 21,0% (82/390), при этом парвовирусная инфекция встречалась преимущественно в случаях заболевания с предварительными диагнозами экзантема неясной этиологии (29/110) и краснуха (23/72). Специфические IgM антитела к энтеровирусу и аденовирусу имели 4,6% и 8,5% обследованных, соответственно.

Из 204 лабораторно расшифрованных случаев острой экзантемы 100 было выявлено у лиц 0–18 лет и 104 — у лиц 19 лет и старше (рисунок 1).

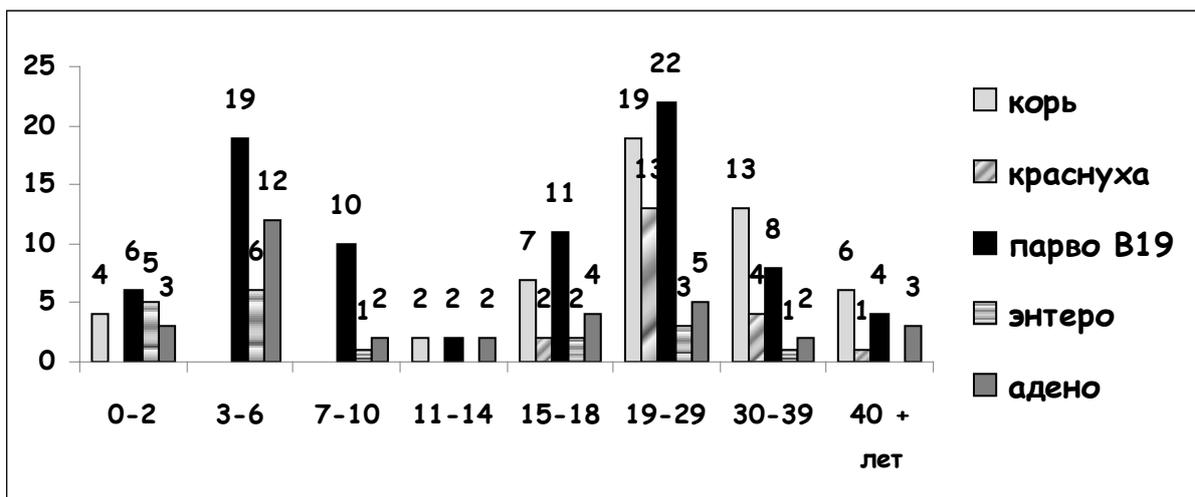


Рисунок 1 — Возрастное распределение лабораторно подтвержденных случаев кори, краснухи, парво-, энтеро-, аденовирусной инфекции, Республика Беларусь, 2011 г.

У детей и подростков до 19 лет почти половина (48%) случаев с лабораторно установленным диагнозом были обусловлены парвовирусной инфекцией, реже встречались аденовирусная (23%) и энтеровирусная (14%) инфекции. Для этих трех заболеваний наибольшее число случаев было сосредоточено в возрастной группе 3–6 лет. Диагноз кори был подтвержден преимущественно у непривитых детей в возрасте 0–2 лет и подростков 15–18 лет. Два случая краснухи были выявлены только в возрастной группе 15–18 лет, ни одного заболевшего среди детей 0–14 лет не было.

У взрослых 19 лет и старше было получено лабораторное подтверждение всех пяти исследованных инфекций (кори, краснухи, парво-, адено- и энтеровирусной инфекций), несмотря на то, что в основном они традиционно рассматриваются как заболевания детского возраста. Наибольшее число лабораторно расшифрованных случаев острой экзантемы у взрослых в 2011 г. было обусловлено корью, парвовирусной инфекцией и краснухой, на долю которых пришлось 36,5, 32,7 и 17,3% случаев, соответственно. Для всех исследованных инфекций среди заболевших преобладали лица 19–29 лет. Вакциноуправляемые инфекции корь и краснуха у взрослых, в сравнении с детьми и подростками, встречались достоверно чаще (36,5 против 6,0% для кори и 17,3 против 2,0% для краснухи;  $p < 0,01$ ).

Анализ динамики заболеваемости экзантемными инфекциями по месяцам выявил различия в распределении вакциноуправляемых и вакцинонеуправляемых инфекций. Подъем заболеваемости корью регистрировался с мая по июль, что объясняется единичной ограниченной вспышкой кори, имевшей место в 2011 г. Случаи краснухи выявлялись с февраля по июль с наибольшим числом заболевших в феврале и мае. В последние годы заболеваемость корью и краснухой в Беларуси определяется только заносными случаями инфекции или ограниченным распространением заболевания вследствие заноса. Согласно эпидемиологическим данным, в феврале 2011 г. имел место занос вируса краснухи с территории Вьетнама и его ограниченное распространение в г. Минске. Рост числа случаев краснухи в мае может отражать очередной занос инфекции, но также может свидетельствовать о том, что единичные случаи краснухи у взрослых в апреле имели легкое течение и были пропущены. Как правило, ответить на этот вопрос помогает молекулярно-генетическое изучение вирусов, однако ни одного вируса краснухи от заболевших в этот период получено не было, поэтому сделать окончательное заключение об источнике инфекции не представляется возможным (рисунок 2).

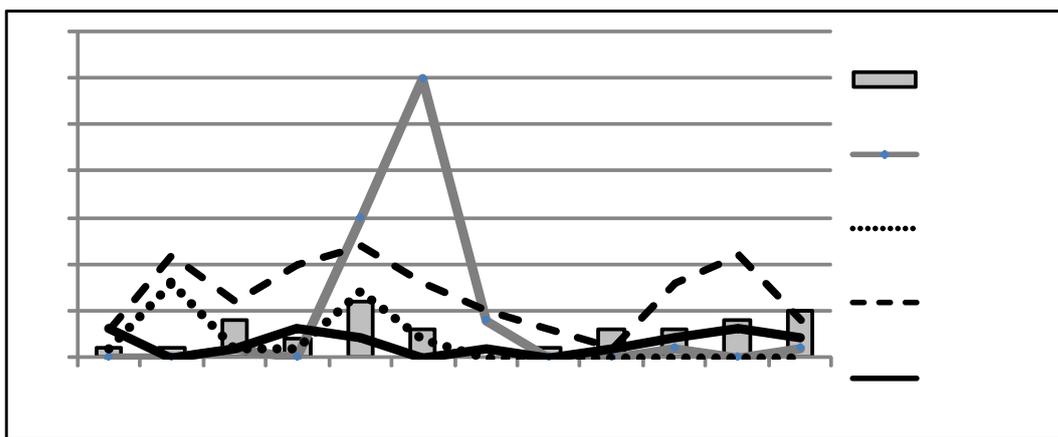


Рисунок 2 — Распределение лабораторно подтвержденных случаев кори, краснухи, парво-, энтеро-, аденовирусной инфекции по месяцам, Республика Беларусь, 2011 г.

Парвовирусная инфекция регистрировалась практически в течение всего года со снижением заболеваемости с июля по сентябрь, при этом характерной для данного заболевания зимне-весенней сезонности выявлено не было [6]. Экзантемные формы адено- и энтеровирусной инфекции также выявлялись в течение всего года с незначительным весенне-осенним подъемом. Отсутствие подъема заболеваемости в летний период в случае энтеровирусной инфекции, вероятно, связано с тем, что экзантемная форма заболевания не является широко распространенной и наиболее характерной, и ее выявление не отражает истинного распространения инфекции в популяции.

**Выводы.** Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о важности лабораторного обследования на широкий спектр вирусных инфекций для установления этиологического диагноза при острых экзантемных заболеваниях. В условиях низкой заболеваемости корью и краснухой, наблюдаемой в стране в последние годы, и при проведении лабораторного обследования только на эти инфекции, подавляющее большинство случаев острой макуло-папулезной сыпи остались бы этиологически не расшифрованными. Включение в схему обследования таких заболеваний, как парво-, адено-, энтеровирусная инфекции позволило расшифровать почти 55% выявленных в стране в 2011 г. острых экзантемных заболеваний.

Значимость лабораторной верификации диагноза при экзантемных заболеваниях подтверждается следующими наблюдениями, полученными при выполнении данного исследования. Во-первых, основным предварительным диагнозом при направлении на лабораторное исследование являлась экзантема неясной этиологии, что, по сути, свидетельствует о невозможности выделения врачом определенной нозологической формы на основании клинических данных. Еще один достаточно распространенный предварительный диагноз, ОРИ с экзантемой, также описывает только клинический синдром, наблюдаемый у пациента. Во-вторых, в тех случаях, когда на основании клинических данных конкретное заболевание было заподозрено, лабораторные результаты во многих случаях не подтверждали его, а указывали на наличие другого этиологического агента, т.е. только лабораторное обследование дало возможность определить истинную распространенность каждого из заболеваний. Исключение составляли лишь вспышки инфекционных заболеваний, когда первые случаи были лабораторно расшифрованы, и диагностика у последующих заболевших уже могла проводиться на основании клинико-эпидемиологических данных.

Данные проведенного лабораторного исследования свидетельствуют о том, что случаи кори и краснухи в настоящее время у привитых детей практически не возникают, а регистрируются преимущественно у взрослых лиц. В условиях крайне низкой заболеваемости корью

и краснухой основную долю экзантемных инфекций в стране как среди детей, так и взрослых составляет парвовирусная инфекция. Кроме того она имеет наибольшее клиническое сходство с краснухой и наиболее часто подтверждается лабораторно у больных с предварительным клиническим диагнозом краснуха [7]. С учетом этого, при выявлении заболевания с макуло-папулезной сыпью, кроме обязательного обследования на корь и краснуху, необходимо в первую очередь исключить парвовирусную инфекцию. В целом, поскольку все пять изученных инфекций (корь, краснуха, парво-, адено-, энтеровирусная инфекции) диагностируются как у детей, так и у взрослых без четкой сезонности заболеваемости, необходимо постоянно сохранять настороженность практических врачей в отношении каждой из них.

#### Литература

1. Causes of morbilliform rash in a highly immunised English population / M. Ramsay [et al.] // Arch. Dis. Child. 2002. – Vol. 87 – P. 202-206.
2. An erythema infectiosum-like illness caused by human parvovirus infection / F.A Plummer [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1985 – Vol. 313. – P. 74-79.
3. Etiology of measles- and rubella-like illnesses in measles, mumps, and rubella-vaccinated children / I. Davidkin [et al.] // J. Infect. Dis. – 1998. – Vol. 178. – P. 1567-1570.
4. Мониторинг выполнения международных программ эрадикации полиомиелита и элиминации кори и краснухи в Республике Беларусь / Е.О. Самойлович [и др.] // Журн. микробиол. – 2012. – №. 1. – С. 21-30.
5. Surveillance guidelines for measles, rubella and congenital rubella syndrome in the WHO European region. – Copenhagen: WHO regional Office for Europe, 2010.
6. Nicolay, N. Clinical and epidemiological aspects of parvovirus B19 infections in Ireland, January 1996-June 2008 / N. Nicolay, S. Cotter // Eurosurveill. – 2009. – Vol. 14, № 4-6. – P. 290-294.
7. Broliden, K. Clinical aspects of parvovirus B19 infection / K. Broliden, T. Tolfvenstam, O. Norbeck // J. Intern. Med. – 2006 – Vol. 260. – P. 285-304.

Поступила 13.09.2012

## LABORATORY DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ACUTE EXANTEMATOUS INFECTIONS IN BELARUS

Yermalovich M.A.

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

Serological investigation of measles/rubella like illness in Belarus in 2011 was done. From 390 patients in 204 (52,3%) specific IgM antibodies to five tested infections were found, including 82 (21,0%) to parvovirus B19, 51 (13,1%) to measles, 20 (5,1%) to rubella, 33 (8,5%) to adenovirus and 18 (4,6%) to enterovirus. All infections were confirmed both in children and adults without clear seasonality. Vaccine preventable diseases measles and rubella were statistically more frequent in adults than in children.

**Keywords:** exantematous infections, laboratory diagnosis, ELISA, specific antibodies.

## ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ ВЯЛЫХ ПАРАЛИЧЕЙ С ВЫДЕЛЕНИЕМ ВАКЦИННОГО ПОЛИОВИРУСА

Самойлович Е.О.<sup>1</sup>, Ясинская Л.И.<sup>2</sup>, Шанько Г.Г.<sup>3</sup>,  
Ермолович М.А.<sup>1</sup>, Свирчевская Е.Ю.<sup>1</sup>, Астапов А.А.<sup>2</sup>,  
Булдык Е.А.<sup>2</sup>, Лисицкая Т.И.<sup>2</sup>, Збаровский Д.К.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;

<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет;

<sup>3</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

**Резюме.** В Беларуси основу надзора за полиомиелитом составляет выявление и расследование случаев острого вялого паралича (ОВП) у детей до 15 лет. В 2012 г. при вирусологическом исследовании образцов стула у двух детей с ОВП был выделен вакцинный полиовирус серотипа 3. В обоих случаях неврологические нарушения

развились после вакцинации живой оральной полиовакциной, которой предшествовали три дозы инактивированной и одна доза оральной вакцины. Оба ребенка имели защитные титры антител ко всем трем серотипам полиовируса. В одном случае дополнительное обследование выявило наличие объемного образования головного мозга, и при динамическом неврологическом наблюдении полиомиелитная природа паралича была исключена. У другого ребенка развитие ОВП совпало с возникновением острого лимфобластного лейкоза, и для исключения вакциноассоциированного полиомиелита требуется дальнейшее наблюдение. В работе обсуждаются трудности дифференциальной диагностики ОВП полиомиелитной и неполиомиелитной природы на современном этапе.

**Ключевые слова:** острый вялый паралич, полиомиелит, вакцина, дифференциальная диагностика.

**Введение.** Сложный клинический синдром, носящий название острый вялый паралич (ОВП), может иметь множество причин развития. Надзор за заболеваниями, протекающими с синдромом ОВП, имеет большое значение для общественного здравоохранения, поскольку позволяет выявить случаи паралитического полиомиелита, вызванные как диким, так и вакцинным полиовирусом, и является одним из основных компонентов надзора за полиомиелитом в контексте глобальной ликвидации этого заболевания.

В результате проводимого надзора за заболеваниями с синдромом ОВП в мире ежегодно выявляется 0,5–1,5 тысячи больных паралитическим полиомиелитом в эндемичных странах, а также неэндемичных странах, реинфицированных диким полиовирусом в результате его завоза. Кроме того, результатом надзора за заболеваниями с синдромом ОВП стало обнаружение случаев паралитического полиомиелита, обусловленных циркулирующей так называемых vaccine-derived polioviruses (VDPV) — полиовирусом вакцинного происхождения в значительной степени (более 1% в VP1 области генома) дивергировавших от их прародителей — вакцинных вирусов Себина, и отличающихся высоким уровнем трансмиссивности и нейровирулентности [1].

Надзор за заболеваниями с синдромом ОВП в соответствии с программой Европейского бюро ВОЗ проводится в Беларуси с 1996 г. В течение 16 лет (1996–2011 гг.) выявлено и вирусологически обследовано 729 детей с синдромом ОВП. У 12 из них заболевание классифицировано как вакциноассоциированный паралитический полиомиелит (ВАПП). Одиннадцать случаев ВАПП были выявлены в период 1996–2001 г., когда для вакцинации против полиомиелита использовалась живая оральная вакцина. Риск развития ВАПП составил один случай на 811 000 использованных доз оральной вакцины и был наиболее высоким для реципиентов первой дозы — 1 случай на 96000 доз [2]. С целью предупреждения развития ВАПП в начале 2000 г. в стране была введена комбинированная схема иммунизации, предусматривающая первичную иммунизацию инактивированной вакциной с последующей ревакцинацией живой вакциной. Переход на комбинированную схему вакцинации существенно снизил заболеваемость ВАПП. В течение 2002–2011 гг. был выявлен единственный случай ВАПП у ребенка с первичным В-клеточным иммунодефицитом. Выделенный от этого ребенка полиовирус серотипа 2 относился к категории VDPV [3].

**Цель исследования:** клинико-лабораторное обследование случаев заболеваний у детей до 15 лет, сопровождающихся развитием синдрома ОВП, в 2012 г.

**Материалы и методы.** Всего за период январь–август 2012 г. в Республике Беларусь было выявлено 28 детей с синдромом ОВП. По 2 пробы стула от каждого ребенка были направлены на исследование в Национальный референс-центр по полиомиелиту (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии).

Выделение ПВ из исследуемых образцов выполняли с использованием трех культур клеток: L20В (генетически модифицированная линия мышечных клеток, экспрессирующая человеческий рецептор к ПВ), RD и Нер2С.

Идентификацию изолированных полиовирусов (ПВ) выполняли в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к ПВ трех серотипов (ПВ1, ПВ2 и ПВ3, соответственно) производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН РФ, в культуре клеток Нер2С, согласно рекомендациям ВОЗ [4].

В соответствии с рекомендациями ВОЗ, все изолированные от детей с ОВП ПВ в трехдневный срок были направлены в Региональную референс-лабораторию по полиомиелиту (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, г. Москва) для внутритиповой дифференциации (определение происхождения вируса — дикий или вакцинный) и детального молекулярно-генетического изучения.

Специфический иммунитет к полиомиелиту определяли в реакции нейтрализации в культуре клеток Нер2С с референс-штаммами вакцинных полиовирусов 1, 2 и 3 серотипов. В соответствии с рекомендациями ВОЗ, в качестве защитного титра антител рассматривали 1:8 [4].

**Результаты и их обсуждение.** В течение января–июля 2012 г. заболевания с синдромом ОВП были зарегистрированы во всех областях Республики Беларусь, за исключением Гомельской: Брестская — 6, Витебская — 4, Гродненская — 2, г. Минск — 4, Минская — 8, Могилевская — 4. От всех 28 заболевших собраны по две пробы стула и своевременно (в течение 72 часов) доставлены в Национальный референс-центр по полиомиелиту.

При проведении исследования в культурах клеток ПВ были изолированы от двух детей. От ребенка Ж.Д. в возрасте 2 года 1 месяц с диагнозом нейропатия правого малоберцового нерва из двух проб стула был изолирован ПВ3. Нейропатия развилась через 26 дней после вакцинации живой оральной полиовакциной, которой предшествовали три дозы инактивированной и одна доза живой вакцины. От ребенка С.С. в возрасте 2 года 2 месяца с диагнозом нижний парапарез ПВ3 был изолирован из одной пробы стула. У данного ребенка парез развился также после получения второй дозы оральной вакцины, чему предшествовало введение трех доз инактивированной и одной дозы оральной вакцины.

Исследование сывороток крови выявило у обоих детей наличие антител в защитном титре к ПВ всех трех серотипов. У ребенка Ж.Д. специфические антитела ко всем серотипам определялись в высоком титре: 1:384 к ПВ1, 1:256 к ПВ2 и 1:4096 к ПВ3. У ребенка С.С. титры антител были существенно более низкими (1:64, 1:32 и 1:32, соответственно), но, тем не менее, защитный уровень ко всем трем серотипам ПВ был достигнут. Наличие специфических антител и результаты изучения общего иммунного статуса свидетельствовали об отсутствии у обоих детей первичного В-клеточного иммунодефицита.

Выполненное в Региональной референс-лаборатории молекулярно-генетическое изучение выделенных ПВ показало, что все они являлись вакцинными.

Как известно, выделение из проб стула больного с клиникой полиомиелита вакцинного ПВ является одним из критериев (но не единственным критерием) ВАПП. Однако любой ребенок после вакцинации оральной вакциной в течение определенного времени (в ответ на введение первой дозы вакцины — до двух месяцев, последующих доз — более короткий срок) выделяет вирус в окружающую среду. Острый паралич, обусловленный другой причиной, может совпасть по времени с недавно проведенной вакцинацией и выделением ПВ из проб стула. Поэтому диагностика ВАПП должна быть комплексной и основываться на клинических и эпидемиологических данных и результатах вирусологического обследования ребенка.

По клинической картине выявленные у обоих детей при обращении за медицинской помощью параличи имели сходную картину с параличами полиомиелитной этиологии.

У ребенка Ж.Д. заболевание началось внезапно на фоне полного здоровья, когда утром после сна появилась хромота, а затем «шлепанье» стопой. При обращении к врачу зарегистрирована нейропатия малоберцового нерва, по поводу которой ребенок

получал лечение. Однако отсутствие положительного эффекта от проводимой терапии, нарастание двигательных нарушений в ноге, раннее формирование контрактуры в голеностопном суставе послужило толчком для дальнейшего детального обследования ребенка. Через 1,5 месяца после развития пареза у ребенка отмечалась паретическая походка с прогибанием и рекурвацией колена, свисанием стопы, ротацией стопы кнаружи и ее «шлепаньем», тугоподвижностью в голеностопном суставе. Однако на фоне мышечной гипотонии сохранялись все сухожильно-надкостничные рефлексы, причем на пораженной ноге коленный рефлекс был выше, чем на здоровой, и выявлялся рефлекс Бабинского, что свидетельствовало о вовлечении в патологический процесс центрального нейрона пирамидного тракта. ЭМГ-исследование признаков поражения периферического нейрона не зарегистрировало. При проведении МРТ головного мозга было выявлено объемное образование левой теменной области. Осмотр ребенка через 90 дней от начала паралича (временной интервал, рекомендованный в диагностике ВАПП для очередного неврологического осмотра ребенка и принятия окончательного решения о наличии и характере паралича) позволил выявить остаточные параличи, однако по клинической симптоматике они являлись нехарактерными для полиомиелита (поражение приобрело характер спастического паралича с повышенными рефлексами; в патологический процесс стала вовлекаться и рука). Таким образом, результаты осмотра ребенка свидетельствовали о том, что причиной ОВП явилось объемное образование левой теменной доли. Диагноз ВАПП был исключен, а случай классифицирован как ОВП неполиомиелитной этиологии.

У ребенка С.С. вакцинация ОПВ с последующим развитием пареза совпала с начальной стадией острого лимфобластного лейкоза. Началу заболевания предшествовала острая вирусная инфекция в виде отита. На 5-е сутки от момента вакцинации утром на фоне нормальной температуры и удовлетворительного общего самочувствия ребенок стал прихрамывать, чему родители не сразу придали значение. Однако в течение недели состояние ребенка ухудшалось, он отказывался самостоятельно садиться и ходить. Был диагностирован нижний вялый парапарез на фоне выраженных гематологических изменений (тромбоцитопении, анемии, резкого снижения нейтрофилов, появления бластов, увеличения СОЭ). После проведения костномозговой пункции был выставлен диагноз острого лимфобластного лейкоза. При осмотре на 50-й день от начала паралича у ребенка сохранялся нижний вялый парапарез, больше выраженный слева, с преимущественным поражением проксимальных отделов ног. Отмечалась тенденция к формированию гипотрофии мышц левого бедра и ягодицы с тугоподвижностью в голеностопном суставе. На основании приведенных данных диагноз ВАПП не мог быть исключен, однако окончательное заключение может быть сделано по истечении 90 дней от начала заболевания.

Как видно, в обоих случаях были трудности в дифференциальной диагностике параличей, так как у обоих пациентов они выявлялись на фоне тяжелых конкурирующих состояний. С одной стороны, нельзя исключить активацию основного заболевания на фоне попадания в организм вакцинного полиовируса, с другой стороны — возникновение соответствующей клиники вялого паралича может быть следствием воздействия вакцинного полиовируса на клетки передних рогов спинного мозга. Поэтому в обоих случаях мы не можем исключить влияние полиовируса на время дебюта и течение основного заболевания. Однако на современном этапе течение ВАПП не является столь классическим, и некоторыми исследователями уже подчеркивается, что топической сущностью ВАПП является поражение не только передних рогов спинного мозга, но и проводящих путей, корешков, что позволяет трактовать заболевание как миелополирадикулит [5]. Кроме того, нельзя забывать, что могут быть случаи острого паралитического полиомиелита другой и неуточненной этиологии, что отражено в «Международной классификации болезней» 10-го пересмотра (А.80.3), хотя

практически такой диагноз выставляется редко. По данным литературы, полиомиелиты вирусной этиологии преобладают над бактериальными, и значимой является энтеровирусная, гриппозная и иерсиниозная природа заболевания [5, 6].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что диагностика ВАПП представляет большие трудности и требует вовлечения специалистов различного профиля. Как известно, это осложнение при использовании оральной полиовакцины наблюдается редко (по данным литературы, 1 случай 1–3 миллиона доз вакцины). Развитие ВАПП у ребенка с отсутствием иммунодефицита, ранее привитого инактивированной полиомиелитной вакциной, после последующего введения живой оральной вакцины в литературе не описано. Однако следует учитывать, что число стран, применяющих комбинированную схему иммунизации невелико (как правило, эта схема является переходной, после чего используется только инактивированная вакцина). Кроме того, чтобы детально разобраться с такими случаями, несомненно, требуется хорошая организация надзора за заболеваниями с синдромом ОВП с сильными как клиническим, так и лабораторным (вирусологическим, молекулярно-генетическим) компонентами.

Надзор за ОВП в Беларуси проводится на высоком уровне и полностью соответствует всем критериям ВОЗ. Опыт надзора за полиомиелитом и полиомиелитоподобными заболеваниями, накопленный ранее в нашей стране, используется и другими странами. В сложившейся ситуации, при многолетнем применении комбинированной схемы иммунизации в Беларуси также происходит накопление результатов надзора за ОВП и их тщательный клинико-эпидемиологический и вирусологический анализ. Как показывают результаты надзора, при применении комбинированной схемы вакцинации частота выделения ПВ от детей с ОВП уменьшилась практически вдвое в сравнении с применением только оральной вакцины (с 9,47% в 1996–2001 гг. до 4,33% в 2002–2011 гг.,  $p \leq 0,05$ ), при этом интенсивность циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов не увеличилась [7]. Однако до тех пор, пока будет применяться живая оральная вакцина, вероятность выделения вакцинных полиовирусов из различных источников будет существовать. При этом для здоровых детей встреча с этим вирусом (проведенная вакцинация либо инфицирование контактным путем) не представляет никакой опасности. Это подтверждает многолетний опыт применения оральной вакцины во многих странах мира. Для детей с первичными В-клеточными иммунодефицитами встреча с вакцинным полиовирусом несет реальную опасность и может привести к развитию ВАПП. С нашей точки зрения, нельзя исключить и вероятность влияния этого вируса и на здоровье ребенка, не имеющего первичного иммунодефицита, однако находящегося во время встречи с вакцинным ПВ в продромальном периоде или доклинической стадии другого тяжелого заболевания, которое еще не диагностировано. Именно такие случаи ОВП и представляют особую сложность в дифференциальной диагностике (полиомиелитная или неполиомиелитная этиология) и требуют особого внимания.

#### Литература

1. Circulation vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge / O.M. Kew [et al.] // Bull. WHO. – 2004. – Vol. 82, № 1. – P.16-23.
2. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis and other diseases with acute flaccid paralysis syndrome in Belarus / E.O. Samoilovich [et al.] // Centr. Europ. J. Pub. Health. – 2003. – Vol. 11, N 4. – P. 213-218.
3. Evolution of the Sabin vaccine into pathogenic derivatives without appreciable changes in antigenic properties: need for the improvement of current poliovirus surveillance / M.L. Yakovenko [et al.] // J. Virology. – 2009. – Vol. 83, № 7. – P. 3402-3406.
4. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. Женева: ВОЗ, 2005. 112 с.
5. Скрипченко, Н.В. Инфекционные заболевания периферической нервной системы у детей: руководство для врачей / Н.В. Скрипченко, В.Н. Команцев. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2006. – 560 с.
6. Острые вялые параличи у детей в современных условиях / Н.В. Скрипченко [и др.] // Рос. вест. перинатол. педиат. – № 3. – 1999. – С. 31-35.
7. Выделяемость вакцинных полиовирусов и неполиомиелитных кишечных вирусов от детей при различных схемах иммунизации против полиомиелита / И.Ф. Ухова [и др.] // Здоровоохранение. – 2009. – № 12. – С. 16-19.

Поступила 23.08.2012

## DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ACUTE FLACID PARALYSES WITH EXCRETION OF VACCINE POLIOVIRUS

<sup>1</sup>Samoilovich E.O., <sup>2</sup>Yasinskaya L.I., <sup>3</sup>Shanko G.G., <sup>1</sup>Yermalovich M.A., <sup>1</sup>Svirchevskaya E.Y.,  
<sup>2</sup>Astapov A.A., <sup>2</sup>Buldyk E.A., <sup>2</sup>Lisitskaya T.I., <sup>2</sup>Zbarovski D.K.

<sup>1</sup>Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

<sup>2</sup>Belarus State Medical University, Minsk, Belarus

<sup>3</sup>Belarus Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Belarus

Surveillance on poliomyelitis in Belarus is based on the revealing and investigation of cases of acute flaccid paralysis (AFP) in children under 15 years old. In 2012 there were two patients with AFP who excreted vaccine polioviruses type 3. In both cases neurological symptoms appeared after the fifth vaccination with live oral polio vaccine that was done after three doses of inactivated and one dose of oral polio vaccine got in previous. Both children had protective titer of neutralizing antibodies to all three types of polioviruses. In the first case a space-occupying lesion of the brain was found and according to the later neurological feature the poliomyelitis origin of AFP was excluded. In the second case the AFP appeared simultaneously with the first manifestation of acute lymphoblast leucosis and needs further neurological observation to exclude vaccine-associated poliomyelitis. Difficulties in differential diagnosis of acute flaccid paralyzes are discussed.

**Keywords:** acute flaccid paralysis, vaccine polioviruses, differential diagnosis.

## КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА И ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ

Самойлович Е.О.<sup>1</sup>, Германенко И.Г.<sup>2</sup>, Шиманович В.П.<sup>3</sup>, Семейко Г.В.<sup>1</sup>,  
Сvirchevская Е.Ю.<sup>1</sup>, Ермолович М.А.<sup>1</sup>, Лисицкая Т.И.<sup>2</sup>, Ластовка А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;

<sup>2</sup>Городская детская инфекционная клиническая больница;

<sup>3</sup>Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь

**Резюме.** В течение 2011–2012 гг. (7 мес.) в Городскую детскую инфекционную клиническую больницу г. Минска обратилось 47 детей с подозрением на эпидемический паротит, из них 27 (57,4%) были госпитализированы. Проведенное лабораторное обследование (IgM антитела, ПЦР, выделение вируса в культуре клеток) подтвердило диагноз у 7 из 47 (14,9%) детей, обратившихся за медицинской помощью, и у 5 из 27 (18,5%) госпитализированных детей. У 4 детей заболевание имело временную связь с вакцинацией, от одного из них в культуре клеток изолирован вакцинный штамм вируса паротита Ленинград–Загреб. Три других лабораторно подтвержденных случая, вероятно, вызваны диким вирусом паротита. В целях установления происхождения выявленных случаев (местный или завозной) особое внимание должно быть уделено вирусологической диагностике (ПЦР, выделение вируса) и генотипированию выявленных вирусов. В целях улучшения этиологической диагностики заболеваний слюнных желез также необходимо проведение лабораторных исследований на другие возбудители, способные поражать железистые ткани.

**Ключевые слова:** эпидемический паротит, вирус паротита, лабораторная диагностика.

**Введение.** В довакцинальный период и период применения однодозовой схемы иммунизации заболеваемость эпидемическим паротитом (эпидпаротитом) в Республике Беларусь была достаточно высокой. Среднегодовалый показатель заболеваемости за 1954–1979 гг. составил 269,5 на 100 000 населения (колебался от 108,0 до 499,6 на 100 000), за 1980–1999 гг. — 173,3 (колебался от 54,7 до 390,2 на 100000). Применение, начиная с 2000 г. комбинированной вакцины корь-паротит-краснуха (вакцина КПК) по двухдозовой

схеме существенно снизило заболеваемость и, начиная с 2006 г. ее показатель уже составлял не более 5 на 100000 населения, а начиная с 2010 г. он составляет менее 1 на 100000 [1]. Доля детского населения до 15 лет среди заболевших уменьшилась с 85% в 1995 г. до 28,1% в 2011 г. В последние годы в основном регистрируются не связанные между собой спорадические случаи заболевания. В условиях низкой заболеваемости возрастает роль специфической лабораторной диагностики инфекции, позволяющей дифференцировать воспаление слюнных желез, вызванные вирусом паротита, от сходных по клинической картине заболеваний.

**Цель исследования:** клинико-лабораторное обследование детей, госпитализированных в учреждение здравоохранения «Городскую детскую инфекционную клиническую больницу» (УЗ ГДИКБ) г. Минска с подозрением на эпидпаротит.

**Материалы и методы.** В течение 2011–2012 гг. под наблюдением в УЗ ГДИКБ г. Минска находились 47 детей в возрасте от 1 до 17 лет с подозрением на эпидпаротит. В целях верификации диагноза клинический материал (сыворотка крови, носоглоточный смыв, моча) от этих детей был направлен в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии на лабораторное исследование.

В соответствии с рекомендациями CDC как подозрительные на эпидпаротит рассматривались дети с острым проявлением одно- или двустороннего воспаления околоушных или других слюнных желез, развившимися без других видимых причин [2].

Критерии лабораторного подтверждения были следующими:

- выявление IgM антител к вирусу паротита в сыворотке крови,
- определение РНК вируса паротита в клинических образцах (НГС или моча) методом ПЦР,
- изоляция вируса паротита в культуре клеток Vero в клинических образцах с последующей идентификацией методом ПЦР.

Полученный положительный результат по крайней мере в одном из методов считался лабораторным подтверждением эпидпаротита.

Выявление IgM антител к вирусу паротита было проведено с использованием иммуноферментных тест-систем Serion ELISA classic Mumps IgM с абсорбентом ревматоидного фактора (Virion\Serion, Germany).

Изоляция вируса паротита была выполнена путем инокуляции образцов НГС и мочи в клетки Vero и культивированием до 7 дней при температуре 37 °С. Цитопатический эффект (ЦПЭ) мог не появиться или быть очень незначительным [3], поэтому независимо от появления ЦПЭ супернатант культуры клеток собирали и использовали для выделения РНК.

Выделение вирусной РНК из НГС, мочи и культуральной жидкости проводили, используя QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) или 5 MagMAX — 96 Viral Isolation Kit (Ambion, USA) с автоматизированным экстрактором MagMAX Express (Applied Biosystems, USA) согласно протоколу производителя.

Обнаружение РНК вируса паротита выполняли методом ПЦР со специфическими праймерами к SH гену. Обратную транскрипцию и первый раунд ПЦР выполняли с использованием наборов QIAGEN OneStep RT-PCR (QIAGEN, Germany) в объеме 25 µl с праймерами MuV-1f (5'- TCAACACAATATCAAGTA-3', 6119-6139) и MuV-1r (5'-TTCTGTGTTGTATTGTGA-3', 6556-6573). Условия постановки реакции были следующими: начальная денатурация при 94°C в течение 5 мин только с праймерами с последующим 50°C в течение 30 мин, 95°C в течение 15 мин, с последующими 40 раундами — 94°C в течение 30 с, 50°C — 30 с, 72°C — 1 мин, с последующей финальной элонгацией при 72°C в течение 5 мин. Второй раунд ПЦР был выполнен в объеме 25 µl, который включал 0,8 µM праймеров MuVf (5'- ATGATCTCATCAGGTAC-3', 6143-6159) и MuVr (5'- TCCTAAGTTTGTCTGG-3', 6539-6555), 1X Standard PCR Buffer, 1,8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM

dNTPs, 0,5 U Taq DNA Polymerase (NEB, UK) и 1 µl продукта из первого раунда ПЦР. Условиями раунда были: 94°C в течение 1,5 мин, с последующими 30 циклами при 94°C в течение 30 с, 55°C — 30 с, 72°C — 1 мин, и финальной элонгацией при 72 °C — 5 мин. ПЦР были выполнены в Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany). Продукт амплификации анализировали в 1,5% агарозном геле, окрашенном GelStar Gel Stain (Lonza, USA) с использованием электрофорезного буфера 1x TAE.

Аmplифицированный в ПЦР продукт был вырезан из геля, очищен с использованием набора QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) и секвенирован в обоих направлениях с использованием BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) на капиллярном секвенаторе (Model 3100 Avant, Applied Biosystems, USA), используя ПЦР праймеры в качестве сиквенс-праймеров.

Нуклеотидные последовательности были выровнены и проанализированы с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с имеющимися в GenBank было выполнено с помощью BLAST сервера (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Результаты и их обсуждение.** За период 2011–2012 гг. (7 мес.) в УЗ ГДИКБ г. Минска обратилось 47 детей с подозрением на эпидемический паротит, из них 27 (57,4%) были госпитализированы.

Среди госпитализированных детей в возрастной структуре преобладали пациенты школьного (6 лет и старше) возраста — 66,7%, дети до 2 лет и 2–5 лет составляли 11,1% и 22,2% соответственно. В первые сутки болезненных проявлений поступило 37% пациентов. В большинстве случаев (62,5%) поражение околоушной слюнной железы было односторонним, в 33,3% случаев наблюдалось комбинированное поражение околоушной и подчелюстной слюнной железы, у 1 ребенка выявлено изолированное поражение подчелюстной железы.

Заболевание у 33% детей сопровождалось повышением температуры тела до 38-39°C, у 38% детей температура тела повышалась до субфебрильной, в 29% случаев на протяжении всей болезни температура тела не повышалась. Длительность лихорадки составляла  $1,6 \pm 1,7$  дня.

У большинства детей были отмечены катаральные явления (ринит у 33%, фарингит у 50%, тонзиллит с налетами у 17%), у 12,5% наблюдалась сыпь, в 8% случаев были обнаружены афты на слизистой полости рта. Эти данные могут свидетельствовать о том, что воспаление слюнных желез носило реактивный характер, что характерно для многих инфекций, вызванных тропным к лимфоидной и/или железистой ткани возбудителем, среди которых вирусы паротита, герпеса, парагриппа, а также некоторые бактерии (например, листерии). Патогномичный для эпидпаротита симптом Мурсона наблюдался только у 5 детей, и у 1 ребенка — болезненность в точках Филатова.

Параметры гемограммы у 27,7% заболевших находились в пределах возрастной нормы, в то же время у 59,2% пациентов отмечался умеренный лейкоцитоз, в 12,8% случаев выявлен нейтрофилез со сдвигом формулы влево, а характерный для эпидемического паротита лимфоцитоз был выявлен лишь в одном наблюдении.

Исследования биохимических параметров показали, что в большинстве наблюдений (91,5%) уровни  $\alpha$ -амилазы крови и диастазы мочи были повышены. В группе с воспалением желез неуточненной этиологии в среднем  $\alpha$ -амилаза и диастаза в 5 раз превышали норму,  $\alpha$ -амилаза возвращалась к физиологическим значениям только через 10 дней. У 2 пациентов с эпидемическим паротитом превышение возрастных норм по  $\alpha$ -амилазе и диастазе составляло 7–12 раз.

Проведенное ультразвуковое исследование слюнных желез и регионарных лимфоузлов патогномичных морфологических признаков воспалительного характера в большинстве

случаев (74,9%) не выявило, что также подтверждает вероятный реактивный характер изменений.

Проведенное с целью верификации диагноза эпидпаротит в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии обследование 47 детей, обратившихся в УЗ ГДИКБ г. Минска, подтвердило предполагаемый диагноз в 7 случаях: 4 случая подтверждены выявлением специфических IgM антител, 1 случай — выявлением РНК вируса в ПЦР, в двух случаях были выявлены и специфические IgM антитела к вирусу паротита и РНК вируса.

Среди 7 лабораторно подтвержденных случаев эпидпаротита 4 имели временную связь с вакцинацией. Два из них развились у детей 1 года на 16 и 19 день после введения первой дозы вакцины, два других — у детей 6 лет на 13 и 21 день после введения второй дозы вакцины. Все 4 вакцино-ассоциированных случая паротита протекали легко. Повышения температуры тела не отмечалось или температура тела была субфебрильной. Во всех 4 случаях показатели гемограммы находились в пределах нормальных значений. У 2 пациентов сохранялись нормальные уровни ферментов и у 2 детей обнаружено их повышение на 50–75%, которое быстро вернулось к норме.

От одного ребенка с вакцино-ассоциированным паротитом в культуре клеток был выделен вирус паротита и выполнено секвенирование SH гена. Результаты секвенирования подтвердили, что выделенный вирус является вакцинным штаммом Ленинград–Загреб. Именно этот вакцинный штамм входит в состав применяемой в настоящее время в Республике Беларусь вакцины КПК производства Индии.

Особый интерес представляют 3 лабораторно подтвержденные случаи эпидпаротита, не связанные по времени с вакцинацией. Вероятнее всего они вызваны циркулирующим диким вирусом паротита. Исследование этого вируса молекулярными методами позволило бы определить его происхождение. Лабораторное подтверждение двух из этих случаев было получено на основании выявления IgM антител, один подтвержден с помощью ПЦР. Попытки секвенировать ПЦР-продукт к успеху не привели (из-за низкой его концентрации), поэтому происхождение вируса осталось неустановленным. Двое из этих детей были госпитализированы в стационар. У одного из них (двукратно привитой ребенок 10 лет) отмечалась легкая клиническая картина с односторонним поражением околоушной слюнной железы. Температура тела поднималась до субфебрильной. Наличие воспаления слюнной железы было подтверждено ультразвуковым исследованием. У ребенка существенно (в 5–6 раз) были увеличены показатели  $\alpha$ -амилазы и диастазы. Отмечалось также увеличение СРБ. У другого (однократно привитой ребенок 4 лет) наблюдалась типичная для эпидпаротита клиническая картина средней степени тяжести: температура тела 38 °С, отечность в области околоушных и подчелюстных слюнных желез, боль при движении челюстью. Увеличение желез также было подтверждено инструментально. Отмечался лейкоцитоз, а также двукратное увеличение  $\alpha$ -амилазы и диастазы.

**Заключение.** Таким образом, как показали результаты клинико-лабораторных исследований, несмотря на клинико-биохимические маркеры поражения железистых органов, в подавляющем большинстве заболеваний слюнных желез не были вызваны вирусом паротита. Только в 7 из 47 обследованных случаев вирус паротита являлся этиологическим агентом заболевания. При этом в 4 случаях заболевание было связано с недавно проведенной вакцинацией и обусловлено размножением живого вакцинного вируса в организме ребенка.

Как известно, в последние годы в ряде стран регистрируются вспышки эпидпаротита среди старших школьников и студентов [4, 5]. Данные надзора за эпидпаротитом в Республике Беларусь, в частности, проведенный нами анализ случаев воспаления слюнных желез у госпитализированных детей показывает, что ситуация по этой инфекции в Республике Беларусь находится под контролем вакцинации. Как показали клинико-лабораторные данные, в подавляющем большинстве заболеваний слюнных желез не были вызваны циркулирующим

диким вирусом паротита. Единичные случаи заболевания были обусловлены недавно проведенной вакцинацией. К сожалению, при использовании живых вакцин такие случаи возможны и встречаются везде в мире. В трех лабораторно-подтвержденных случаях эпидпаротита происхождение заболевания осталось не установленным. В целях установления происхождения зарегистрированных случаев (местный или завозной) наряду с тщательным эпидемиологическим расследованием особое внимание должно быть уделено вирусологической диагностике (ПЦР, выделение вируса в культуре клеток) с генотипированием каждого выявленного вируса. Для вирусологической диагностики чрезвычайно важным является правильность и своевременность забора клинического материала для исследования, а также строгое соблюдение сроков его доставки в лабораторию. Для более детальной расшифровки случаев заболеваний, не связанных с вирусом паротита, необходимо проведение лабораторного исследования на другие возбудители, способные поражать железистые ткани.

#### Литература

1. Шиманович, В.П. Влияние иммунизации на заболеваемость эпидемическим паротитом / В.П. Шиманович, Е.О. Самойлович // *Здравоохранение*. – 2011. – № 12. – С. 47-50.
2. Brief report: update: mumps activity—United States, January 1–October 7, 2006 // *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* – 2006. – Vol. 55. – P. 1152-1153.
3. Waner, J.J. Mumps and parainfluenza virus / J.J. Waner, E.M. Swierkosz // *Manual of Clinical Microbiology: 8th ed.* / eds.: P.M. Murray [et al.]. – Washington: ASM Press; 2003. – P. 1368-1377.
4. Mumps outbreak in a highly vaccinated student population, the Netherlands, 2004 / H.J. Brockhoff [et al.] // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – P. 2932-2936.
5. Mumps outbreak at a summer camp – New York, 2005 / Centers for Disease Control, Prevention // *MMWR Morb. Mortal. Weekly Rep.* – 2006. – Vol. 55, N 7. – P. 175-177.

Поступила 13.09.2012

## CLINICAL AND LABORATORY DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF MUMPS AND OTHER SALIVARY GLANDS DISEASES

**Samoilovich E.O.<sup>1</sup>, Germanenka I.G.<sup>2</sup>, Shimanovich V.P.<sup>3</sup>, Semeiko G.V.<sup>1</sup>,  
Svirchevskaya E.J.<sup>1</sup>, Yermalovich M.A.<sup>1</sup>, Lisitskaya T.I.<sup>2</sup>, Lastovka A.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*

<sup>2</sup>*Municipal Infectious Diseases Hospital for Children;*

<sup>3</sup>*Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus*

For the period of 2011–2012 (7 months) 47 suspected mumps cases among children who have sought medical care in Minsk City Infectious Diseases Hospital for Children were laboratory examined (mumps specific IgM, PCR, virus isolation). Only 7 of 47 cases were laboratory confirmed. Four of them have temporarily link with MMR vaccination; from one of them vaccine mumps strain Leningrad–Zagreb was isolated. Three other cases probably were caused by wild mumps virus. To understand the origin of mumps virus and differentiate local and imported mumps cases more thorough virological examination and genotyping of viruses is needed. To improve the etiological diagnosis of salivary glands diseases it is necessary to conduct the laboratory investigations on other pathogens capable to affect the glandular tissues.

**Keywords:** mumps infection, mumps virus, laboratory diagnosis.

# УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭПИТЕЛИЯ ШЕЙКИ МАТКИ ПАЦИЕНТОК, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСАМИ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 И 18 ТИПОВ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ МЕТОДОМ КОНТАКТНОЙ ТЕРМОЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ

Манькин А.А.<sup>1</sup>, Ежов В.В.<sup>2</sup>, Данилейко Ю.К.<sup>3</sup>, Салюк В.А.<sup>3</sup>,  
Дымковец В.П.<sup>2</sup>, Гущина Е.А.<sup>1</sup>, Лисицын Ф.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития;

<sup>2</sup>Городская клиническая больница № 52;

<sup>3</sup>Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

**Резюме.** Представлены результаты исследования ультраструктуры эпителия шейки матки пациенток, инфицируемых вирусом папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 типов до и после лечения методом контактной термолазерной терапии (КТЛТ). Показано, что после лечения, спустя 1,5 и 6 месяцев в биоптате и мазке из цервикального канала не определяется ДНК ВПЧ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В ультратонких срезах структура эпителиальных клеток из биоптата после лечения соответствует той, которую наблюдают в норме.

**Ключевые слова:** вирус папилломы человека, метод контактной термолазерной терапии, эпителий шейки матки, электронная микроскопия.

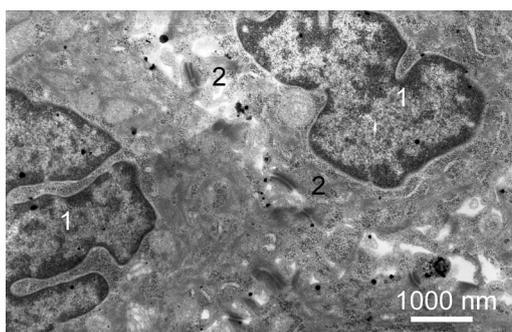
**Введение.** Рак шейки матки остается одной из самых актуальных проблем гинекологии. Заболеваемость этим видом патологии неуклонно растет и составляет приблизительно 30% от всех гинекологических заболеваний. В настоящее время доказана связь возникновения рака шейки матки с наличием у больных папилломавирусной инфекции высокого онкогенного риска. Существующие методы лечения патологии шейки матки имеют свои преимущества и недостатки. Ранее нами был предложен принципиально новый метод деструктивного воздействия на очаги поражения с одновременной стимуляцией противовирусного иммунного отклика на это воздействие, что позволяет целенаправленно, а значит более успешно лечить больных с папилломавирусной инфекцией высокого онкогенного риска и проводить целенаправленную профилактику рака шейки матки [1]. Для лечения ВПЧ-инфицированной поверхности шейки матки нами был предложен метод КТЛТ [2]. Новизна метода заключается в воздействии на инфицированную вирусом оболочку шейки матки кратковременного взрывного теплового воздействия. Существенное и принципиальное отличие метода от известных и используемых в гинекологии, является применение лазерного излучения, исключая повреждение биотканей при их непосредственном облучении. При этом лечебный эффект достигается за счет нанесения на биоткань специализированного лазерно-контрастного вещества поглощающего энергию лазерного излучения. При облучении красителя лазерным излучением, в результате термохимической реакции в зоне облучения имеет место выделение тепловой (взрыв) и механической энергии. Краситель быстро выгорает и тепловое воздействие прекращается, так как биоткань не поглощает лазерное излучение. Глубина одного цикла теплового взрыва не превышает 0,15–0,3 мм что позволяет дозировать воздействие.

**Цель исследования:** проведение ультраструктурных исследований эпителия шейки матки пациенток инфицированных вирусами 16 и 18 типов ВПЧ до, после лечения, а так же облученного материала, который удаляется из эпителия (струп).

**Материалы и методы.** Ранее было пролечено 144 пациентки с ВПЧ-патологией шейки матки и было показано, что эффективность элиминации ВПЧ 16 типа составляет 94%, а ВПЧ 18 типа — 88%. При этом из этих групп рецидивов ВПЧ-инфекций не было в течении 12 месяцев. Из обследованных пациенток были отобраны 4, у которых, ранее были папилломатозы эпителия, а после лечения ДНК ВПЧ 16 и 18 типов не обнаруживались.

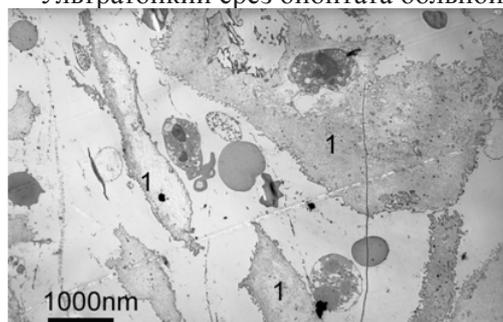
У этих пациенток были взяты биоптаты и мазки из цервикального канала для анализа методом ПЦР, цитологических и гистологических исследований, а также трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ).

**Результаты и их обсуждение.** Ультраструктура материала биоптатов больных представлена на рисунке 1. На микрофотографии четко выявляется ядро эпителиальных клеток, хорошо виден контакт клеток друг с другом через десмосомы, которые расположены по клеточной мембране. Этот срез биоптата показывает нам, что эти клетки расположены не в верхнем слое, а ближе к среднему слою эпителия, так как поверхностные клетки эпителия, полученные путем взятия мазка, представляют собой, как видно на рисунке 2, уже сильно измененную ультраструктуру. Для них характерны разрушенные ядра, потери клеточных органелл и общее нарушение структуры морфологии клетки, так как это отмирающие, слущивающиеся клетки эпителия. Интересно, что после проведения лечения ультраструктура клеток эпителия из биоптата практически совпадает с нормой (рисунок 3) — также наблюдаются типичные десмосомы. ПЦР, проведенная на этом материале, т.е. из биоптатов и мазков пролеченных пациенток, показала отсутствие ДНК папилломавируса. Особый интерес представлял собой анализ облущенного эпителия, т.е. та часть эпителия, которая после воздействия излучения удалялась с поверхности (струп). Этот материал был так же проанализирован на сохранение ультраструктуры клеток: выяснилось, что типичная ультраструктура нормальных клеток полностью изменена; невозможно выявить ни ядерный материал, ни цитоплазматический, ни мембраны, ни органеллы, ни контактные структуры (десмосомы, рисунок 4). Клетки струпа сильно разрушены, визуально определяются отдельные клеточные фрагменты.



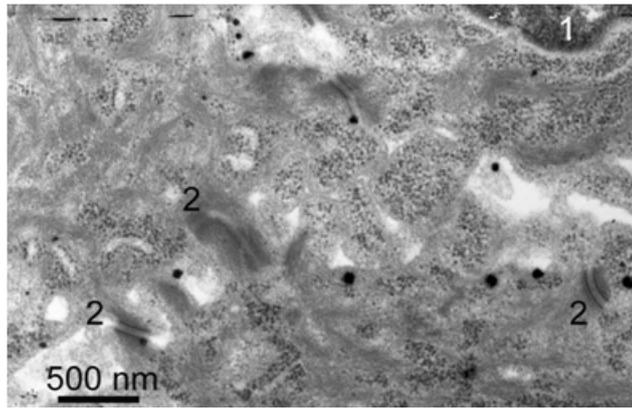
1 — ядра эпителиальных клеток; 2 — десмосомы. ТЭМ, контрастирование уранилацетатом

Рисунок 1 — Ультратонкий срез биоптата больной до лечения

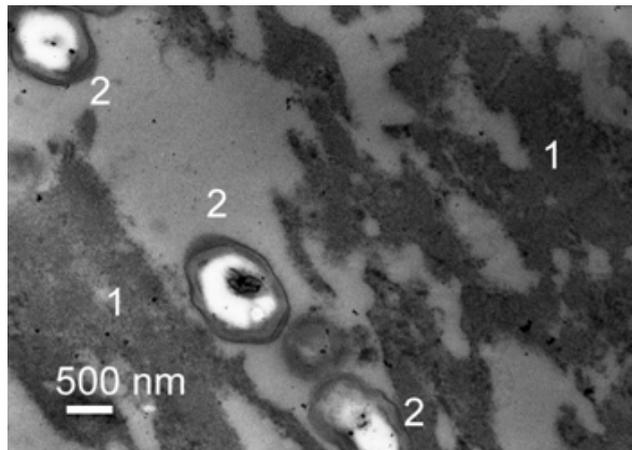


1 — слущивающиеся клетки эпителия, в промежутках видны клетки крови. ТЭМ, контрастирование уранилацетатом

Рисунок 2 — Ультратонкий срез осадка мазка взятого с поверхности эпителия шейки матки

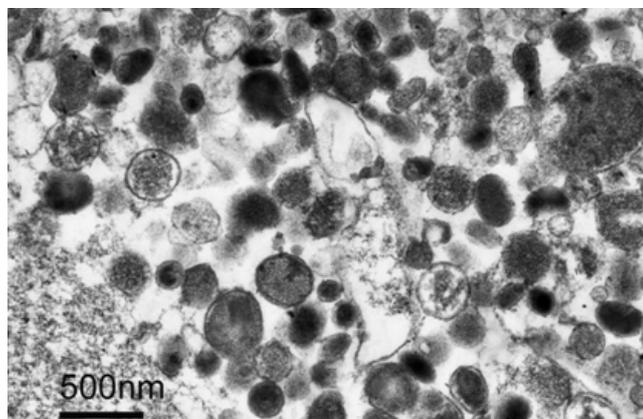


1 — ядра эпителиальных клеток; 2 — десмосомы. ТЭМ, контрастирование уранилацетатом  
 Рисунок 3 — Ультратонкий срез биоптата больной после лечения и восстановления эпителия



1 — фрагменты клеток; 2 — бактерии. ТЭМ, контрастирование уранилацетатом  
 Рисунок 4 — Ультратонкий срез струпа после КТЛТ

Интересно сопоставить этот материал, по измененной ультраструктуре сопутствующих бактерий, которые присутствуют в материале мазка: действительно, в мазке взятом у больной до проведения лечения, четко выявляется как внутренняя структура так и оболочка бактерии, а также структура сопутствующей флоры эпителия шейки матки (рисунок 5). Важно отметить, что ДНК бактерии на рисунке 4, в струпе, имеет очень плотный характер, что типично для денатурированной ДНК, в то время как на рисунке 5 в аналогичных структурах ДНК представляет собой хорошо разрешимые структуры. В облученном материале, методом ПЦР ДНК папилломавирусов не обнаружена.



ТЭМ, контрастирование уранилацетатом.  
 Рисунок 5 — Ультратонкий срез осадка мазка из цервикального канала больной до проведения лечения

**Выводы.** Полученные данные по ультраструктуре материала эпителия шейки матки до и после лечения пациенток методом КТЛТ подтверждает отсутствие ДНК папилломавирусов у пролеченных женщин и сохранение нормальной ультраструктуры клеток после восстановления эпителия после проведенного лечения.

КТЛТ шейки матки проявила высокую эффективность в элиминации ВПЧ 16 и 18 типов, разработка метода была отмечена золотой медалью в салоне «Инновационные технологии в медицине» (Женева) в 2011 г. [3]. Работа ведется под патронажем ООО «Новые энергетические технологии». Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 14.527.12.0011 от 13 ноября 2011 г.

#### Литература

1. Способ хирургического лечения фоновых и предраковых заболеваний шейки матки: пат. 2330630 РФ, МПК А 61 В 18/22 / В.В. Ежов, А.М. Торчинов, В.И. Фириченко, Г.А. Варев, Р.А. Дуванский, А.А. Салиев; заявитель Москов. гос. мед.-стоматол. ун-т Федер. аг-ва по здравоохранению и соц. развитию РФ. – № 2006143871/144; заявл. 13.12.2006; опубл. 10.08.2008 // Изобретения. Полезные модели. – 2008. – № 22.

2. Элиминация вируса папилломы человека с поверхности шейки матки после контактной ИК-лазерной терапии / В.В. Ежов [и др.] // Вопр. гинекол., акушер. перинатол. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 42-44.

3. Therapie thermo-laser avec methode de contraste dans le traitement de pathologies cervicales: diplome / S. Belov [et al.] / Salon international des inventions, Geneve, 08.04.2011.

Поступила 21.09.2012

### ULTRASTRUCTURAL STUDY OF PATIENTS CERVIX INFECTED WITH HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES 16 AND 18 BEFORE AND AFTER TREATMENT BY CONTACT THERMO-LAZER THERAPY.

Manykin A.<sup>1</sup>, Ezhov V.<sup>2</sup>, Danileiko J.<sup>3</sup>, Saljuk V.<sup>3</sup>, Dymkovets V.<sup>2</sup>, Gushchina E.<sup>1</sup>, Lisitsyn F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*D.I. Ivanovsky Institute for Virology of Ministry of Health and Social Department of the Russian Federation*

<sup>2</sup>*Municipal Clinical Hospital # 52;*

<sup>3</sup>*A.M. Prokhorov Institute for General Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

The results of the cervix epithelium ultrastructural study in patients infected with the human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 before and after treatment using the contact thermo-laser therapy (CTLT) are presented. It was showed that, after treatment, after 1.5 and 6 months HPV DNA was not determined in the biopsy and the cervix smear by PCR. In ultrathin sections the epithelial cells structure from the biopsy after treatment corresponds to the one observed in the norm.

**Keywords:** *human papillomavirus*, contact thermo-laser therapy method, cervical epithelium, electron microscopy.

### ЛЕЧЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА У ДЕТЕЙ: ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ И ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ

Спиридович В.И., Кастусик С.В., Кудин А.П.

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Целью работы было оценить эффективность и оправданность включения в комплексную терапию инфекционного мононуклеоза (ИМ) антибиотиков (АБ) и глюкокортикостероидов (ГКС). Было проанализировано лечение 100 детей (от 7 месяцев до 16 лет) с ИМ. Применение ГКС при лечении ИМ у детей достоверно сокращает длительность лихорадки, аденоидита, пленчатого фарингита и лимфоаденопатии. Применение АБ у пациентов с ИМ целесообразно только в случае доказанного присоединения бактериальной инфекции. При неосложненном течении ИМ назначение АБ увеличивает продолжительность пленчатого фарингита.

**Ключевые слова:** инфекционный мононуклеоз, дети, лечение, антибиотики, глюкокортикостероиды.

**Введение.** Инфекционный мононуклеоз (ИМ) является полиэтиологичным заболеванием и может вызываться различными лимфотропными инфекциями. Однако как правило если отдельно вопрос этиологии ИМ не оговаривается, это заболевание связывают с ВЭБ-инфекцией (ВЭБИ). Считается, что более 80–95% всех случаев типичного ИМ ассоциировано с ВЭБИ [1, 2].

Актуальность ИМ связана с широкой распространенностью этого заболевания среди детского населения и возможностью (хотя и редкой) развития осложнений и неблагоприятных исходов, а также — перехода инфекции в хроническую форму. По уровню заболеваемости среди детского населения в Республике Беларусь инфекционный мононуклеоз уступает только ОРИ, ОКИ и ветряной оспе.

К сожалению, до настоящего времени существует некоторое расхождение в определении подходов к лечению ИМ в русскоязычной учебной и зарубежной справочной литературе [1–4]. Поэтому целью нашей работы было оценить эффективность и оправданность включения в комплексную терапию инфекционного мононуклеоза антибиотиков и глюкокортикостероидов.

**Материалы и методы.** В данной работе авторы провели ретроспективный анализ 100 историй болезни детей в возрасте от 7 месяцев до 16 лет (61 мальчика и 39 девочек), находившихся на лечении в УЗ «ГДИКБ» г. Минска в 2011 г. с диагнозом инфекционный мононуклеоз. Было выделено 4 группы детей: в 1-ю группу вошло 55 детей (55%), у которых проводилась терапия антибиотиками (АБ); во 2-ю группу — 10 детей (10%), лечение которых включало назначение глюкокортикостероидов (ГКС); в 3-ю группу — 10 детей (10%), которые не получали АБ или ГКС; и в 4-ю группу вошло 25 больных (25%), у которых комбинированная терапия проводилась с применением антибиотиков и глюкокортикостероидов (АБ + ГКС). Кроме того, все дети получали симптоматическую терапию.

Наиболее часто в стационаре у детей с ИМ применялись цефалоспорины (ЦС) — у 58 пациентов (цефтриаксон — у 50 детей, цефуроксим — у 6, цефотаксим — у 2). Кроме того, в 9 случаях использовались макролиды (макропен, азитромицин, спирамицин, кларитромицин), в 6 — линкомицин, в 4 — аминопенициллины (амоксициллин, амоксиклав), в 3 — метронидазол. Препараты назначались в стандартных возрастных дозировках.

У детей 2-й группы ГКС назначались на 3–6 дней (обычно 4–5 суток). В одном случае это был метилпреднизолон 1 мг/кг/сут, внутрь, на 3 дня с последующей постепенной отменой в течение 3 суток. У остальных детей этой группы применялся дексаметазон, парентерально (в основном, в/вено): первые 2–4 дня в дозе 0,5–1,3 мг/кг/сут, затем доза постепенно снижалась вплоть до отмены препарата.

В группе детей, получавших АБ + ГКС, глюкокортикоиды назначались всем детям парентерально (как правило, в/вено). Стартовая доза преднизолона составляла 0,5–4,0 мг/кг/сут, дексаметазона — 0,25–1,3 мг/кг/сут. После получения клинического эффекта доза ГКС постепенно снижалась вплоть до отмены (как правило, ежедневно на 50%). У 14 пациентов продолжительность лечения составила от 1 до 3 суток, у остальных детей этой группы — от 5 до 10 дней. (У некоторых больных имела место смена ГКС-терапии. Указанная длительность применения этих препаратов отражает общую продолжительность лечения глюкокортикоидами).

Таким образом, в этих двух группах пациентов с ИМ, получавших ГКС, длительность ГКС-терапии не превышала 3 суток у 15 из 35 детей (42,9%). Возможно, это были те больные, которые не нуждались в назначении данных препаратов, и, фактически, ГКС использовались у этих пациентов в качестве «жаропонижающих» препаратов и средств психотерапии родителей (температура нормализовалась — родители успокоились). Не исключено, что в некоторых ситуациях этот подход мог быть оправдан, но он не должен стать правилом.

Обследование детей включало общеклинические методы исследования (общий анализ крови (ОАК), общий анализ мочи, биохимический анализ крови), мазок из зева на флору

по стандартным методикам. Атипичные мононуклеары в периферической крови были обнаружены у 85% детей. У остальных детей в ОАК определялось увеличение уровня мононуклеарных клеток (лимфоциты, моноциты), количество которых обычно превышало 70%. В постановке диагноза ИМ также помогало обнаружение повышения уровня печеночных ферментов (АЛТ, АСТ) у 44% детей. Патогенная флора или повышенное (105 и более) содержание условно-патогенных микроорганизмов не были выявлены при проведении бактериологического обследования.

Оценка клинико-лабораторных показателей проводилась в сравнении с возрастными нормами [5]. Обработка полученных данных производилась на компьютере с использованием стандартного пакета программ статистического анализа Windows 2000 Microsoft Excel.

**Результаты и их обсуждение.** Классическая клиническая картина типичного ИМ включает в себя лихорадку, ангину (пленчатый тонзиллит), аденоидит (сопровождающийся заложенностью носа без насморка и часто — храпом во сне), генерализованную лимфоаденопатию (с преимущественным увеличением шейных и подчелюстных лимфоузлов), гепатолиенальный синдром. Как известно, реально на практике многие заболевания имеют некоторые отклонения от классической симптоматики той или иной нозологии. Не является исключением и ИМ. Поэтому не стоит ожидать проявления всех перечисленных симптомов у каждого больного с ИМ. Можно говорить лишь о вероятности появления различных признаков болезни. Так, по нашим данным, лихорадка отмечалась у 81% больных, пленчатый тонзиллит — у 67%, аденоидит, — у 69%, лимфоаденопатия — у 66%, гепатомегалия — у 44% и спленомегалия — только у 20%. В ОАК лейкоцитоз встречался у 84% пациентов, сдвиг лейкоцитограммы влево — у 64% (при этом, в абсолютном большинстве случаев — у 84% количество молодых форм нейтрофилов не превышало 10%), повышение СОЭ отмечалось у 60% детей. У всех детей в крови определялись атипичные мононуклеары (АМ) и, часто — лимфоцитоз (увеличение уровня мононуклеарных клеток — лимфоцитов, моноцитов, АМ — суммарное содержание которых обычно превышало 70%). Наличие у ребенка с ангиной лимфоцитоза в ОАК говорит о специфическом характере тонзиллита (часто — об ИМ) даже в отсутствие АМ.

Эффективность лечения в каждой группе оценивалась после начала терапии по следующим критериям: продолжительность сохранения лихорадки, налетов на миндалинах, затруднения носового дыхания, увеличения лимфоузлов (Л/У), длительность гепато- и спленомегалии, продолжительности сохранения изменений в ОАК. Полученные данные представлены в таблице.

Таблица — Клинико-лабораторные данные у различных групп пациентов с ИМ

Критерии	АБ	ГКС	Без лечения	АБ + ГКС
Длительность температуры, дни	3,96±0,39	1,6±0,58*	1,9± 0,94**	2,32± 0,35 ***
Длительность налетов, дни	5,86±0,31	3,63±0,65*	4,0±1,0	4,14±0,49***
Длительность затрудненного носового дыхания, дни	5,07±0,45	1,6± 0,67*	1,1± 0,74**	3,52± 0,54 ***
Увеличение Л/У, дни	4,38±0,49	2,67± 0,71*	4,2± 0,87	2,96±0,62
Лейкоцитоз, дни	5,49± 0,44	3,6±0,93	4,5± 0,7	4,68± 0,59
Сдвиг лейкоцитограммы влево, дни	3,45± 0,46	3,3± 0,86	4,1±0,84	3,08± 0,51
Повышение СОЭ, дни	4,29± 0,49	1,7± 0,92*	3,2±1,03	3,36±0,64

Примечание:

- \* — достоверное отличие показателя в 1-й и 2-й группах пациентов (p<0.05),
- \*\* — достоверное отличие показателя в 1-й и 3-й группах пациентов (p<0.05),
- \*\*\* — достоверное отличие показателя в 1-й и 4-й группах пациентов (p<0.05).

Как видно из представленных данных, применение ГКС (во 2-й и 4-й группе пациентов) достоверно уменьшает продолжительность лихорадки, длительность сохранения затрудненного носового дыхания и сохранения налетов. Кроме того, продолжительность лимфоаденопатии у детей 2-й группы также достоверно снижается, а лабораторные признаки воспаления (по данным ОАК) достоверно не отличаются у пациентов разных групп. Влияние ГКС на течение заболевания было бы, очевидно, более заметным, если бы эти препараты назначались более продолжительным курсом, а не в виде эпизодического применения (на 1–3 суток). В последнем случае нередко (у 28,6% детей) отмечался синдром отмены ГКС, который проявлялся через день после прекращения введения препарата повторным подъемом температуры тела до фебрильного уровня.

Несмотря на эффективность применения ГКС при ИМ, они должны назначаться только при тяжелом течении инфекционного мононуклеоза, в первую очередь протекающем с обструкцией верхних дыхательных путей, цитопениями или при поражении ЦНС. ГКС не должны использоваться только для снижения температуры (фактически, как жаропонижающие), т.к. отдаленные последствия их применения не всегда можно предсказать. В связи с потенциально онкогенными свойствами ВЭБ, иммуносупрессивным действием ГКС и неясными последствиями действия двух этих факторов на организм каждого конкретного больного, в настоящее время от применения ГКС при неосложненном течении ИМ рекомендуют воздерживаться [1, 2].

Обращает на себя внимание то, что по нашим данным, не найдено достоверного отличия по исследованным показателям в 1-й (получавших АБ) и 3-й группе больных (получавших только симптоматическое лечение). Более того, оказалось, что применение АБ увеличивало продолжительность сохранения явлений пленчатого фарингита (фактически, того симптома ИМ, из-за которого эти препараты и назначались)! Любопытно, что у 32 пациентов из этих двух групп (40%) в ОАК не было воспалительных изменений, а у большинства остальных — эти изменения были не выраженными (молодые нейтрофилы составляли менее 10% и количество лейкоцитов превышало показатели здоровых детей менее чем на 25%). Это означает, что назначение АБ этим больным было не обоснованным. Кроме того, у 23 из 33 детей (69,7%), получавших аминопенициллины (4 человека в стационаре и 19 детей на дому), развилась типичная пятнисто-папулезная экзантема (что совпадает с литературными данными [1, 6]). Хотя хорошо известно, что применение аминопенициллинов при ИМ противопоказано, не всегда удается сразу правильно поставить диагноз, что, во многом, и определило назначение этих препаратов почти у каждого третьего ребенка, получавших АБ.

Интересно, что 18,8% детей с ангиной получали АБ терапию более 10 дней, что трудно понять, т.к. в большинстве случаев банального стрептококкового тонзиллита или фарингита уже через 2–3 дня эффективной терапии состояние больного ребенка, практически, нормализуется. Поэтому необычно упорное течение вроде бы обычной ангины должно рассцениваться как специфический тонзиллит, и в большинстве случаев это будет связано с небактериальной этиологией заболевания. Кроме того, непонятным является назначение АБ у детей с ИМ, у которых вообще не было налетов на миндалинах. Таких больных оказалось 23 из 80 пациентов (28,8%), вошедших в 1-ю и 4-ю группы.

**Выводы.** Таким образом, применение ГКС при лечении ИМ у детей достоверно облегчает течение заболевания за счет сокращения длительности лихорадки, аденоидита, пленчатого фарингита и лимфоаденопатии. Однако, несмотря на это, назначать препараты данной группы не следует всем больным с ИМ, т.к., с одной стороны, это заболевание в большинстве случаев протекает циклично и заканчивается самовыздоровлением, а с другой стороны, невозможно предсказать отдаленные последствия применения иммуносупрессивных препаратов при лечении патологии, связанной с потенциально онкогенным вирусом. Показания к применению ГКС должны ограничиваться выраженной обструкцией дыхательных

путей за счет увеличения лимфоидной ткани в носо- и ротоглотке (изолированное затруднение носового дыхания можно лечить местнодействующими ГКС), различные цитопении и поражение нервной системы [1, 2], а также, на наш взгляд, резко выраженный ССВО (что потенциально может привести к гемафагоцитарному синдрому).

Отсутствие эффекта от адекватной этиотропной терапии пленчатого тонзиллита через 48–72 часа от ее начала, ставит под сомнение бактериальную природу заболевания и должно заставить врача задуматься о возможном специфическом характере ангины (наиболее вероятно — об инфекционном мононуклеозе). Если у больного с ангиной есть изменения в лейкоцитограмме (лейкоцитоз за счет увеличение мононуклеарных клеток), увеличение трансаминаз, это должно навести на мысль об инфекционном мононуклеозе.

Назначение АБ не улучшает течения ИМ и не сокращает сроки лечения таких пациентов. Более того, нормализация клинико-лабораторных данных в этой группе детей наступала позже, чем в других группах (включая детей, находившихся только на симптоматической терапии). Поэтому применение АБ у больных с ИМ целесообразно только в случае доказанного присоединения бактериальной инфекции. Косвенным признаком этого (с определенными оговорками) можно считать выраженные воспалительные изменения в ОАК и резкое повышение острофазовых белков (СРБ более 70–100 мг/л, прокальцитонина более 2 нг/мл).

#### Литература

1. Feigin and Cherry's textbook of pediatric infectious diseases / ed. by R.D. Feigin [et al.]. – 6th ed. – 2009. – Vol. 2. – P. 2043-2071.
2. Nelson textbook of pediatrics / ed. by R.M. Kliegman [et al.]. – 18th ed. – 2008. – P. 1372-1377.
3. Инфекционные болезни у детей: учебник для педиат. факульт. мед. вузов / под. ред. В.Н. Тимченко. – 3-е изд. – СПб.: СпецЛит, 2008. – С. 224-230.
4. Учайкин, В.Ф. Руководство по инфекционным болезням у детей. – М.: ГЕОТАР МЕДИЦИНА, 1998. – С. 262-274.
5. Записная книжка практического врача № 4. Педиатрия в цифрах и фактах. Важнейшие физиологические критерии здорового ребенка (по материалам справочной литературы) // Мед. новости. – 1997. – № 12, (V прилож.). – С. 1-6.
6. Leung, A.K.C. Eruption associated with amoxicillin in a patient with infectious mononucleosis / A.K.C. Leung, M. Rafaat // Int. J. Dermatol. – 2003. – Vol. 42. – P. 553-555.

Поступила 19.07.2012

## TREATMENT OF INFECTIOUS MONONUCLEOSIS AT CHILDREN: THE ESTIMATION OF EFFICIENCY OF APPLICATION OF ANTIBIOTICS AND GLUCOCORTICOIDS

**Spiridovich V.I., Kastusik S.V., Kudin A.P.**

*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

The purpose of the study was to estimate efficiency and correctness of inclusion in complex therapy of infectious mononucleosis (IM) antibiotics (AB) and glucocorticosteroids (GCS). Treatment of 100 children (from 7 months till 16 years) with IM has been analyzed. The application of GCS in the treatment of IM in children significantly reduces duration of fever, adenoiditis, pharyngitis, and lymphadenopathy. The application of AB in patients with IM was advisable only in case of proven additional bacterial infection. In uncomplicated IM current the appointment of AB increases duration of pharyngitis.

**Keywords:** infectious mononucleosis, treatment, antibiotics, glucocorticosteroids.

# ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО АЛГОРИТМА ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИОННО-ТОКСИЧЕСКОГО ШОКА ПРИ ПНЕВМОНИИ

Борисов И.М.<sup>1</sup>, Шаповалова Т.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Филиал № 12 ФБУ «1602 окружной военный клинический госпиталь» МО РФ, Знаменск, Россия;

<sup>2</sup>ГОУ ВПО «Саратовский медицинский университет Росздрава», Саратов, Россия

**Резюме.** Показано, что предложенный диагностический алгоритм прогнозирования развития инфекционно-токсического шока у больных пневмонией может помочь врачу в ранние сроки заподозрить возможность развития инфекционно-токсического шока, что позволит своевременно скорректировать лечебно-диагностическую тактику, более точно решить вопросы транспортировки больного, определить показания для госпитализации, в том числе в отделение реанимации и интенсивной терапии. Внедрение данного алгоритма в работу приемного, инфекционного и пульмонологического отделений позволило существенно уменьшить количество пневмоний, осложненных инфекционно-токсическим шоком, и, тем самым, улучшить результаты лечения пневмонии.

**Ключевые слова:** пневмония, прогнозирование осложнений, алгоритмы.

**Введение.** Проблема диагностики и лечения пневмонии по-прежнему актуальна в связи с широкой распространенностью, увеличением частоты тяжелых форм, а также с большим количеством осложнений заболевания, несмотря на постоянное совершенствование методов диагностики и лечения [1–3]. Заболеваемость пневмонией в Российской Федерации в настоящее время составляет от 5 до 20 случаев на 1 тыс. человек в год [1, 2]. Высокой остается заболеваемость пневмонией в Вооруженных Силах Российской Федерации среди военнослужащих, проходящих военную службу по призыву (более 30 %), а самые высокие показатели заболеваемости регистрируются у военнослужащих первого полугодия службы [4–6].

В соответствии с современным пониманием патогенеза, пневмония — это протекающий во времени процесс, в ходе эволюции которого наблюдается смена фаз, имеющих важные патогенетические особенности и характерные системные и локальные осложнения. Одним из осложнений в фазе разгара пневмонии может стать инфекционно-токсический шок (ИТШ).

ИТШ характеризуется быстрым развитием синдрома острой недостаточности кровообращения, обусловленного инфекцией и метаболическими расстройствами. Данное осложнение представляет реальную угрозу жизни больного пневмонией, являясь пусковым механизмом развития вторичных поражений органов-мишеней (почек, печени, головного мозга), что ведет к увеличению сроков лечения, часто ухудшает результат лечения.

В связи с этим обстоятельством чрезвычайную актуальность приобретают меры профилактики развития ИТШ у больных пневмонией и, соответственно, задача разработки диагностических алгоритмов с использованием широко известных практическим врачам клинических критериев течения пневмонии, которые позволили бы в более ранние сроки выявить косвенные признаки, свидетельствующие о возможности развития ИТШ, а значит и способствовали бы эффективной профилактике ИТШ.

Результаты работы, учитывающей как отечественные и международные протоколы диагностики и лечения пневмонии, так и собственный опыт, были положены в основу данной публикации.

**Цель исследования:** разработка диагностического алгоритма для прогнозирования развития ИТШ при пневмонии. Оценка эффективности внедрения диагностического алгоритма прогнозирования развития ИТШ при пневмонии.

**Материалы и методы.** Обследование и лечение больных пневмонией проводилось в пульмонологическом отделении военного госпиталя в период с 1998 по 2008 гг. В исследование были включены 2000 пациентов с пневмонией, мужчин, военнослужащих, проходящих военную службу по призыву, в возрасте от 18 до 22 лет ( $19,2 \pm 0,19$ ).

С целью оценки эффективности алгоритма прогнозирования развития ИТШ при пневмонии проведен сравнительный анализ по двум группам больных за 10-летний срок (1998–2008 гг.). В группе сравнения ( $n = 782$ ) прогнозирование развития ИТШ проводилось с учетом индивидуальных представлений и личного опыта врачей, без использования алгоритма прогнозирования в период с 1998 по 2003 гг., а в основной группе ( $n = 1218$ ) в период с 2003 по 2008 гг. — на основании диагностического алгоритма прогнозирования развития ИТШ при пневмонии разработанного нами.

Диагноз пневмония устанавливался на основании характерных клинико-лабораторных и инструментальных данных. Критериями являлись инфильтративные изменения в легких, выявляемые в результате рентгенографического исследования органов грудной полости и наличие клинико-лабораторных признаков пневмонии: лихорадка  $^3 38,0^{\circ}\text{C}$  на момент осмотра при поступлении, боли в грудной клетке, усиливающиеся при кашле и на высоте вдоха, кашель с выделением мокроты, физикальные признаки пневмонии (зона крепитации и/или мелкопузырчатых хрипов над очагом поражения легочной ткани, укорочение перкуторного звука, бронхофония и др.) лейкоцитоз  $^3 10 \cdot 10^9/\text{л}$  и/или палочкоядерный сдвиг ( $> 10\%$ ) независимо от общего количества лейкоцитов.

В процессе исследования были использованы общеклинические и инструментальные диагностические методы в соответствии с методическими указаниями ГВМУ МО РФ 2003 г., а также Стандартами диагностики и лечения больных с неспецифическими заболеваниями легких, утвержденных приказом МЗ РФ от 09.10.1998 № 300 и Практическими рекомендациями по диагностике, лечению и профилактике внебольничной пневмонии у взрослых (2006 г.) [1, 4, 7].

Перечень используемых методов исследования включал: клинический анализ крови, анализ мочи, биохимический анализ крови (общий белок, АсТ, АлТ, глюкоза, С-реактивный белок, серомукоид, фибриноген), микроскопию мазка мокроты, окрашенного по Граму, посев мокроты, определение чувствительности выделенных возбудителей к антибиотикам, крупнокадровую флюорографию органов грудной полости в задне-передней и боковой проекциях, электрокардиографию, исследование функции внешнего дыхания. Чувствительность микроорганизмов оценивалась дисконифузионным методом.

Пациентам обеих групп проводилась этиопатогенетическая и симптоматическая терапия в соответствии с имеющимися стандартами лечения данного заболевания [1, 2, 6]. Помимо антибактериальных препаратов пациенты получали муколитики, жаропонижающие и противокашлевые препараты, комплекс физиотерапевтических процедур и лечебной гимнастики. Все пациенты находились в стационаре до полного клинико-рентгенологического разрешения пневмонии.

У больных, находившихся на лечении в отделении анестезиологии и реанимации, дополнительно проводился мониторинг некоторых функций организма, в том числе артериального давления, центрального венозного давления, диуреза. Определялись газовый состав крови, электролиты (калий, натрий сыворотки крови), показатели белкового состава, свертывающей системы крови и выделительной функции почек.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2007 и Statistica 6.0 (StatSoft, Inc. 2001).

Для обработки полученных данных использовали оценку достоверности межгрупповых различий с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Межгрупповые

различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . Расчет диагностической ценности методов обследования осуществляли по следующим формулам:

диагностическая чувствительность (ДЧ) =  $a / (a + c)$ , в%;

диагностическая специфичность (ДС) =  $d / (d + b)$ , в%;

диагностическая точность (ДТ) =  $(a + d) / (a + d + c + b)$ , в%;

диагностическая эффективность (ДЭ) =  $(ДЧ + ДС) / 2$ ,

где  $a$  — количество истинно положительных результатов исследования,  $b$  — количество ложно положительных результатов,  $c$  — количество ложно отрицательных результатов,  $d$  — количество истинно отрицательных результатов [8].

**Результаты и их обсуждение.** Принцип построения алгоритма для прогнозирования развития ИТШ [удостоверение на рац. предложение от 10.04.2009 № 4454 ГОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет Росздрава»] был следующим. При поступлении в госпиталь у больного оценивалась клиническая картина заболевания, включая выявление клинических маркеров верификации ИТШ. В дальнейшем проводился анализ признаков, косвенно свидетельствующих о возможности развития данного осложнения и степени его выраженности. В предложенном алгоритме были учтены следующие, хорошо известные практическим врачам, клинические признаки: характер дебюта пневмонии, состояние сознания пациента, наличие или отсутствие одышки, цвет кожных покровов, уровень артериального давления. В результате анализа только вышеуказанных клинических данных поэтапно определялась вероятность развития ИТШ (рисунок).

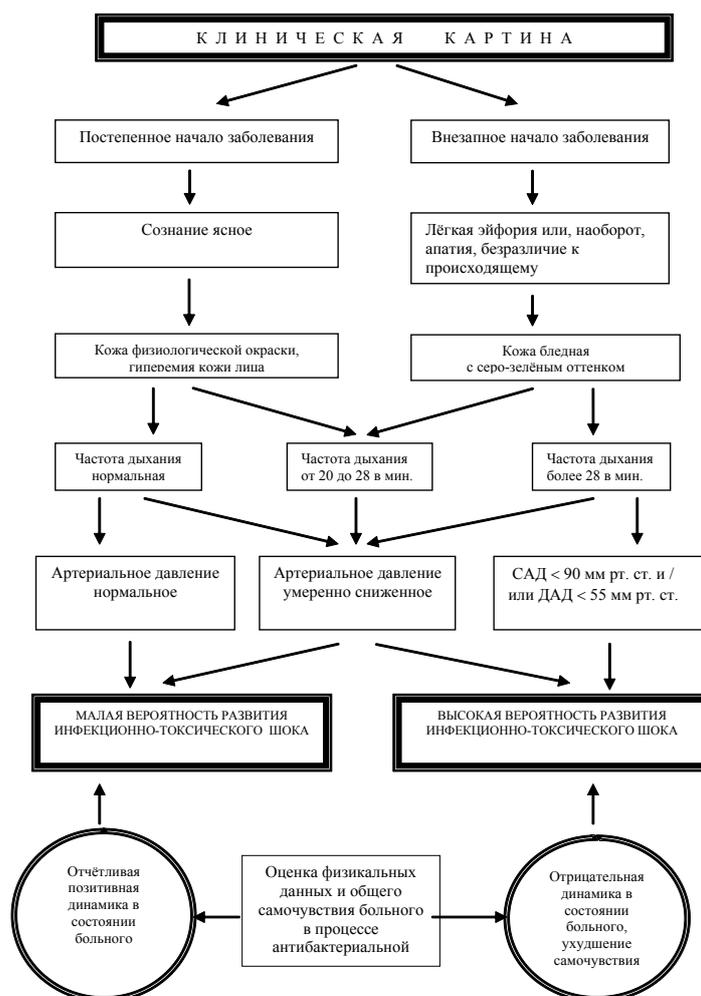


Рисунок — Алгоритм прогнозирования развития инфекционно-токсического шока при пневмонии

Внедрение разработанного алгоритма прогнозирования развития ИТШ в работу приемного, инфекционного и пульмонологического отделений госпиталя позволило существенно уменьшить количество осложнений пневмонии ИТШ у пациентов с пневмонией. В результате ИТШ был диагностирован у 8,8% пациентов группы сравнения и у 3,7% пациентов основной группы ( $p < 0,05$ ) и тем самым улучшить результаты терапии в основной группе (таблица).

Таблица — Распределение больных пневмонией сравниваемых групп по наличию инфекционно-токсического шока, абс. число (%)

Наличие инфекционно-токсического шока	Группа сравнения (n = 782)		Основная группа (n = 1218)	
	Абс. число	%	Абс. число	%
Пневмония, неосложненная инфекционно-токсическим шоком	713	91,2	1173	96,3
Пневмония, осложненная инфекционно-токсическим шоком	69	8,8	45	3,7*
Всего	782	100,0	1218	100,0

Примечание:  $p < 0,05$

Эффективность метода составила 90,8% при чувствительности 91,8%, специфичности 89,7% и точности 94,5%.

**Выводы.** Предложенный диагностический алгоритм помогает практикующему врачу, в том числе и на этапе первичного звена здравоохранения, в ранние сроки заподозрить возможность развития у больного пневмонией инфекционно-токсического шока. Это позволит своевременно скорректировать лечебно-диагностическую тактику, более точно решить вопросы транспортировки больного, определить показания для госпитализации, в том числе в отделение реанимации и интенсивной терапии.

#### Литература

1. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике / А.Г. Чучалин [и др.] – М.: ООО «Издательский дом «М-Вести», 2006. – 76 с.
2. Чучалин, А.Г. Пневмония / А.Г. Чучалин, А.И. Синопальников, Л.С. Страчунский. – М.: МИА, 2006. – 461 с.
3. Bartlett, J.G. Guidelines from the Infections Diseases Society of America. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults / J.G. Bartlett, S.F. Dowell, L.A. Mandell // Clin. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 31. – P. 347-382.
4. Диагностика, лечение и профилактика внебольничной пневмонии у военнослужащих МО РФ / под ред. А.Л. Ракова [и др.]. – М.: РМ-Вести, 2003. – 82 с.
5. Казанцев, В.А. Пневмония: руководство для врачей / В.А. Казанцев, Б.Б. Удальцов. – СПб.: СпецЛит, 2002. – 118 с.
6. Синопальников, А.И. Анализ состояния пульмонологической помощи в Вооруженных Силах и пути ее улучшения / А.И. Синопальников, А.А. Зайцев // Воен.-мед. журн. – 2008. – Т. 329, № 8. – С. 31 – 40.
7. Стандарты (протоколы) диагностики и лечения больных с неспецифическими заболеваниями легких: приказ МЗ РФ от 09.10.1998 № 300 // Биб-ка журн. «Качество медицинской помощи». – 1999. – № 1. – М.: Грантъ, 1999. – 40 с.
8. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ «Statistica» / О.Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2006. – 312 с.

Поступила 06.07.2012

## PREDICTION DIAGNOSTIC ALGORITHM OF INFECTIOUS-TOXIC SHOCK IN PATIENTS WITH PNEUMONIA AND EVALUATION OF ITS EFFECTIVENESS

**Borisov I.M.<sup>1</sup>, Shapovalova T.G.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Branch №12 of 1602 District Military Hospital, Znamensk, Russia*

<sup>2</sup>*Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, Russia*

It was shown that the proposed diagnostic algorithm for predicting of infectious-toxic shock development in patients with pneumonia could help the doctor to suspect the possibility of an infectious-toxic shock development in the early stages, that will allow time to adjust treatment and diagnostic tactics more accurately address the issues of transportation the patient, to determine the indications for hospitalization, including in the emergency department and intensive care. Implementation of this algorithm to the work of the receiver, infectious and pulmonary branches had significantly reduced the number of complications of pneumonia, an infectious-toxic shock, and thus improves the results of pneumonia treatment.

**Keywords:** pneumonia, predicting complications algorithms.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕМАКСОЛА ИS-АДЕНОЗИЛ-L-МЕТИОНИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗ- НЫМИ ПРЕПАРАТАМИ ОСНОВНОГО РЯДА В СОЧЕТАНИИ С АЛКОГОЛЕМ

**Суханов Д.С.<sup>1</sup>, Артющкова Е.Б.<sup>1</sup>, Дудка В.Т.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет  
им. И.И. Мечникова Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург, РФ*

<sup>2</sup>*ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития  
России, Курск, РФ*

**Резюме.** Введение в течение 12 дней противотуберкулезных препаратов основного ряда в сочетании с алкоголем приводит к тяжелому токсическому поражению печени с характерными гистологическими и биохимическими изменениями. Применение ремаксола и S-аденозил-L-метионина уменьшает гистологические признаки жировой дистрофии печени, приводя биохимические показатели в пределы физиологической нормы. Гепатопротективное действие более выражено при применении ремаксола. Изучаемые препараты обладают выраженным эндотелиопротективным действием на выбранной модели патологии и приводят к снижению коэффициента эндотелиальной дисфункции и его приближению к уровню интактных животных.

**Ключевые слова:** противотуберкулезные препараты, ремаксол, S-аденозил-L-метионин, эндотелиопротективная активность, гепатопротективная активность.

**Введение.** Среди поражений печени при туберкулезной инфекции первое место занимают проявления лекарственной гепатотоксичности [1, 2]. Установлено, что практически все противотуберкулезные препараты (ПТП) оказывают гепатотоксическое действие различной степени выраженности [3]. В то же время, злоупотребление алкоголем, выявленное более чем у 50% больных туберкулезом, усугубляет проявления лекарственной гепатотоксичности [4].

В комплексном лечении лекарственных поражений печени целесообразно использование метаболической и коферментной терапии, положительно влияющей на повышение устойчивости гепатоцитов к токсическому воздействию, оказывающей детоксикационный эффект с восстановлением функции пораженного органа [5].

В клинической практике положительно зарекомендовали себя препараты антигипоксического действия на основе янтарной кислоты. Оригинальный гепатопротекторный препарат ремаксол, содержащий янтарную кислоту (в виде N-метилглюкаминовой соли), метионин, рибоксин и никотинамид в комплексе с электролитами, доказал свою эффективность

в ряде доклинических и клинических исследований [6]. Вместе с тем, остается недоказанной эффективность данного препарата при поражении печени, вызванном сочетанным воздействием противотуберкулезными препаратами и алкоголя.

**Цель исследования:** оценка эффективности применения ремаксола и S-аденозил-L-метионина (SAM, адеметионин) при фармакологической коррекции патологии печени и эндотелиальной дисфункции на модели токсического поражения печени, вызванного комбинацией противотуберкулезных препаратов основного ряда и алкоголя.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на базе лаборатории доклинических исследований НИИ Экологической медицины Курского государственного медицинского университета в соответствии с Правилами лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»). Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдались в соответствии с «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123». В опыте участвовало 40 белых крыс-самцов массой 180–200 г, разделенных методом рандомизации на следующие группы (n=10 в каждой группе):

- интактные;
- контроль (ПТП+алкоголь);
- ПТП + алкоголь + ремаксол;
- ПТП + алкоголь + S-аденозил-L-метионин (SAM, адеметионин).

Поражение печени моделировалось применением изониазида, рифампицина, пиразинамида и этилового спирта с учетом дозировок, используемых в СПб НИИ фтизиопульмонологии [7, 8]:

- ПТП: изониазид 50 мг/кг подкожно + рифампицин 250 мг/кг внутривентриально + пиразинамид 45 мг/кг внутривентриально;
- алкоголь: в поилку наливался 10% раствор алкоголя с добавлением в качестве вкусовой добавки 0,1% сахара, находился в свободном доступе.

Исследуемые препараты вводились в дозах: ремаксол — 25 мл/кг, адеметионин (лиофилизат) — 0,9 мл/кг.

Препараты вводились в течение 12 суток, оценка показателей производилась на 13 сутки эксперимента.

В комплекс биохимических исследований входило определение уровня общего билирубина, общего белка, холестерина, триглицеридов, АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы на биохимическом анализаторе Виталон 400.

Для морфологического подтверждения развития моделируемых патологических процессов и в комплексной оценке эффективности препаратов проведено гистологическое исследование печени. Материал фиксирован в 10% формалине с последующей заливкой в парафин, срезы окрашиваются гематоксилином и эозином.

Показатели гемодинамики — систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряли непрерывно посредством аппаратно-программного комплекса «Віорас». Проводили функциональные сосудистые пробы: эндотелий-зависимую вазодилатацию (ЭЗВД) — внутривенное введение ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела животного, а также эндотелий-независимую вазодилатацию (ЭНВД) в ответ на внутривенное введение раствора нитропруссид натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела животного.

Коэффициент эндотелиальной дисфункции рассчитывался как отношение площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение НП (ШНП) к площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение АХ (SAX) [9, 10].

Результаты подвергались статистической обработке путем расчета среднего арифметического (M), стандартного отклонения среднего ( $\pm m$ ). Оценка статистической значимости различий при межгрупповых сравнениях производилась по двустороннему t-критерию Стьюдента для независимых групп. Различия считались статистически значимыми при значениях  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Отличий в массе тела, сердца и печени между интактными, контрольными и экспериментальными группами крыс на 13-й день эксперимента выявлено не было.

При оценке биохимических показателей через 12 дней после моделирования поражения печени с помощью введения ПТП и алкоголя обнаружено статистически значимое увеличение концентрации триглицеридов, АСТ, щелочной фосфатазы, общего билирубина и холестерина что свидетельствует о вовлечении печени в патологический процесс (таблица).

Таблица — Биохимические показатели в экспериментальных группах через 12 дней после моделирования поражения печени и его коррекции

Препарат	Триглицериды	АсАТ, Ед/л	АлАТ, Ед/л	Щелочная фосфатаза, Ед/л	Билирубин, мкмоль/л	Общий белок, г/л	Холестерин, ммоль/л
Интактные (n=10)	0,3 $\pm$ 0,05	162,8 $\pm$ 11,1	69,2 $\pm$ 8,42	152,9 $\pm$ 16,31	1,7 $\pm$ 0,38	58 $\pm$ 1,48	0,86 $\pm$ 0,08
Контроль (ПТП+алкоголь) (n=10)	0,77 $\pm$ 0,13*	218,5 $\pm$ 11,2*	72,7 $\pm$ 9,63	365,6 $\pm$ 72,69*	19,32 $\pm$ 7,4*	60,6 $\pm$ 1,76	1,75 $\pm$ 0,25*
ПТП+алкоголь +ремаксол(n=10)	0,29 $\pm$ 0,08**	137 $\pm$ 4,94**	66,9 $\pm$ 3,75	112,8 $\pm$ 10,52**	2,69 $\pm$ 1,07**	61,2 $\pm$ 2,03	0,73 $\pm$ 0,03**
ПТП+алкоголь +SAM (n=10)	0,33 $\pm$ 0,05**	137,8 $\pm$ 6,65**	69 $\pm$ 12,36	148,5 $\pm$ 21,33**	4,21 $\pm$ 1,93**	58,5 $\pm$ 1,69	0,71 $\pm$ 0,05**

Примечание:

1. \* —  $p < 0,05$  в сравнении с интактными животными;
2. \*\* —  $p < 0,05$  в сравнении с ПТП + алкоголь 12 суток.

Введение ремаксола и адеметионина фоне комбинации противотуберкулезных препаратов и алкоголя привело к статистически значимому снижению показателей, характеризующих поражение паренхимы печени, и их максимальному приближению к таковым интактных животных (таблица).

При гистологическом исследовании через 12 дней после моделирования поражения печени выявлялась диффузная крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов и диффузная мелкокапельная жировая дистрофия с тотальным поражением долек. Степень изменений цитоплазмы гепатоцитов была более выражена, за счет этого нарушена структура балок, на обширных участках коллабириваны синусоидные капилляры. Очагово наблюдался кариолизис в гепатоцитах. Изменения выражены однотипно во всех зонах печеночных долек.

У животных, получавших ремаксол, выявлялась очаговая крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, очаговая мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов наряду с участками печеночной ткани с полным отсутствием патологических дистрофических изменений (рисунок).

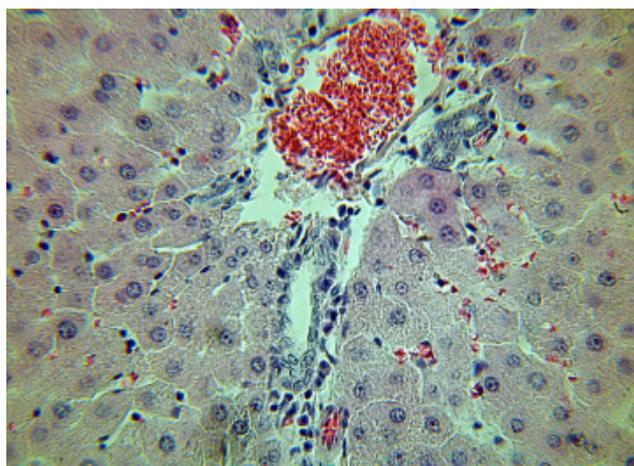


Рисунок — Печень животного, получавшего комплекс ПТП и этанол + ремаксол в/б. Нормальное гистологическое строение печеночных долек. Окраска гематоксилином и эозином. х 280

Гистологическая картина у животных, получавших раствор адеметионина, схожа с таковой в группе животных, получавших ремаксол. У них определялась очаговая крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, очаговая мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов наряду с участками печеночной ткани с полным отсутствием патологических дистрофических изменений.

Моделирование поражения печени в течение 12 дней, а также введение растворов ремаксолола и адеметионина не привело к статистически значимому изменению исходного артериального давления во всех сериях экспериментов.

При внутривенном введении экспериментальным животным раствора ацетилхолина наблюдалось падение уровня артериального давления с последующим его восстановлением. Моделирование поражения печени и введение исследуемых препаратов статистически значимо не влияло на показатели артериального давления во всех экспериментальных группах. Статистически значимых различий между действием изучаемых препаратов также не наблюдалось.

У животных, получавших в течение 12 суток противотуберкулезные препараты и алкоголь, время реакции эндотелий-зависимой вазодилатации сокращалось на 22,8% (с  $46,5 \pm 3,6$  до  $35,9 \pm 3,1$  сек,  $p < 0,05$ ).

Введение растворов ремаксолола и адеметионина в течение 12 дней на фоне моделирования поражения печени ПТП статистически значимо пролонгировало реакцию эндотелий-зависимой вазодилатации, приближая ее значения к таковым в группе интактных животных. Время восстановления артериального давления при введении ремаксолола и SAM составило  $44,2 \pm 2,2$  и  $43,1 \pm 1,9$  сек, соответственно ( $p < 0,05$  в обоих случаях по сравнению с группой контроля).

В ответ на введение раствора нитропруссид натрия также наблюдалось падение значений систолического и диастолического артериального давления с последующей постепенной нормализацией показателей. При этом, применение ПТП в сочетании с алкоголем и исследуемыми препаратами не влияло на выраженность реакции эндотелий-независимой вазодилатации по систолическому АД и диастолическому АД.

Было установлено, что у крыс, получавших противотуберкулезные препараты и алкоголь в течение 12 дней, продолжительность реакции эндотелий-независимой вазодилатации увеличивалась на 25,8% (с  $49,6 \pm 2,5$  до  $61,9 \pm 5,5$  сек,  $p < 0,05$ ). Исследуемые препараты статистически достоверно уменьшали время реакции эндотелий-независимой вазодилатации на выбранной модели патологии.

Рассчитав коэффициент эндотелиальной дисфункции, было установлено, что под влиянием введения противотуберкулезных препаратов и алкоголя через 12 дней КЭД увеличился в 1,8 раза, составив  $2,2 \pm 0,19$ .

Статистически значимым положительным воздействием на величину коэффициента эндотелиальной дисфункции обладали оба исследуемых препарата (при введении ремаксола величина КЭД составила  $1,3 \pm 0,12$ , при введении SAM —  $2,2 \pm 0,19$ ), что свидетельствует об эффективной коррекции моделируемого поражения печени и важной роли в данной патологии сосудистого эндотелия.

**Выводы.** Введение в течение 12 дней противотуберкулезных препаратов основного ряда (изониазид, рифампицин, пиразинамид) внутривенно и алкоголя приводит к тяжелому токсическому поражению печени, сопровождающемуся характерной динамикой гистологических и биохимических маркеров в сочетании с выраженной эндотелиальной дисфункцией.

Внутрибрюшинное введение ремаксола и адметионина в течение 12 дней на фоне моделирования поражения печени позволяет обнаружить гепатопротективное действие исследуемых препаратов, выражающееся в снижении гистологических дистрофических изменений и положительной динамике биохимических показателей функционирования печени. Гепатопротективное действие ремаксола более выражено, чем у адметионина.

Растворы ремаксол и адметионин обладают выраженным эндотелиопротективным действием на выбранной модели патологии, характеризующимся уменьшением коэффициента эндотелиальной дисфункции через 12 дней после моделирования поражения печени.

#### Литература

1. Борзакова, С.Н. Лекарственные поражения печени у детей, больных туберкулезом / С.Н. Борзакова, Б.А. Аксенова, А.Р. Рейзис // Туберкулез и бол. легких. – 2010. – № 8. – С. 3-12.
2. Вольф, С.Б. Медикаментозные поражения печени при полихимиотерапии туберкулеза / С.Б. Вольф, Д.С. Суханов, М.Г. Романцов // Вест. СПб ГМА им. И.И. Мечникова. – 2009. – № 1. – С. 172-176.
3. Anti-tuberculosis drug induced hepatitis — a Sri Lankan experience / W.V. Senaratne [et al.]. – Ceylon Med. J. – 2006. – Vol. 51, № 1. – P. 9-14.
4. Коморбидность туберкулеза, алкоголизма и наркомании / З.М. Загдын [и др.] // Пульмонология. – 2007. – № 2. – С. 22-27.
5. Зборовский, А.Б. Неблагоприятные побочные эффекты лекарственных средств / А.Б. Зборовский, И.Н. Тюренков, Ю.Б. Белоусов. – М.: МИА, 2008.
6. Коваленко, А.Л. Эффективность оригинального препарата «Ремаксол, раствор для инфузий» при поражениях печени различного генеза / А.Л. Коваленко, Д.С. Суханов, М.Г. Романцов. – Фарм. промышл. – 2010. – № 4. – С. 58-61.
7. Сливка, Ю.И. Сравнительная характеристика гепатотоксичности изониазида, рифампицина и пиразинамида / Ю.И. Сливка. – Фармакология и токсикология. – 1989. – Т. 52, № 4. – С. 82-85.
8. Сравнительное изучение гепатопротективного действия ремаксола, реамберина и адметионина при повреждении печени противотуберкулезными препаратами (экспериментальное исследование) / Д.С. Суханов [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2001. – Т. 56, № 1-2. – С. 12-16.
9. Артюшкова, Е.Б. Эндотелио- и кардиопротективные эффекты препарата фосфоглив при экспериментальном моделировании дефицита оксида азота / Е.Б. Артюшкова, М.В. Покровский, Т.Г. Покровская // Рос. мед.-биол. вест. им. акад. И.П. Павлова. – 2008. – № 4. – С. 42-47.
10. К вопросу фармакологической коррекции гипоестроген-индуцированной эндотелиальной дисфункции / М.В. Корокин [и др.] // Человек и его здоровье: Курск. науч.-практ. вестн. – 2008. – № 1. – С. 31-35.

Получена 29.06.2012

## EFFICIENCY OF REMAXOL AND S-ADENOSYL-L-METHIONINE AT EXPERIMENTAL DEFEAT OF A LIVER BY ANTITUBERCULOSIS ESSENTIAL DRUGS IN A COMBINATION TO ALCOHOL

Sukhanov D.S.<sup>1</sup>, Artyushkova E.B.<sup>1</sup>, Dudka V.T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Mechnikov Northwest State Medical University, St. Petersburg, Russia*

<sup>2</sup>*Kursk State Medical University, Kursk, Russia*

Introduction within 12 days of antituberculosis drugs: the isoniazid, rifampicin, pyrazinamide in a combination to alcohol leads to heavy toxic defeat of the liver, being accompanied characteristic dynamics of histologic and biochemical markers in a combination to development of endothelial dysfunction against normal for this type of animal values of arterial pressure. Application of remaxoland S-adenosyl-L-methionine reduces histologic symptoms of fatty dystrophy of a liver, bringing biochemical indicators into limits of physiological norm for this species of animals. Hepatoprotective activity is more expressed at application of remaxol. Studied medician possess the expressed endothelioprotective activity on the chosen model of pathology and lead to decrease in factor of endothelial dysfunction and its approach to level of intact animals.

**Keywords:** antituberculosis drugs, remaxol, S-adenosyl-L-methionine, endothelioprotective activity, hepatoprotective activity.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ РЕМАКСОЛА И АДЕМЕТИОНИНА ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ ОСНОВНОГО РЯДА

Суханов Д.С.<sup>1,2</sup>, Виноградова Т.И.<sup>2</sup>, Павлова М.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет  
им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, РФ

<sup>2</sup>ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии  
Минздрава России, Санкт-Петербург, РФ

**Резюме.** В опытах на крысах-самцах изучена гепатозащитная активность ремаксола и адеметионина при моделировании повреждения печени противотуберкулезными препаратами основного ряда. Установлена способность исследуемых препаратов корректировать структурно-функциональные нарушения печени, возникающие под влиянием противотуберкулезных препаратов. По влиянию на величину биохимических показателей и гистологическую картину печени максимальный эффект достигнут при использовании ремаксола. При обследовании больных туберкулезом органов дыхания с проявлениями лекарственной гепатотоксичности установлено выраженное положительное влияние ремаксола на проявления цитолитического синдрома, при этом адеметионин превосходил ремаксол по влиянию на холестатические проявления.

**Ключевые слова:** повреждение печени, противотуберкулезные препараты, ремаксол, адеметионин.

**Введение.** Патология печени, являющейся центральным органом химического гомеостаза, у больных туберкулезом отличается разнообразием этиологических и патогенетических факторов, среди которых выделяют специфические и неспецифические изменения. Первое место в ряду неспецифических изменений занимают лекарственные поражения печени [1, 2]. Известно, что практически все используемые во фтизиатрии этиотропные препараты обладают гепатотоксическим действием различной степени выраженности. Более того, в работах С.В. Яковлева (1996 и др.) подчеркнуто, по выраженности гепатотоксического эффекта противотуберкулезные препараты занимают лидирующие позиции среди всех антибактериальных средств [3].

По мнению В.А. Хазанова (2009), в основе большинства внутриклеточных патологических процессов лежит митохондриальная дисфункция, оптимальным способом коррекции которой является активация сукцинатаксидазного окисления, обладающего мощной энергопродукцией. Введение экзогенного сукцината способствует нормализации аэробного окисления в митохондриях, устраняет разобщение окислительного фосфорилирования и угнетения микросомальных процессов [4].

Новый сукцинатсодержащий гепатопротекторный препарат ремаксол доказал свою эффективность в ряде доклинических и клинических исследований [5]. Входящий в его состав метионин, способный к превращению в организме в адеметионин под действием метионаденозилтрансферазы, является эндогенным донором метильной группы. Адеметионин участвует в биологических реакциях трансметилирования, обеспечивающих текучесть и поляризацию мембран за счет увеличения содержания фосфолипидов, и транссульфатирования, восстанавливающих пул эндогенного глутатиона [6].

**Цель исследования:** сравнительное экспериментально-клиническое изучение активности ремаксолола и экзогенного адеметионина при поражении печени противотуберкулезными препаратами.

**Материалы и методы.** Экспериментальная часть. Эксперимент выполнен в лаборатории экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии на 24 белых беспородных крысах-самцах в соответствии с Правилами лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»). Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдались в соответствии с «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123».

Повреждение печени моделировали по методике Ю.И. Сливки (1989) путем введения противотуберкулезных препаратов (ПТП) в дозах: изониазид (Н) 50 мг/кг, подкожно + рифампицин (R) 250 мг/кг, внутривенно + пиразинамид (Z) 45 мг/кг, внутривенно. Длительность применения ПТП — 14 дней [7].

В эксперименте методом рандомизации сформировано 4 группы животных:

1. Интактные крысы (n=6);
2. Контрольная группа (n=6), животные которой получали противотуберкулезные препараты HRZ;
3. Крысы, получавшие ремаксол 25 мл/кг внутривенно на фоне противотуберкулезных препаратов (n=6)
4. Крысы, получавшие адеметионин в дозе 0,09 мг/100 г массы тела внутривенно на фоне противотуберкулезных препаратов (n=6).

Исследуемые препараты применяли за 1,5 часа до введения противотуберкулезных препаратов. Интактные животные получали физиологический раствор в эквивалентных количествах. Все исследуемые вещества вводили один раз в сутки, ежедневно на протяжении 14 дней.

В комплексе биохимических исследований определяли уровень общего билирубина (мкмоль/л), общего белка (г/л), холестерина (ммоль/л), триглицеридов (ммоль/л), маркеры цитолиза (по активности ферментов аланинаминотрансферазы (АлАТ, Е/Л) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ, Е/Л)) и маркеры холестаза (по уровню щелочной фосфатазы (Е/Л)). Для патоморфологических исследований кусочки печени фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, осуществляли стандартную проводку, заливали в целлоидин — парафин — масло, срезы (4–6 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином, PAS и PAS+амилаза.

Для каждого из исследуемых препаратов оценивали индекс эффективности гепатопротекторного действия ИЭ (%) — долевая разница показателей тяжести поражения печени в контрольной группе и в группах животных, получавших исследуемые препараты. Положительное значение ИЭ (плюс-эффект) указывает на снижение показателя пораженности. Отрицательное значение ИЭ (минус-эффект) свидетельствует об увеличении показателя пораженности.

Клиническая часть. На базе отделения терапии туберкулеза легких Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии обследовано

80 пациентов впервые выявленным туберкулезом органов дыхания. Среди больных преобладали мужчины — 54 (67,5%), средний возраст —  $32,5 \pm 4,8$  года. Критерии включения в исследование: возраст от 18 до 60 лет, впервые выявленный инфильтративный или диссеминированный туберкулезный процесс, наличие лекарственного поражения печени с уровнем активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) более 1,5 максимальных норм. Критерии исключения: наличие положительных серологических маркеров хронических вирусных гепатитов. Доминирующей клинической формой туберкулеза был инфильтративный, который регистрировали у 66 (82,5%) больных, при этом распад определялся в 58,8%, а бактериовыделение — у 51,3%.

Методом рандомизации больные, участвующие в исследовании, были разделены на 3 группы: основная группа (ОГ) — 30 пациентов, получающие ремаксол 400,0 мл, группа сравнения 1 (ГС1) — 30 пациентов, получающие адеметионин 400,0 мг, группа сравнения 2 (ГС2) — 20 больных, где в качестве препарата сравнения применяли 5% раствор глюкозы в объеме 400 мл. Изучаемые препараты назначали внутривенно капельно 1 раз в сутки курсом 10 дней. Больные исследуемых групп существенно не отличались по возрастно-половому составу и характеристике туберкулезного процесса.

Всем больным при лечении специфического процесса использовали 1 или 3-й режимы химиотерапии с применением противотуберкулезных препаратов основного ряда.

Эффективность гепатопротекторной терапии оценивали по динамике клинических проявлений лекарственной гепатотоксичности, активности индикаторных цитолитических печеночных ферментов и биохимических маркеров холестаза. Значимыми считали изменения активности биохимических показателей более чем на 10% от исходного уровня.

При оценке полученных результатов использовали параметрический тест Стьюдента–Фишера и непараметрический тест Манна–Уитни — критерий U.

**Результаты и их обсуждение.** Анализ результатов биохимического тестирования показал, что у крыс, получавших в течение 14 дней только противотуберкулезные препараты, по сравнению с интактными имели место увеличение активности в 1,5 раза ( $p < 0,002$ ) щелочной фосфатазы; гиперхолестеринемия; возрастание в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ) уровня триглицеридов; нарушение пигментного обмена по содержанию общего билирубина ( $12,8 \pm 0,78$  мкмоль/л против  $8,08 \pm 0,62$  мкмоль/л,  $p < 0,001$ ), нарастание в 1,5–1,6 раза ( $p < 0,001$ ) активности ферментов АлАТ и АсАТ. Все вышеизложенное свидетельствует о развитии у животных под воздействием противотуберкулезных препаратов поражения печени по типу цитолиза и холестаза, что соответствует данным литературы [8–10].

В условиях применения ремаксола и адеметионина наблюдали купирование гепатотоксических проявлений противотуберкулезных препаратов, при этом значения биохимических показателей восстанавливались до интактного уровня. По влиянию на величину показателей, отражающих функциональное состояние печени, максимальный эффект был достигнут при использовании ремаксола, где индекс эффективности (ИЭ) составил +29,8%, менее значительные результаты получены на фоне адеметионина — +19,4%, что в 1,5 раза ниже ремаксола.

Важно отметить, что под влиянием ремаксола происходила нормализация активности аланинамино- и аспартатаминотрансфераз — наиболее чувствительных индикаторов повреждения клеток печени, а также щелочной фосфатазы — маркера холестаза. По средней суммарной величине ИЭ преобладающим оказалось действие ремаксола (+33,1%), при введении адеметионина +23,7%.

Гистологическое исследование срезов ткани печени выявило у контрольных крыс, получавших только противотуберкулезные препараты, значительные нарушения структуры органа. Гепатоциты, расположенные в центральных отделах печеночных долек, были

резко увеличены в размерах, округлились, суживая просвет соответствующих синусоидов, что привело к нарушению балочной композиции печени и к увеличению междольковых пространств. При этом в гепатоцитах при окраске PAS и PAS+амилаза обнаружены отчетливые признаки углеводной, белковой и диффузной, резко выраженной жировой дистрофии. В цитоплазме гепатоцитов регистрировали крупные липидные вакуоли. Отмечены отчетливые признаки некробиоза гепатоцитов: кариопикноз и мелкие фокусы некротизированных гепатоцитов (в 5 из 6 случаев). При окраске PAS единичные дольки, содержащие гликоген, сохранились только в 1-м из 6 случаев.

Ремаксол способствовал значительному снижению признаков токсического поражения ткани печени ПТП. Отчетливо улучшилась архитектоника печени: восстановилась балочная структура долек, их правильное радиальное направление и уменьшилось междольковое пространство. Не отмечалось признаков некробиоза. Уменьшалась степень выраженности углеводной дистрофии: во всех случаях сохранялись группы долек, содержащих гликоген при окраске PAS. Жировая дистрофия была выражена слабо и только в отдельных группах гепатоцитов в междольковых пространствах. Сохранялись признаки белковой дистрофии гепатоцитов, но и они были значительно слабее, чем в контроле лечения.

Важно подчеркнуть, что в 3-х из 6 случаев в междольковых пространствах обнаружены группы гепатоцитов с более интенсивной, чем у остальных окраской цитоплазмы и ядер, а также менее отчетливым строением последних, что расценивается в качестве признака внутриклеточной регенерации.

У крыс, получавших адеметионин совместно с ПТП, также отмечена нормализация структуры печени и снижение степени выраженности углеводной, белковой и жировой дистрофии, как и при применении ремаксол. Однако препарат слабо влиял на процессы некробиоза (мелкие фокусы некроза гепатоцитов зарегистрированы в 4-х из 5 случаев), более того, в одном случае обнаружен крупный очаг некроза, что свидетельствовало о возможной стимуляции альтерации печеночной ткани адеметионином, выявленной и в других наших исследованиях.

Таким образом, по данным морфологического анализа срезов ткани печени, только один из изученных препаратов, а именно ремаксол, оказал четко выраженный эффект снижения структурных нарушений печени, вызванных противотуберкулезными препаратами, что проявлялось в восстановлении архитектоники органа, сокращении распространенности углеводной, белковой и жировой дистрофии, активации процессов внутриклеточной регенерации.

В клинической части работы до начала терапии клинические проявления лекарственной гепатотоксичности определялись у 26,6% больных ОГ, 23,3% в ГС1 и у 25,0% пациентов ГС. Доминирующим синдромом был диспепсический (тошнота, рвота, боли и тяжесть в правом подреберье, чувство горечи во рту) — у 23,3% обследованных ОГ и ГС1 и у 20,0% у в ГС2. В 10,0% случаев у пациентов ОГ он протекал изолированно, в 23,3% сочетался с астеновегетативным (резкая слабость, утомляемость), у 1 пациента выявлялся изолированный астеновегетативный синдром. У пациентов ГС1 в 16,6%, а в ГС2 — в 10% наблюдалось сочетание диспепсического и астеновегетативного синдромов. Изолированного астеновегетативного синдрома у пациентов групп сравнения зарегистрировано не было.

Исчезновение клинических проявлений токсического поражения печени у больных в ОГ и ГС1 отмечалось: диспепсического синдрома — на 3-й день, астеновегетативного — на 5-й день. Сравнивая влияние раствора ремаксол, адеметионина и 5% глюкозы на клиническую картину лекарственной гепатотоксичности, показано уменьшение на 2–3 дня раньше проявлений диспепсического, астеновегетативного синдромов у больных, получавших ремаксол и адеметионин.

При оценке цитолитического синдрома у больных до начала лечения активность АлАТ в основной группе была повышена в 6 раз, в ГС1 в 6,3 раза, а у больных ГС2 — в 5,7 раза по сравнению с нормой.

По окончании терапии (основная группа больных) снижение в 2,8 раза от исходного уровня активности АлАТ наблюдалось у 90,0% больных. В группе сравнения 1 снижение уровня активности АлАТ в 2 раза от исходного фона достигнуто у 70,0% пациентов (индивидуальная динамика снижения показателя составила в этих группах —153,6 и — 101,5 МЕ/л соответственно,  $p < 0,05$ ). При этом конечная активность фермента у больных в ГС1 в 1,5 раза превышала таковую у больных ОГ, составив  $129,2 \pm 13,3$  МЕ/л. У больных ГС2 снижение уровня АлАТ в 1,4 раза регистрировалось в 43,3% случаев (индивидуальная динамика снижения показателя составила 61,3 МЕ/л,  $p < 0,05$  в сравнении с аналогичными значениями ОГ и ГС1). Нормализация показателя у обследованных больных отмечалась в 26,6%, 16,7% и 13,3% случаев в ОГ, ГС1 и ГС 2 соответственно.

Исходные значения коэффициента де Ритиса у обследованных пациентов составили  $0,75 \pm 0,07$ ,  $0,68 \pm 0,07$  и  $0,74 \pm 0,08$  в ОГ, ГС1 и ГС2 соответственно. По окончании терапии у 60% больных ОГ показатель повысился в 1,6 раза, аналогичная тенденция прослеживалась и у пациентов ГС1 – в 36,7% отмечался рост коэффициента в 1,4 раза. У больных ГС2 отмечалось наибольшее повышение средних значений коэффициента де Ритиса ( $0,87 \pm 0,09$  против  $0,67 \pm 0,07$  и  $0,48 \pm 0,04$  у больных ОГ и ГС1 соответственно), что связано небольшим превалированием активности АлАТ над АсАТ по окончании терапии в этой группе пациентов на фоне высоких средних значений.

Гипербилирубинемия при отсутствии клинических проявлений желтухи наблюдалась у 13,3% пациентов ОГ, 23,3% больных ГС1 и в 16,7% случаев ГС2 при нормальных средних показателях уровня билирубина. По окончании терапии снижение уровня билирубина до нормальных значений отмечалось в 10% случаях больных ОГ, 13,3% в ГС1 и 6,7% в ГС.

Наиболее чувствительным маркером холестатического синдрома является активность секреторных ферментов гепатоцитов — и, прежде всего,  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы (ГГТП). Активность ГГТП у пациентов ОГ, изначально повышенная в 2,1 раза ( $102,0$  ЕД/л), имела тенденцию к снижению, составив на 11-й день  $82,9 \pm 9,3$  ЕД/л. Исходно повышенная активность ГГТП регистрировалась у 46,7% больных, а к окончанию терапии у больных основной группы отмечено ее снижение на 28,1% в 26,7% случаев. У пациентов ГС1 исходно повышенная активность в 2,3 раза регистрировалась в 56,7% случаев, составив  $112,6 \pm 11,1$  ЕД/л. На фоне терапии адеметионином показатель снизился в 2,6 раза у 40,0% пациентов, составив  $43,2 \pm 4,1$  ЕД/л ( $p < 0,05$  в сравнении с ОГ), при этом в 33,3% случаев отмечалась нормализация уровня фермента. У пациентов ГС2 повышенная в 2 раза активность ГГТП регистрировалась в 50,0% случаев, составив  $98,7 \pm 10,3$  ЕД/л. По окончании терапии показатель снизился в 1,2 раза у 26,7% больных, а нормализация активности фермента регистрировалась в 13,3% случаев, среднее конечное значение уровня фермента составил  $84,5 \pm 11,1$  ( $p < 0,05$  в сравнении с ГС1).

#### **Выводы.**

1. Под влиянием противотуберкулезных препаратов у крыс развивается повреждение печени, сопровождающееся повышением активности индикаторных ферментов и дистрофическими изменениями печеночной ткани с признаками некробиоза гепатоцитов.

2. Максимальный гепатопротективный эффект отмечен при использовании ремаксола, оказывающего четко выраженный эффект снижения структурных нарушений печени, что проявлялось в восстановлении гистоархитектоники органа, сокращении распространенности углеводной, белковой и жировой дистрофии с активацией процессов внутриклеточной регенерации.

3. Применение ремаксола у больных туберкулезом органов дыхания с проявлениями лекарственной гепатотоксичности показало более значительное положительное влияние на проявление цитолитического синдрома по сравнению с адеметионином, при этом последний был эффективнее для коррекции холестатических проявлений, что обуславливает дифференцированный подход к назначению данных гепатопротекторов.

## Литература

1. Борзакова, С.Н. Лекарственные поражения печени у детей, больных туберкулезом / С.Н. Борзакова, В.А. Аксенова, А.Р. Рейзис // Туберкулез и болезни легких. – 2010. – № 8. – С. 3-12.
2. Anti-tuberculosis drug induced hepatitis – a Sri Lankan experience / W.V. Senaratne [et al.] // Ceylon Med. J. – 2006. – Vol. 51, № 2. – P. 9-14.
3. Яковлев, С.В. Клиническая химиотерапия бактериальных инфекций / С.В. Яковлев. – М.: Ньюдиамед, 1996. – 120 с.
4. Хазанов, В.А. Фармакологическая регуляция энергетического обмена / В.А. Хазанов // Эксперим. клинич. фармакол. – 2009. – № 34. – С. 61-64.
5. Коваленко, А.Л. Эффективность оригинального препарата «Ремаксол, раствор для инфузий» при поражениях печени различного генеза / А.Л. Коваленко, Д.С. Суханов, М.Г. Романцов // Фармацевт. промышл. – 2010. – № 4. – С. 58-61.
6. Никитин, И.Г. Гепатопротекторы: мифы и реальные возможности / И.Г. Никитин // Фарматека. – 2007. – № 13. – С. 14-18.
7. Сливка, Ю.И. Сравнительная характеристика гепатотоксичности изониазида, рифампицина и пиперазина / Ю.И. Сливка // Фармакол. и токсикол. – 1989. – № 4. – С. 82-85.
8. Литвинов, А.В. Лекарственная коррекция гепатотоксичности изониазида и сочетания изониазида с рифампицином: автореф. дис. ... канд. мед. наук. / А.В. Литвинов. – М., 1984. – 19 с.
9. Скакун, Н.П. Сравнительная гепатотоксичность изониазида, рифампицина и этамбутола / Н.П. Скакун // Пробл. туберкулеза. – 1991. – № 10. – С. 77-79.
10. Саратиков, А.С. Влияние гепатопротекторов, содержащих фосфолипиды, на зависимую от цитохрома Р-450 антиоксидантную функцию печени при экспериментальном токсическом гепатите / А.С. Саратиков, А.И. Венгеровский // Бюл. эксперим. биол. – 1999. – № 4. – С. 293-394.

Поступила 11.07.2012

## EXPERIMENTAL JUSTIFICATION AND CLINICAL STUDYING OF HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF REMAXOL AND ADEMETHIONINE IN LIVER INJURY INDUCED BY ANTITUBERCULOSIS ESSENTIAL DRUGS

**Sukhanov D.S., Vinogradova T.I., Pavlova M.V.**

*Mechnikov Northwest State Medical University, St. Petersburg, Russia  
St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, Russia*

The hepatoprotective activity of remaxol and ademethionine was studied on a model of the liver injury induced by antituberculosis essential drugs. It was shown that remaxol and ademethionine were able to correct the structural and functional disorders in the liver due to the use of the antituberculosis drugs. On influence on size of biochemical indicators and a histological picture of a liver the maximum effect will reach when using remaxol. At inspection of patients by lung tuberculosis with manifestations of a medicinal hepatotoxicity the expressed positive influence of remaxol on manifestations of a cytolytic syndrome is established, thus ademethionine surpassed remaxol in influence on cholestatic manifestations.

**Keywords:** liver injury, antituberculosis drugs, remaxol, ademethionine.

## ПРИЧИНЫ РАННИХ И ПОЗДНИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО СПОНДИЛИТА

**Вишневецкий А.А., Бурлаков С.В., Олейник В.В.**

*СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России*

**Резюме.** Проведена ретроспективная оценка хирургического лечения 364 больных туберкулезным спондилитом (ТС). Частота ранних и поздних осложнений хирургического лечения ТС составили 13,4% от всех проведенных операций. Анализ полученных результатов выявил зависимость количества осложнений от сроков выявления заболевания и времени проведения оперативного вмешательства, а также от сопутствующих осложнений заболевания. Ранние послеоперационные осложнения были представлены нозокомиальной инфекцией. Поздние осложнения ТС в основном были связаны с несостоятельностью переднего спондилодеза, прогрессированием специфического процесса на фоне лекарственной устойчивости микобактерии туберкулеза, а также дегенеративно-дистрофическими процессами в позвоночнике вследствие нарушения его биомеханики.

Высказано предположение о целесообразности раннего оперативного вмешательства и пролонгированного курса химиотерапии с учетом чувствительности возбудителя инфекции.

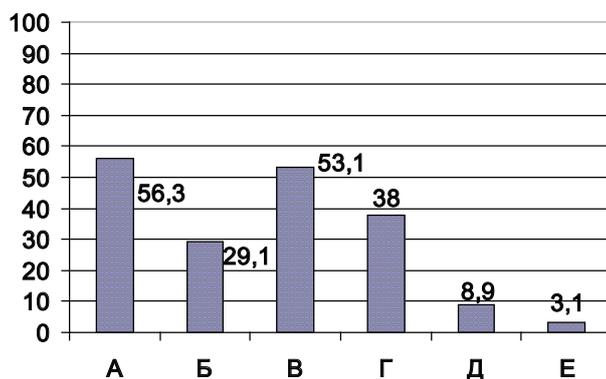
**Ключевые слова:** туберкулез, спондилит, осложнения операций.

**Введение.** Туберкулезный спондилит (ТС) относится к разряду тяжелых инвалидизирующих заболеваний. Многие авторы отмечают большой процент распространенных форм спондилитов, осложненных полиорганными и многоуровневыми поражениями, которым сопутствуют выраженные деформации позвоночника, абсцессы, свищи и неврологические нарушения [1, 2]. Причинами осложненного течения при хирургии позвоночника являются не только интраоперационные хирургические и анестезиологические ошибки, но и отсроченные и поздние осложнения, обусловленные нозокамиальной инфекцией, обострением хронических заболеваний, а также различными ортопедическими проблемами (нарастание деформаций позвоночника вследствие несостоятельности спондилодеза, его нестабильности, обусловленной неэффективностью его фиксации или смещением трансплантатов и фиксирующих элементов конструкций и т.д.). В последнее время как отдельную нозологическую форму выделяют синдром оперированного позвоночника (FBSS, fail back surgery syndrome), частота возникновения которого достигает 15–40% [3]. Имеющиеся немногочисленные работы, посвященные осложнениям радикально-восстановительных операций (РВО) при ТС [1, 4], к сожалению, недостаточно полно освещают причины и механизмы возникновения указанных симптомов, что подтверждает актуальность темы исследования.

**Цель исследования:** изучение видов и специфики осложнений хирургического лечения ТС, а также разработка мероприятий по их предупреждению.

**Материалы и методы.** Проведена ретроспективная оценка осложнений хирургического лечения 364 пациентов с ТС, находившихся в Санкт-Петербургском НИИ фтизиопульмонологии в период с 2008 по 2010 гг., в том числе пациентов, направленных из других регионов в связи с наличием осложнений после оперативного лечения. Мужчин было 230 (63,2%), женщин 134 (36,8%). Средний возраст составил 52 года (от 24 до 74 лет). Пациенты поступали в клинику в различные сроки от начала заболевания: 3–6 мес. — 91 пациент (25,0%), 6–12 мес. — 109 (30,0%) и более 12 мес. — 164 пациента (45,0%). В соответствии с этими сроками пациенты были распределены на 3 группы.

Направленные на оперативное лечение пациенты были как с неосложненным (43,7%), так и осложненным течением ТС (56,3%). Неврологические нарушения имели место у 193 (53,1%) пациентов и у 32 пациентов (8,9%) были нарушения функции тазовых органов. Паравертебральные и эпидуральные абсцессы обнаружены у 324 пациентов (89%), в том числе, натечные абсцессы — в 138 случаях (38%). Структура больных ТС с учетом распространенности туберкулезного процесса и наличием осложненных форм представлена на рисунке.



А — осложненные формы; Б — множественные формы; В — неврологические нарушения;  
Г — натечные абсцессы; Д — нарушения функции тазовых органов;  
Е — нейротрофические осложнения

Рисунок — Структура осложнений ТС (в%)

Полисегментарные и многоуровневые поражения зачастую требовали этапного хирургического лечения, поэтому пациентам выполнена 451 операция: большинству из них (330–90,6%) были произведены РВО в один этап, остальным — 34 (9,4%) осуществлены многоэтапные операции.

Бактериологическая верификация диагноза получена в 56% случаев, молекулярно-генетическая — в 80%, гистологическая — у 100% пациентов. Пролиферативно-некротическая стадия ТС выявлена у 42,7% при давности заболевания до 1 года и у 50,6% — при давности 2 года и более. Лекарственно-устойчивые штаммы микобактерий обнаружены у 55,7% пациентов (в группе ВИЧ-инфицированных пациентов — у 66,0%).

Послеоперационные осложнения выявлены у 53 (13,4%) больных, которым было выполнено 63 (14,0%) оперативных вмешательства. В зависимости от времени возникновения и в соответствии с принципами гнойной хирургии послеоперационные осложнения ТС были разделены следующим образом.

Интраоперационные и ранние послеоперационные осложнения (до 1 мес. после операции) были выявлены у 9 пациентов (17,0%). Отсроченные осложнения возникали у пациентов в сроки от 1 до 12 мес. после операции и встречались у 6 (11,3%) пациентов. Они были обусловлены прогрессированием неспецифического или специфического инфекционного процессов, а также нарастанием нейроортопедических осложнений. Поздние осложнения (ортопедические, инфекционные, метаболические) встречались у 38 пациентов (71,7%) через 1 год после операции. Столь длительный срок определяется получением пациентом стандартного курса специфической химиопрофилактики в течении 8–12 месяцев в соответствии с приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 21.03.2003 № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» (далее — приказ МЗ РФ № 109).

При резорбции аутотрансплантата выполнялась повторная резекция тел позвонков и респондилитоз небиологическими имплантатами (углеродистый углерод, никелид титана, биоситал, титановые меши в различных комбинациях). По показаниям выполнялась передняя фиксация пластинами (“Vantage”, Medtronic Sofamore Danec) или задняя внеочаговая фиксация погружными металлическими конструкциями типа CD в крючковой или транспедикулярной комплектации (“Legacy”, Medtronic Sofamore Danec). В проведенном исследовании у 8 пациентов проведено этапное хирургическое лечение с использованием переднего спондилитоза и задней ламинарной (5 пациентов) и транспедикулярной фиксациями (3 пациента).

Отдаленные результаты хирургического лечения в сроки от 1 года до 8 лет прослежены у 72% больных (262 человека). Анализ выполнялся по историям болезни и результатам клинко-лабораторного обследования пациентов. Рентгенологическое обследование (рентгенография, КТ и/или МРТ) выполняли через 2 недели, 3, 6 и 12 мес. после оперативного вмешательства.

Статистический анализ проведен в программе пакетов Minitab 16 программы ANOVA (дисперсионный анализ).

**Результаты и их обсуждение.** По данным литературы ревизионные операции при ТС составляют от 6 до 11% и выполняются в сроки от 1 мес. до 4 лет [4–6]. Некоторое их увеличение в последние годы обусловлено, прежде всего, расширением показаний к оперативному лечению и попытками хирургов проводить одномоментно не только радикально-восстановительный, но и корригирующий компонент хирургического лечения.

В проведенном исследовании послеоперационные осложнения выявлены у 53 больных (13,4% всех оперированных пациентов). Причинами повторных операций явились прогрессирование туберкулезного процесса и послеоперационные неспецифические инфекционные осложнения (26 пациентов — 49,1%), вертеброгенный болевой синдром (ВБС) и нарушение опорной функции позвоночника на фоне несостоятельности переднего

спондилодеза, прогрессирующей деформации или нестабильности позвоночника (27 пациентов — 52,8%).

Ранние осложнения отмечены у 9 пациентов (17% всех осложнений) и были представлены в основном присоединением нозокомиальной инфекции, которая проявлялась в виде поверхностных и глубоких нагноений послеоперационной раны, и встречались до месяца после операции. В позднем периоде выявлено преимущественное прогрессирование специфической инфекции у 17 пациентов (3,8% всех оперированных пациентов или 32,1% всех осложнений) (табл.).

Таблица — Послеоперационные осложнения туберкулезного спондилита

№	Виды осложнений	Группа 1 (N=91)	Группа 2 (N=109)	Группа 3 (N=104)	Всего (N=364)
1	<b>Ранние</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>9</b>
1.1	Поверхностные нагноения	1	4	2	7
1.2	Глубокие нагноения	-	1	1	2
2	<b>Отсроченные и поздние</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>27</b>	<b>44</b>
2.1	<i>Ортопедические</i>	2	8	17	27
2.1.1	Нестабильность металлоконструкций	1	-	1	2
2.1.2	Полная резорбция аутотрансплантата	1	3	6	10
2.1.3	Перелом аутотрансплантата	-	-	2	2
2.1.4	Вывих аутотрансплантата	-	1	1	2
2.1.5	Псевдоартроз и сегментарная нестабильность	-	3	5	8
2.1.6	Стеноз позвоночного канала	-	1	-	1
2.1.7	Болевой синдром на фоне « болезни подлежащего уровня»	-	-	2	2
2.2	<i>Инфекционный специфические</i>	3	4	10	17
2.2.1	Формирование абсцессов и свищей	1	1	4	6
2.2.2	Прогрессирование деструкции	2	3	4	9
2.2.3	Переход процесса в торпидный	-	-	2	2
	Всего осложнений	6	17	30	53
	Всего операций	103	138	210	451

При проведении статистического анализа выявлена зависимость количества осложнений от сроков заболевания. В изучаемых группах выявлена тенденция к нарастанию послеоперационных осложнений в группе больных с поздним выявлением ТС и длительным дооперационным лечением ТС (группа 3). По-видимому, это обусловлено тем, что пациенты поступали в специализированную клинику с осложненными формами. Послеоперационные гнойные осложнения были связаны, в основном, с нозокомиальной инфекцией и прогрессированием туберкулезного процесса в зоне пластики (во всех наблюдениях имела лекарственная устойчивость микобактерии туберкулеза к рифампицину и изониазиду). По-видимому, причиной роста резистентности микрофлоры являются ошибки в назначениях специфической антибиотикотерапии с учетом чувствительности МБТ по установленным режимам химиотерапии, согласно приказу МЗ РФ № 109, а также несоблюдением больными правил и сроков приема препаратов.

Наличие распространенных и осложненных форм ТС вызывает необходимость многоэтапного хирургического лечения, значительно увеличивая риск послеоперационных осложнений [1]. Так, у 17 больных (32,1% всех осложнений) имели место прогрессирование специфической или неспецифической инфекции. В основном это были пациенты с полисегментарными или многоуровневыми формами ТС. Возможными факторами, определяющими эти осложнения, были состояние системного и местного иммунитета, а также вирулентность возбудителя [7, 8]. Пониженное содержание основных регуляторных субпопуляций лимфоцитов у больных ТС, в отличие от пациентов с неспецифическим

остеомиелитом, свидетельствует о значительном нарушении у них механизмов клеточного иммунитета [9]. Выявленный клеточный иммунодефицит наряду с повышением параметров естественной резистентности, может явиться одной из иммунопатогенетических причин развития ТС. Ранее было показано [10], что обострение специфического процесса в позвоночнике достоверно чаще определялось у пациентов с множественной лекарственной устойчивостью туберкулеза.

В проведенном исследовании более половины осложнений было обусловлено нарушением опорной функции позвоночника вследствие несостоявшегося костного блока после проведенной костной пластики, что согласуется с данными других авторов [2, 5, 6]. В группах 2 и 3 наиболее часто, чем в группе 1, встречались ортопедические осложнения. Наиболее частыми причинами указанных осложнений была полная или частичная резорбция аутотрансплантата — 10 (18,7%) случаев или же сегментарная нестабильность вследствие резорбции одного из концов аутотрансплантата — 8 (15,1%) случаев. Клинические симптомы прогрессирования заболевания при этом отсутствовали. Причинами других осложнений были нестабильность металлоконструкций (2 случая), перелом аутотрансплантата (2 случая), вывих аутотрансплантата (2 случая).

Нарастание деформации позвоночника, обусловленное смещением трансплантатов и фиксирующих элементов конструкций, может приводить не только к нестабильности оперированного сегмента позвоночника, но и к дегенеративным изменениям других ПДС (стенозированию позвоночного канала, формированию грыж межпозвонкового диска выше или ниже места спондилодеза). Это обусловлено тем, что на фоне спондилодеза увеличивается нагрузка на смежные ПДС на 20–30%. У 2-х больных имелся болевой синдром на фоне «болезни подлежащего уровня», а в 1 случае — стеноз позвоночного канала. Для решения этой проблемы были использованы этапные методики лечения, позволяющие комбинировать передние и задние подходы к позвоночнику, в 2-х случаях использованы динамические системы фиксации (типа DIAM) (Sofamor Danec), а в 1 — ламинэктомия в сочетании с задней транспедикулярной фиксацией.

**Заключение.** Анализ полученных результатов выявил зависимость количества осложнений от сроков выявления заболевания и времени проведения оперативного вмешательства, а также от сопутствующих осложнений заболевания. Ранние послеоперационные осложнения были представлены нозокомиальной инфекцией. Поздние осложнения ТС в основном были связаны с несостоятельностью переднего спондилодеза или дегенеративно-дистрофическими процессами в позвоночнике вследствие нарушения его биомеханики и прогрессированием специфического процесса на фоне лекарственной устойчивости микобактерии туберкулеза. Таким образом, проведенное исследование показало, что причинами неэффективности операций по поводу туберкулезного спондилита могут быть:

- позднее выявление заболевания и неоправданно длительное консервативное лечение;
- множественная лекарственная устойчивость микобактерии туберкулеза;
- осложненные формы спондилита;
- неадекватное определение показаний к операции и неправильный выбор этапности и объема оперативного вмешательства;
- осложнения, возникающие во время операции;
- ошибки выбора объема проводимого хирургического лечения (неполноценное удаление очага и гнойного абсцесса, неполная декомпрессия нервных структур во время операции;
- неадекватная стабилизация во время операции и сохраняющаяся нестабильность ПДС после проведенной операции;

#### **Выводы:**

1. Наличие распространенных и осложненных форм туберкулезного спондилита вызывает необходимость многоэтапного хирургического лечения и в 2–3 раза увеличивает риск послеоперационных осложнений;

2. Операционные осложнения встречались у 13,4% оперированных больных.

Наиболее частыми во всех группах больных были отсроченные и поздние послеоперационные осложнения (83,0% от всех осложнений или 9,8% всех оперированных больных);

3 Основными причинами осложнений явилось ошибки при реализации хирургических технологий, ошибки в послеоперационном ведении больных и их реабилитации, а также множественная лекарственная устойчивость МБТ к проводимой химиотерапии, выявленная у 55% оперированных больных.

4. С целью предупреждения послеоперационных осложнений необходима своевременная диагностика, ранние оперативные вмешательства, пролонгированное лечения больных в послеоперационном периоде противотуберкулезными препаратами с учетом чувствительности МБТ и по установленным режимам химиотерапии, согласно приказу МЗ РФ № 109.

#### Литература

1. Ближайшие и отдаленные осложнения после операций, проведенных по поводу туберкулезного спондилита / С.В. Бурлаков [и др.] // Совершенствование медицинской помощи больным туберкулезом: тез. науч.-практ. конф. – СПб, 2011. – С. 285-286.
2. Радикальное хирургическое лечение осложненных форм туберкулеза поясничного отдела позвоночника / С.О. Мирзоев [и др.] // Науч. тр. всерос. науч. практ. конф. – СПб, 2008. – С. 153.
3. Борзунов, А.А. Анализ рецидивов и хирургическая профилактика осложнений грыж межпозвонковых дисков на поясничном уровне: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.28 / А.А. Борзунов. – М., 2006. – 103 л.
4. Назаров, С.С. Влияние лекарственно устойчивых МБТ на распространенность и течение туберкулезного спондилита / С.С. Назаров, В.В. Олейник // Материалы всерос. науч. практ. конф. – СПб., 2010. – С. 218.
5. Гарбуз, А.Е. Костная пластика при ограниченных формах туберкулезного спондилита / А.Е. Гарбуз, С.А. Тиходеев, В.В. Олейник // Пробл. туберкулеза. – 1991. – № 1. – С. 38-51.
6. Куклин, Д.В. Задняя инструментальная фиксация позвоночника при туберкулезном спондилите и гематогенном остеомиелите позвоночника: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Д.В. Куклин. – СПб, 2005. – 19 с.
7. Перецманос, Е.О. Причины появления инвалидизирующих форм туберкулезного спондилита / Е.О. Перецманос // Пробл. туберкулеза. – 2002. – № 8. – С. 6-7.
8. Иммунологические аспекты костно-суставного туберкулеза осложненные лекарственной устойчивостью к штаммам микобактерии туберкулеза / Е.И. Потапенко [и др.] // Мед. иммунол. – 2009. – Т. 11, № 4-5. – С. 394-395.
9. Роль иммунологических показателей при туберкулезе и остеомиелите позвоночника / О.В. Керко [и др.] // Мед. иммунология. – 2005. – № 2-3. – С. 243-244.
10. Роль молекулярно-генетических методов в диагностике туберкулезного спондилита / Г.Ю. Васильева [и др.] // Инновационные технологии в организации фтизиатрической и пульмонологической помощи населению: тез. науч.-практ. конф. – СПб, 2011. – С. 81.

Поступила 29.06.2012

## THE CAUSES OF EARLY AND LATE COMPLICATIONS OF SURGICAL TREATMENT TUBERCULOSIS SPONDYLITIS

Vishnevskiy A.A., Burlakov S.V., Oleynik V.V.

*S-Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, Department of the Spine Surgery,  
S-Petersburg, Russia*

The retrospective estimation of surgical treatment of 364 patients with tuberculosis spondylitis (TS) was carried out. Frequency of early and late complications of TS surgical treatment was 13.4% of all performed operations. The analysis of the results obtained has revealed dependence of quantity of complications on terms of the disease revealing and time of carrying out of operative intervention, and also on accompanying complications of disease. Early postoperative complications have been presented nosocomial infection. Late complications of the tuberculosis spondylitis basically have been connected with an inconsistency forward spondilodesis, progressing of specific process against medicinal stability mycobacterium tuberculosis, or are degenerate-dystrophic processes in a backbone owing to infringement of its biomechanics. The assumption of expediency of early operative intervention and the prolonged course of chemotherapy taking into account sensitivity of the activator of an infection is come out.

**Keywords:** tuberculosis, spondylitis, complications of surgical treatment.

## ПЕРВИЧНАЯ И ПРИОБРЕТЕННАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ/СПИД В БЕЛАРУСИ

Еремин В.Ф.<sup>1</sup>, Гасич Е.Л.<sup>1</sup>, Сосинович С.В.<sup>1</sup>, Ильенкова В.С.<sup>2</sup>, Ерамова И.<sup>3</sup>, Карпов И.А.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь;

<sup>2</sup>Страновое региональное бюро ВОЗ, Минск, Беларусь;

<sup>3</sup>Европейское региональное бюро ВОЗ, Копенгаген, Дания;

<sup>4</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

**Резюме.** В статье представлены данные об обнаружении мутаций резистентности у первично выявленных пациентов, не находящихся на высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) и у пациентов, находящихся на ВААРТ, а также описаны субтипы ВИЧ-1, выявляемые в данных группах пациентов. Из 82 образцов ДНК, изолированных от найденных пациентов с ВИЧ/СПИД, 5 (6,1%) имели мутации резистентности, из которых 2 (2,4%) – Т69I ассоциированы с нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы (НИОТ) и 3 (3,7%) — M46L/ с ингибиторами протеазы (ИП). Из 37 образцов плазмы крови, собранных от пациентов-взрослых, находящихся на ВААРТ, в 70% случаев определялась мутация в положении M184V и в 51% — K103N, определяющих высокий уровень резистентности к НИОТ и ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ), соответственно. В 27% случаев выявлялась мутация в положении G190A/S, которая, связана с высоким уровнем резистентности к невирапину (NVP). Из 15 образцов ДНК, выделенных от пациентов-детей, находящихся на ВААРТ, в 80% всех случаев, выявлялась мутация в положении M184V и в 53,3% мутация в положении G190S, определяющие высокий уровень резистентности к НИОТ и ННИОТ, соответственно. В 20% случаев была обнаружена мутация в положении Y181C, которая связана с высоким уровнем резистентности к невирапину и делавирдину (DLV).

**Ключевые слова:** ВИЧ, субтипы, резистентность, ВААРТ, ИП, НИОТ, ННИОТ, секвенирование, филогенетический анализ.

**Введение.** Первый случай ВИЧ-инфекции в Белоруссии был выявлен в НИИ эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь в 1986 г. Пациентом оказался студент из Бурунди. В 1990 г. был зарегистрирован первый случай СПИД в стране у женщины — жительницы Белоруссии.

С 1986 по 1996 гг. количество случаев ВИЧ/СПИД, выявляемых ежегодно в Беларуси варьировало от 12 до 14. Такая ситуация по ВИЧ-инфекции наблюдалась и в соседних с республикой регионах бывшего СССР. Например, в России и Литве, странах, граничащих с Белоруссией, ежегодная заболеваемость составляла 10,2 и 10,3 на 1 млн. жителей, а в нашей стране этот показатель составлял 10,5. Основными группами риска в тот период времени являлись иностранные студенты, обучавшиеся в вузах Белоруссии, инъекционные наркомпотребители и пациенты, заражение которых произошло при гетеро- и гомосексуальных контактах. Таким образом, на начало 1996 г. ситуация по ВИЧ/СПИД в Республике Беларусь оставалась относительно благополучной и общее количество случаев ВИЧ-инфекции составляло 113 пациентов.

Летом 1996 г. в городе Светлогорске произошла вспышка ВИЧ-инфекции, среди молодых людей, вводящих наркотики внутривенно и к концу года было зарегистрировано около 800 новых случаев ВИЧ/СПИД, а общее количество пациентов увеличилось в 10 раз и достигло к концу 1996 г. 1134 случаев [1]. Большинство из них составляли молодые люди в возрасте 15–29 (>80%) лет, введившие наркотик внутривенно. Через год, к концу 1997 г. общее количество случаев ВИЧ/СПИД в Белоруссии составило уже 1787.

Ранее нами было показано, что более 87% всех пациентов с ВИЧ/СПИД-потребителей наркотиков были инфицированы ВИЧ-1 субтипа А1 (родственному таковому из Одесской

области Украины). Позднее у пациентов с ВИЧ/СПИД были обнаружены субтип В и рекомбинантная форма CRF03\_AB (родственные таковым из Николаева Украины и из Калининграда России) [2–7].

На 1 августа 2012 г. по данным официальной статистики зарегистрировано 13726 пациентов (144,8 на 100 тыс. населения) с ВИЧ/СПИД, а по расчетным данным ВОЗ в стране насчитывается примерно 25,000 ВИЧ-инфицированных; распространенность — 0,2–0,4%. 3384 пациента находятся в стадии СПИД. 8221 (59,9%) пациентов с ВИЧ/СПИД относятся к возрастной группе 15–29 лет. 45,7% (6277 пациентов) составляют ВИЧ-инфицированные наркопотребители, 51,8% (7016 случаев) заразились при гетеросексуальных контактах. Более 83% всех пациентов с ВИЧ/СПИД инфицированы ВИЧ-1 субтипа А1, который остается доминирующим на протяжении 16 лет [8, 9].

Начиная с 1998 г. на протяжении 7 лет схема терапии пациентов с ВИЧ/СПИД включала только один или два препарата, что приводило к быстрой выработке резистентности у ВИЧ и, соответственно, к не эффективности лечения. Комбинированная терапия пациентов с ВИЧ-инфекцией была внедрена в Белоруссии с 2005 г. Для стран с ограниченными ресурсами ВОЗ рекомендует проводить дозорные исследования по определению первичной резистентности ВИЧ-1 у пациентов, не получавших антиретровирусные препараты (АРВ). В Белоруссии национальная политика в области лечения пациентов с ВИЧ/СПИД с 2005 г. проводится в соответствии с рекомендациями ВОЗ по лечению данной группы пациентов. В настоящее время более 3000 ВИЧ-инфицированных в Белоруссии находятся на ВААРТ. И можно говорить об эффективности применяемых схем лечения, поскольку, начиная с 2007 г. в стране было выявлено только 52 пациента (из них 15 детей в возрасте 7–16 лет) с высоким уровнем резистентности ВИЧ-1 к АРВ.

**Материалы и методы.** Для амплификации региона гена *pol* длиной 1800 пар нуклеотидов (протеаза и 2/3 обратной транскриптазы) ВИЧ-1 была использована тест-система ViroSeq «HIV-1 genotyping system software v.2.6 analysis», Celera Diagnostics, ABBOTT, USA.

Вирусная РНК была изолирована из 0.5 мл плазмы крови с применением модуля для выделения РНК ViroSeq «HIV-1 Genotyping System v.2.0», Celera Diagnostics, ABBOTT, USA.

Обратная транскрипция и последующая ПЦР были выполнены с использованием модуля коммерческого набора ViroSeq «HIV-1 Genotyping System v.2.0» Celera Diagnostics, ABBOTT, USA.

Очистку фрагментов ДНК после ПЦР проводили с использованием модуля для очистки коммерческого набора ViroSeq «HIV-1 Genotyping System v.2.0» Celera Diagnostics, ABBOTT, USA.

Секвенирующую ПЦР проводили с использованием модуля для секвенирующей ПЦР, коммерческого набора ViroSeq «HIV-1 Genotyping System v.2.0» Celera Diagnostics, ABBOTT, USA. Очистку фрагментов ДНК после секвенирующей ПЦР осуществляли спирт/ацетатной преципитацией

Электрофорез фрагментов ДНК после очистки проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3100-Avant, Applied Biosystems, USA.

Для определения мутаций резистентности использовали коммерческие базы данных ViroSeq «HIV-1 genotypin gsystem» software v.2.6, Celera Diagnostics, ABBOTT, USA, а также «Sequencing Analysis» v.5.1.1, BioEdit, SeqScape, «HIV Drug Resistance Database» Stanford University.

Для определения первичных мутаций резистентности использовали перечень ВОЗ 2009 г.

Филогенетический анализ проводили с использованием программы MEGA4.1.

Последовательности ДНК по гену *pol* ВИЧ-1 были зарегистрированы в Международную базу данных EMBL/Genbank/DDBJ.

**Результаты и их обсуждение.** Из 82 исследованных образцов сыворотки/плазмы крови, полученных от ВИЧ-инфицированных, не находящихся на ВААРТ, 43 (51,8%) были от лиц женского пола и 39 (47%) — от мужчин. Средний возраст пациентов составил 32–36 лет. 81,7% (67) из обследованных лиц клинический диагноз был поставлен 1-3 года назад. Образцы сыворотки/плазмы крови были получены из всех областей республики и г. Минска. Из Минской области были проанализированы 12 (14,6%) образцов, из Могилевской области — 7 (8,5%), из Гомельской — 20 (24,4%), из г. Минска — 19 (23,2%), из Гродненской области — 10 (12,2%) и из Брестской — 14 (17,1%). Из 82 анализированных образцов, 74 (90%) относились к субтипу A1; 4 (4,9%) — к субтипу B; 3 (3,7%) — к рекомбинантной форме CRF03\_AB; и 1 (1,2%) — к субтипу G (рисунок). Вирус, отнесенный к субтипу A1, формировал три большие группы. Самая большая, первая группа, включала 35 образцов, полученных, в основном, из Светлогорска Гомельской области, где, как известно, в 1996 г. произошла вспышка ВИЧ-инфекции среди инъекционных наркопотребителей, и циркулирует, так называемый «светлогорский» вариант субтипа A1 [1]. Средние p-дистанции в группе составили 0,039 и варьировали в пределах 0,012-0,069, что указывает, как на недавние случаи инфицирования, так и на циркуляцию ранее занесенных в данную группу пациентов вирусов. Вторая группа состояла из 24 образцов, в основном из Гродненской области и г. Минска. Как известно, вспышки ВИЧ-инфекции среди инъекционных наркопотребителей были в г. Лиде и г. Слониме Гродненской области в начале 2000-х гг. Образцы на филогенетическом дереве группировались вокруг референс-последовательностей из Украины AF413987, России AY500393 и консенсусной последовательности IDU-A1, полученный при секвенировании образцов ДНК от наркопотребителей из Светлогорска. Средние p-дистанции составили 0,040 и варьировали в пределах от 0,026 до 0,056, что указывает на длительную циркуляцию вируса в данной группе и на независимое проникновение новых вирусов. Третью группу, включающую 12 образцов, формировали пациенты из Минской области, в основном из гг. Солигорска и Слуцка, где была вспышка ВИЧ-инфекции среди инъекционных наркопотребителей в начале 2000-х гг. Средние p-дистанции между образцами в группе составили 0,039 и варьировали в пределах от 0,023 до 0,056. На филогенетическом дереве вирусы этой группы формировали отдельный кластер и были обозначены нами как «светлогорский» изолят. Образцы AF873832, FR87227, FR873141 лежат на дереве отдельно от других групп, что указывает на независимое проникновение вирусов на территорию страны.

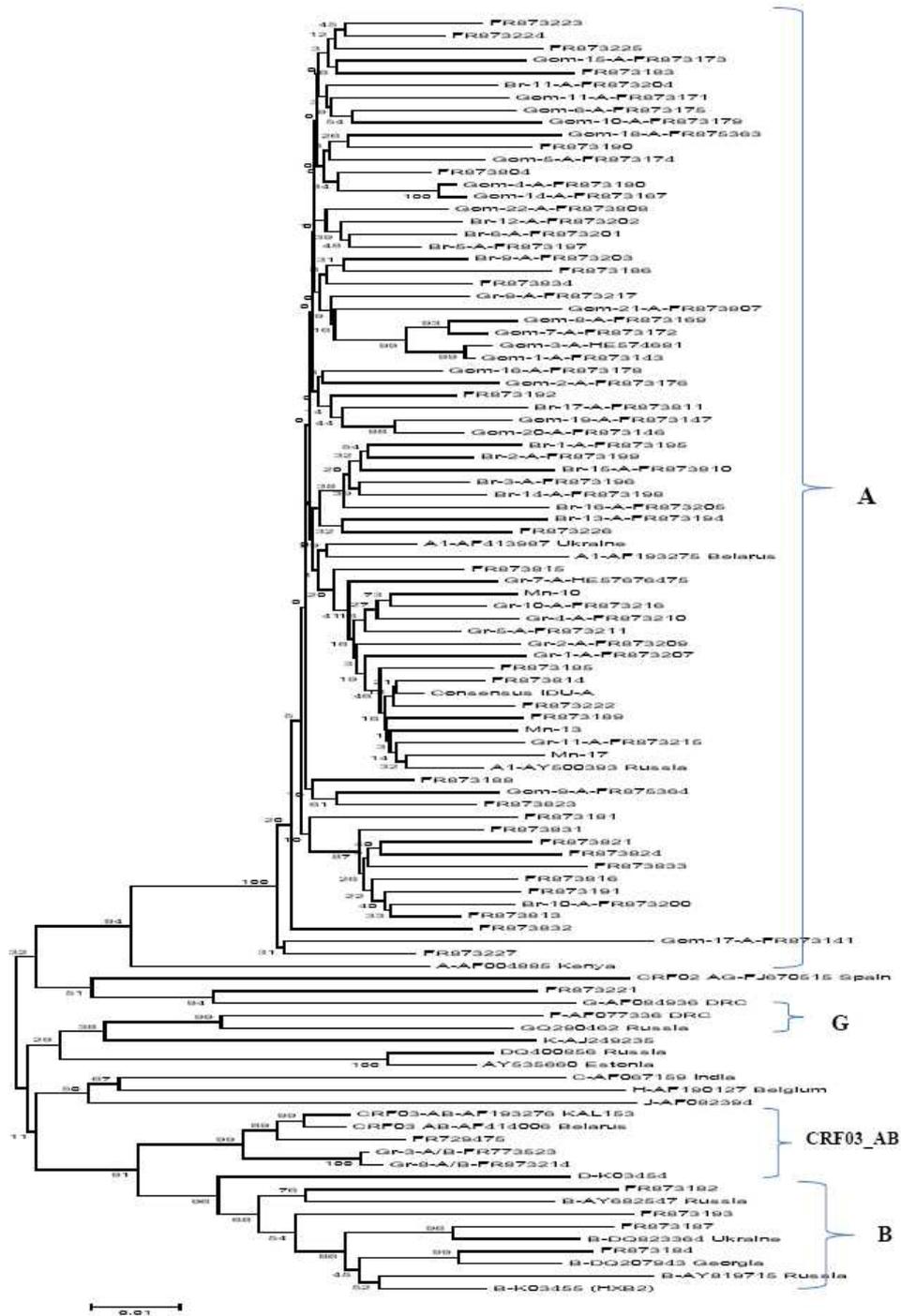


Рисунок — Филогенетическое дерево последовательностей ДНК ВИЧ-1, полученных от первично выявленных пациентов с ВИЧ/СПИД, не получавших АРТ

В пяти образцах ДНК (6,1%), полученных от наивных пациентов были выявлены ассоциированные с резистентностью мутации. Две мутации (2,4%) в положении Т69I ассоциированы с резистентностью к НИОТ, были выявлены у пациентов из Минской и Гомельской областей (мужчина-наркопотребитель и женщина, заразившаяся половым путем) и три мутации (3,7%) в положении М46L/I, связанные с резистентностью ВИЧ к ИП, были обнаружены у пациентов-женщин из г. Минска и Брестской области, заразившихся половым путем. Таким образом, основываясь на требованиях ВОЗ по оценке мутаций резистентности ВИЧ-1 к каждому классу АРП (антиретровирусных препаратов) в отдельности,

распространенность первичной резистентности на территории Беларуси была оценена как низкая (<5%) для всех классов АРП.

В 6 (7,3%) образцах ДНК были выявлены минорные по классификации ВОЗ 2009 г., мутации, представленные в международной базе данных Стэнфордского университета: L10V — ИП, ассоциирована с резистентностью к ингибиторам протеазы в присутствии других мутаций; L33F — ИП, связана со снижением чувствительности к фосапренавиру (FPV/r), дарунавиру (DRV/r), лопинавиру (LPV/r), атазанавиру (ATV/r), и типранавиру (TPV/r); V118I — НИОТ, связана со снижением чувствительности к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы, в том числе к ламивудину (ЗТС) и емтрицитабину (FTC); T74S относится к другим мутациям и ассоциируется со снижением чувствительности к нельфинавиру (NFV); и V108I — дополнительная мутация, связана с низким уровнем резистентности к NVP и ефавиренцу (EFV).

На протяжении 2009–2011 гг. в нашей лаборатории было выявлено 52 пациента с высоким уровнем резистентности ВИЧ-1, находящихся на ВААРТ. Из них 37 — взрослые и 15 детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями.

Из 37 образцов, полученных от взрослых пациентов 22 были от мужчин, средний возраст  $36,7 \pm 5,04$  (27–57) лет и 15 — от женщин, средний возраст  $36,7 \pm 4,9$  (25–44) лет. 35 (94,6%) из обследованных пациентов были инфицированы ВИЧ-1 субтипа А1 и 2 (5,4%) — CRF06\_srx. ДНК пациентов, инфицированных субтипом А1, на филогенетическом древе формировали две большие группы. Первую группу, включающую 21 образец, формировали пациенты из Светлогорска и Минска. Вирус, обозначенный как «светлогорский» находился в одной группе с референс-последовательностями AF413987 (Украина), AY500393 (Россия) и консенсусной последовательностью IDU-A1. Средние р-дистанции между образцами в группе один составили 0,052 и варьировали от 0,034 до 0,071, что указывает на длительную циркуляцию вируса в данной группе пациентов. Вторая группа состояла из 12 образцов, обозначенных как «солигорские» и формировалась изолятами ВИЧ-1 из гг. Солигорск и Слуцк. Средние р-дистанции между проанализированными последовательностями ДНК в группе составили 0,049 и варьировали от 0,031 до 0,062. В 67% всех проанализированных последовательностей ВИЧ-1 была выявлена мутация в положении M184V, а в 52,4% — K103N, которые определяют высокий уровень резистентности к НИОТ и ННИОТ, соответственно. В 26,2% случаев была обнаружена мутация в положении G190A/S, которая, как известно, обуславливает высокий уровень резистентности ВИЧ-1 к NVP.

Из 15 образцов, полученных от детей, 8 было от мальчиков, средний возраст  $9,6 \pm 1,7$  лет (7–16 лет) и 7 — от девочек, средний возраст  $10 \pm 3,6$  лет (4–16 лет). 93,3% были инфицированы ВИЧ-1 субтипа А1 и один ребенок (6,7%) был носителем рекомбинантной формы вируса CRF02\_AG. В 81% всех случаев у детей выявлялась мутация в положении M184V и в 50% — G190S, определяющие высокий уровень резистентности к НИОТ и ННИОТ, соответственно. В 19% случаев была определена мутация в положении Y181C/I/V, которая ведет к высокому уровню резистентности к невирапину (NVP) и делавирдину (DLV).

**Выводы:** Низкий уровень встречаемости резистентности (<5%) у не леченных, вновь выявленных пациентов подтверждают правильную линию рекомендаций по применению 1-й линии АРТ. Вместе с тем, контроль за первичной резистентностью ВИЧ-1 должен продолжаться с 2-х годовым интервалом. Мониторинг за циркулирующей первично резистентных штаммов ВИЧ-1, своевременное выявление таких изолятов, является основой эффективности проводимой АРТ.

#### Литература

1. Extreme founder effect in an HIV type 1 subtype A epidemic among drug users in Svetlogorsk, Belarus / V.V. Lukashov [et al.] // AIDS Res. Hum. Retroviruses. – 1998. - Vol. 14. – P. 1299-1303.
2. The HIV type 1 epidemic in Belarus: predominance of Eastern European subtype A strains and circulation of subtype B viruses / N.V. Lazouskaya [et al.] // AIDS Res. Hum. Retroviruses. – 2005. – Vol. 21. – P. 830-833.

3. Masharsky, A.E. Cloning and analysis of full-length genomes of HIV-1 strains of subtype A and CRF03\_AB prevalent among intravenous drug users in countries of the former Soviet Union / A.E. Masharsky, V.F. Eremin, A.P. Kozlov // 14th Int. AIDS Conf., Barcelona, July 7-12, 2002: abstr. – P. 365.

4. Simultaneous introduction of HIV type 1 subtype A and B viruses into injecting drug users in southern Ukraine at the beginning of the epidemic in the former Soviet Union / A.A. Nabatov [et al.] // AIDS Res. Hum. Retroviruses. – 2002. – Vol. 18. – P. 891-895.

5. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad / K. Liitsola [et al.] // AIDS. – 1998. – Vol. 12. – P. 1907-1919.

6. A sudden epidemic of HIV type 1 among injecting drug users in the former Soviet Union: identification of subtype A, subtype B, and novel gagA/envB recombinants / A.F. Bobkov [et al.] // AIDS Res. Hum. Retroviruses. – 1998. – Vol. 14. – P. 669-676.

7. Circulation of subtype A and gagA/envB recombinant HIV type 1 strains among injecting drug users in St. Petersburg, Russia, correlates with geographical origin of infections / V.V. Lukashov [et al.] // AIDS Res. Hum. Retroviruses. – 1999. – Vol. 15. – P. 1577-1583.

8. UNAIDS, the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.unaids.org/en/>. – Date of access: 18.09.2012.

9. Молекулярная эпидемиология ВИЧ/СПИД в Беларуси (2008-2011) / В.Ф. Еремин [и др.] // Здоровоохранение. – 2012. – № 1. – С. 25-34.

Поступила 18.09.2012

## PRIMARY AND ACQUIRED RESISTANCE IN BELARUS PATIENTS WITH HIV/AIDS

Eremin V.F.<sup>1</sup>, Gasich E.L.<sup>1</sup>, Sasinovich S.V.<sup>1</sup>, Ilyenkova V.S.<sup>2</sup>, Eramova I.<sup>3</sup>, Karpov I.A.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;

<sup>2</sup>WHO Country Office, Minsk, Belarus;

<sup>3</sup>WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark;

<sup>4</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

In the article we present the data on HIV drug resistance prevalence in the naïve HIV-infected patients and patients who are on HAART, as well as the data on HIV-1 subtypes revealed in given patients groups. Of 82 samples collected from naïve HIV-infected patients five sequences (6.1%) had resistance-associated mutations. These include two (2.4%) NRTI mutations — T69I, three (3.7%) PI mutations – M46L/I. According to the WHO sequential sampling method categorization of HIVDR prevalence was performed separately for each class of antiretroviral drugs (ARVs). Based on the results prevalence of tHIVDR can be classified as low (<5%) for all classes of ARVs. Of total of 82 pol sequences from naïve HIV-infected patients, 74 (90%) belong to HIV-1 subtype A1; four (4.9%) to subtype B; three (3,7%) to CRF03\_AB; and one belong to subtype G. Of 37 plasma samples collected from adult patients at HAART, in 70% of cases the M184V mutation and in 51% — K103N defining high level resistance to NRTIs and NNRTIs, accordingly were revealed. In 27% of cases the G190A/S mutation which, as it is known, is connected with high level resistance to nevirapine (NVP) has been defined. 35 (94.6%) patients have been infected by HIV-1 subtype A1, and 2 (5,4%) — CRF06\_cpx. Of 15 plasma specimens collected from children at HAART 80% of all cases the M184V mutation and 53,3% G190S mutation defining high/level resistance to NRTIs and NNRTIs, accordingly was registered. In 20% cases mutation in position Y181C, that leading to high/level resistance to nevirapine (NVP) and delavirdine (DLV) was defined. 93.3% of children have been infected by HIV-1 subtype A1 and one child (6,7%) — CRF02\_AG.

**Keywords:** HIV subtypes, resistance, HAART, PI, NRTI, NNRTI, sequencing, phylogenetic analysis.

## ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО СПОНДИЛИТА У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

Решетнева Е.В., Соловьева Н.С., Макаровский А.Н., Олейник В.В., Вишневский А.А.  
НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, С-Петербург, Россия

**Резюме.** Проведен анализ 35 историй болезни пациентов с туберкулезным спондилитом (ТС) на фоне ВИЧ-инфекции. В статье изложены особенности течения специфического процесса в позвоночнике и клинических проявлений заболевания при этой сочетанной патологии; показана необходимость хирургического лечения. Результатом проведенных радикально-восстановительных и стабилизирующих операций является восстановление опороспособности позвоночника и регресс неврологической симптоматики у пациентов, что способствует социализации и повышению качества их жизни.

**Ключевые слова:** туберкулезный спондилит, ВИЧ-инфекция.

**Введение.** Туберкулез и ВИЧ-инфекция являются распространенными социально зависимыми инфекционными заболеваниями, тесно связанными между собой патогенетически, клинически и эпидемиологически, в связи с чем отмечается тенденция к неуклонному росту случаев сочетанного поражения [1]. Авторами замечена корреляция между уровнем CD4+лимфоцитов и частотой возникновения внелегочного туберкулеза у ВИЧ-инфицированных. Например, у пациентов без существенных нарушений иммунного статуса частота внелегочного туберкулеза составляет 13,5%, в то время как у пациентов с резким снижением уровня CD4+лимфоцитов (менее 200 клеток в мкл) показатель возрастает более чем в 5 раз и регистрируется уже в 71,8% [2].

В доступной литературе имеются лишь единичные сведения об исследованиях, посвященных вопросам хирургического лечения туберкулеза позвоночника у ВИЧ-инфицированных.

**Цель исследования:** изучение клинических особенностей течения туберкулезного спондилита (ТС) у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

**Материалы и методы.** Проведен системный клинический анализ лечебных мероприятий, заболевания ТС в сочетании с ВИЧ-инфекцией. У 35 пациентов (I группа), находившихся на лечении в отделении хирургии позвоночника Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии в период с 2008 по 2011 гг. В качестве контрольной группы (II группа) рандомизированно отобраны 35 ВИЧ-негативных пациентов с ТС. Возраст пациентов колебался от 28 до 56 лет. В исследовании преобладали мужчины — 22 пациента (62,8%), женщин — 13 (37,2%). Использованы хирургический, общеклинические, рентгенологический, МРТ, биохимические, иммунологические, гистологические, бактериологический и статистический методы исследования.

У пациентов с ВИЧ-инфекцией стадию заболевания устанавливали в соответствии с Российской клинической классификацией ВИЧ-инфекции (приказ МЗ и СР РФ № 166 от 17.03.2006) (табл. 1). Из табл. 1 следует, что большинство пациентов с ТС — 32 (91,4%) имели поздние стадии ВИЧ-инфекции. Они были распределены по стадиям следующим образом: стадия 3–2 (5,7%), 4А–3 (8,6%), 4Б – 9 (25,7%), 4В – 18 (51,4%), 5 – 3 человека (8,6%).

Таблица 1 — Распределение пациентов с ТС по полу, возрасту и стадиям ВИЧ-инфекции (n=35)

Стадия ВИЧ-инфекции	Мужчины			Женщины			Всего пациентов	
	до 30 лет	30–39 лет	40–56 лет	до 30 лет	30–39 лет	40–56 лет	абс.	%
3	0	0	2	0	0	0	2	5,7
4А	1	1	0	0	1	0	3	8,6
4Б	1	4	0	1	2	1	9	25,7
4В	3	9	0	0	6	0	18	51,4
5	0	0	1	1	0	1	3	8,6
Итого	5	14	3	2	9	2	35	100

В I группе в 17 случаях (48,6%) имели место проводниковые нарушения (по шкале Frenkel/ASIA, 1992): в 5 (14,2%) — тип «А», в 2-х (5,7%) — тип «В», в 10 случаях (28,6%) — тип «С». У 5 пациентов (14,2%) были нарушения функции тазовых органов, у 18 — выраженный радикулярный (болевой) синдром. Во II группе неврологические нарушения были только в 8 случаях (22,9%).

Воспалительный процесс у пациентов I группы локализовался: в шейном отделе позвоночника — у 3-х (8,6%), грудном — у 12-ти (34,3%), грудо поясничном — у 2-х (5,7%), поясничном — у 10-ти (28,6%), пояснично-крестцовом — у 3-х (8,6%). В 5 случаях (14,2%) выявлен мультифокальный ТС с несколькими локализациями очагового процесса в позвоночнике. У пациентов без ВИЧ-инфекции распространенный туберкулезный спондилит встречался в 2,5 раза реже (7 человек — 20%), чем при ВИЧ инфекции (18 — 51,4%).

Среди ВИЧ-инфицированных пациентов оппортунистические инфекции выявлены у 30-ти пациентов: в 24-х случаях выявлен орофарингеальный кандидоз, у 16-ти — генерализованная лимфоаденопатия, у 6-ти — герпетическая инфекция, у 1 пациента в анамнезе была пневмоцистная пневмония.

У 11 пациентов I группы (31,4%) отмечены положительные серологические реакции с туберкулином, тогда как у лиц без ВИЧ-инфекции положительные реакции выявлены в 33-х случаях (II группа, 92,9% случаев). В этой группе отмечалась низкая информативная ценность реакции Манту (была положительна у 8 пациентов — 22,9%) и высокая диагностическая значимость Диаскин-теста, которые оказался положительным у 17 из 20 (чувствительность метода — 85%).

В дооперационном периоде 28 человек (80%) в I группе получали высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ). Остальные (7 человек — 20%) не получали ВААРТ по различным обстоятельствам: 3 из них не состояли на учете в центре СПИД, у 4-х начато проведение противотуберкулезной терапии (менее 2-х мес.); CD4+ у них более 350 клеток в мкл крови.

Оперированы 33 пациента I группы и 35 — II. Диагноз верифицирован по бактериологическим, молекулярно-генетическим и гистологическим методикам.

Статистическая обработка материалов проведена по стандартным таблицам с применением критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** В исследовании изучен механизм инфицирования ВИЧ у пациентов с ТС: у 9 (25,8%) инфицирование произошло при половом контакте, у 26 (74,2%) — гемоконтактным путем.

У 27 пациентов (77,1% от общего числа изученных) через 2–5 лет после заражения ВИЧ выявлен туберкулез легких, у остальных (8 пациентов — 22,9%) очаговых и инфильтративных изменений в легких не обнаружено. Во всех случаях клинические признаки туберкулезного

спондилита появились через 3–7 лет после заражения ВИЧ.

Материалы исследования показали, что основная часть пациентов I группы (33, или 94,7%) имела поздние стадии ВИЧ-инфекции, которая сопровождалась выраженным иммунодефицитом II–III ст. (табл. 2). У них в 77,1% случаев развился генерализованный туберкулез, а у 31 (88,6%) пациента имелись оппортунистические инфекции. У пациентов I группы со снижением CD4+ (менее 200 клеток в мкл крови) практически всегда имелось распространенное поражение позвоночника, которое сопровождалось выраженными деформациями позвоночника (в 100% случаев) и неврологическими нарушениями (85,7%).

Таблица 2 — Распространенность поражения и осложнения у пациентов I группы в зависимости от степени угнетения иммунитета

Подгруппа	I (n= 15–42,9%)	II (n= 13–37,1%)	III (n=7–20,0%)
CD4+	более 500 кл.	200–500 кл.	менее 200 кл.
Наличие абсцессов	13 (86,7%)	13 (100%)	7 (100%)
Кифотическая деформация	12 (80%)	13 (100%)	7 (100%)
Спинальные нарушения	4 (26, 7%)	8 (61, 5%)	6 (85,7%)
Распространенность поражения	5 (33,3%)	6 (46, 5%)	7 (100%)
Мультифокальность поражения	0	2 (15,4%)	3 (42,9%)
Наличие оппортунистических инфекций	12 (80%)	12 (92,3%)	7(100%)

Диссеминированный туберкулез является наиболее распространенной легочной формой у пациентов в данном исследовании. Так, из 27 случаев генерализованного туберкулеза он выявлен в 18-ти (66,7%), в т.ч. в 10 (55,6%) — в стадии распада. При ВИЧ-инфекции чаще, чем во II-й группе, встречались случаи распространенного туберкулезного спондилита — 51,5% с яркой клинической симптоматикой.

По активности воспалительного процесса в позвоночнике у 33 (94,2%) пациентов имела место спондилитическая фаза туберкулеза стадии разгара, у 2-х пациентов (5,8%) — стадия затихания. В I группе в 94,2% (33 пациента) имелись абсцессы, а у 28 пациентов (85,7%) — кифотические деформации, в то время, как во II группе спондилитическая фаза стадии начала — у 1 пациента (2,8%), стадия разгара — у 29 (82,9%), стадия затихания — у 4 (11,4%), постспондилитическая фаза — у 1 пациента (2,8%). Абсцессы имелись у 29 пациентов (82,9%), кифотическая деформация — у 14 (40%).

**Результаты и их обсуждение.** Пандемия ВИЧ-инфекции остается одной из глобальных проблем здравоохранения. Ежедневно только в Российской Федерации ВИЧ заражается около 150 человек [3]. Так, в течение 2010 г. на территории РФ зарегистрировано 58633 новых случаев (по данным Федерального научно-методического Центра по профилактике и борьбе со СПИД). Реальное число людей, живущих с ВИЧ, превосходит официальную статистику как минимум в 3 раза.

В настоящее время стало очевидным, что наибольшее количество новых случаев заражения выявляется в местах наибольшего сосредоточения дееспособного населения, т.е. крупных населенных пунктах, мегаполисах и индустриальных областях. Так, Санкт-Петербург занимает одно из первых мест в России как по абсолютному числу ВИЧ-инфицированных, так и по показателю распространенности заболевания — 625 человек на 100 тыс. населения, при среднероссийском — 227 на 100 тыс. [4].

Изучение данных литературы в совокупности с собственными результатами обследования в динамике лечения позволяет согласиться с патогенетическими представлениями [5] об избирательном цитопатическом воздействии вируса ВИЧ преимущественно на Т-лимфоциты-хелперы (CD4+). В первую очередь, это влияние сказывается на состоянии противовирусного и противомикробного иммунитета. В то же время, сложные иммунологические механизмы взаимовлияния между МБТ и ВИЧ прогрессирующей иммуносупрессией [6], приводящей в свою очередь к активации латентной туберкулезной инфекции, распространению процесса из легочной ткани в клинические внелегочные формы, к которым относится и ТС. Каскадный характер взаимовлияний ВИЧ и МБТ приводит к утрате иммунной системой способности блокировать рост и распространение микобактерий, вследствие чего развиваются диссеминированные, внелегочные формы туберкулеза [7].

В исследовании установлено, что у пациентов с ВИЧ высока вероятность развития оппортунистических инфекций, в т.ч. септических проявлений и глубоких микозов. Эти осложнения увеличивали длительность предоперационной подготовки пациентов. Подобным пациентам в предоперационном периоде проводили 2–3 недельные курсы антибактериальной терапии широкого спектра, по показаниям назначали противогрибковые препараты.

Выделение МБТ у пациентов с ВИЧ-инфекцией, прооперированных по поводу ТС, бактериологическими методами (57,5%) было выше, чем у лиц без ВИЧ-инфекции (32,9%) ( $\chi^2=4,884$ ;  $p=0,027$ ). Крайне значимой проблемой является наличие множественной лекарственной устойчивости у этой категории пациентов, значительно превышающей уровень у ВИЧ-негативных, и составляющей 66,0% от бактериовыделителей. Это осложняет подход к назначению адекватной химиотерапии.

#### **Выводы**

1. Особенности течения туберкулезного спондилита у пациентов с ВИЧ является преобладание распространенного поражения позвоночника, которое сопровождается выраженными неврологическими нарушениями.

2. При резком угнетении иммунитета у пациентов с ТС на фоне ВИЧ-инфекции достоверно чаще встречаются распространенные формы и множественные локализации в позвоночнике.

3. Исследование показало возможность и необходимость раннего хирургического лечения туберкулезного спондилита у ВИЧ-инфицированных пациентов.

#### **Литература**

1. Бабаева, И.Ю. Туберкулез у больных ВИЧ-инфекцией в современных эпидемиологических условиях: дис. ... д-ра мед. наук. – Краснодар, 2007. – 213 л.
2. Пантелеев, А.М. Внелегочный туберкулез у ВИЧ-инфицированных / А.М. Пантелеев, Т.А. Савина, Т.Ю. Супрун // Социально-значимые инфекции. – СПб., 2007. – С. 35-36.
3. Контингент больных ВИЧ-инфекцией в противотуберкулезном стационаре / Ф.А. Батыров [и др.] // Пробл. туберкул. – 2003. – № 5. – С. 6-8.
4. Белозеров, Е.С. Болезни иммунной системы / Е.С. Белозеров, Ю.А. Митин, Ю.И. Буланьков. – Элиста: АПП «Джангар», 2005. – 272 с.
5. Покровский, В.В. Эпидемиология и профилактика ВИЧ-инфекции и СПИД / В.В. Покровский. – М., 1996. – 246 с.
6. Kato-Maeda, M. HIV and tuberculosis / M. Kato-Maeda, P.M. Small // Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections / 5th ed.; ed. by D. Schlossberg. – New York: McGraw-Hill, 2006. – P. 2.
7. Фещенко, Ю.І. Сучасна стратегія боротьби з туберкульозом в Україні / Ю.І. Фещенко, В.М. Мельник. – Киев, 2007. – С. 7-8.

Поступила 12.07.2012

## CHARACTERISTIC OF TUBERCULOUS SPONDYLITIS COURSE IN PATIENTS WITH HIV-INFECTION

**Reshetneva E.V., Solovieva N.S., Makarovskiy A.N., Oleynik V.V., Vishnevskiy A.A.**

*S-Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, S-Petersburg, Russia*

The analysis of 35 cases records of patients with tuberculosis spondylitis against a HIV-infection was carried out. The paper presents characteristic of specific process in a spine backbone and clinical displays of disease in the presence of the co-infection. Necessity of surgical treatment of these patients was shown. The result of the spent radical reconstruction and stabilizing operations was recourse of neurologic symptoms that promotes socialization and improvement of patient life quality.

**Keywords:** tuberculosis spondylitis, HIV-infection .

## ГЕПАТОТОКСИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

**Матиевская Н.В.**

*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь*

**Резюме.** Проанализированы характер и частота гепатотоксических факторов (ГТФ: алкоголизм, парентеральные инъекционные наркотики (ПИН), коинфекции ВГС и ВГВ) у 119 умерших ВИЧ-инфицированных пациентов. Установлено наличие различных ГТФ у 95% пациентов, при этом у 68,1% пациентов выявлено комбинированное воздействие нескольких ГТФ. ВГС-инфекция, установленная у 95 (79,8%) ВИЧ-инфицированных пациентов, в 74 случаях протекала на фоне комбинированного поражения печени несколькими гепатотоксическими факторами: ПИН и/или алкоголизм. Наиболее значимым гепатотоксическим фактором в формировании «печеночной» летальности ВИЧ-инфицированных пациентов являлся алкоголь при совместном воздействии с ВГС и ПИН.

**Ключевые слова:** ВИЧ, ВГС, алкоголизм, парентеральные инъекционные наркотики, «печеночная» летальность.

**Введение.** Патология печени при ВИЧ-инфекции занимает первое место в структуре летальности ВИЧ-инфицированных пациентов, не связанной со СПИДом, которая в настоящее время достигает 14–18%. По некоторым данным около половины всех случаев летальности среди госпитализированных пациентов приходится на «печеночные» причины [1, 2].

Коинфекция ВГС широко распространена среди ВИЧ-инфицированных пациентов, особенно среди пациентов с парентеральным путем инфицирования ВИЧ. В связи с этим быстро прогрессирующее течение патологии печени при ВИЧ-инфекции часто связывают с коинфекцией ВГС [3, 4]. Однако необходимо учитывать, что у ВИЧ-инфицированных пациентов часто имеет место одновременное воздействие различных гепатотоксических факторов (ГТФ) таких как алкоголь, парентеральные наркотики (ПИН), ВИЧ, антиретровирусные препараты (АРВ) и другие. Установлено множество механизмов прямого гепатотоксического действия алкоголя, ВИЧ, ВГС и АРТ. Так известно, что продукция свободных радикалов кислорода, поражение митохондрий и стеатоз могут быть индуцированы независимо друг от друга алкоголем, ВИЧ, ВГС, АРТ. Однако при совместном воздействии эти факторы способны привести к комбинированному поражению подвергшихся воздействию гепатоцитов и потенцированию негативных эффектов. Хронический алкоголизм и ВИЧ-инфекция приводят к снижению внутриклеточного накопления глутатиона, увеличивают восприимчивость гепатоцитов к повреждающим факторам и приводят к гибели гепатоцитов. Кроме того, алкоголь, ВГС, АРТ увеличивают синтез про-воспалительных цитокинов, особенно фактора некроза опухоли альфа, индуцирующего гибель гепатоцитов. Этот механизм установлен как при алкогольном поражении печени, так при ВИЧ-инфекции, в том числе и при коинфекции ВИЧ/ВГС [5, 6].

Выявление и учет всех ГТФ является важным аспектом мониторинга ВИЧ-инфицированных пациентов, т.к. позволяет установить этиологию патологии печени и проводить целенаправленную терапию.

**Цель исследования:** установить характер и частоту гепатотоксических факторов у ВИЧ-инфицированных пациентов.

**Материалы и методы.** Проанализированы амбулаторные карты, истории болезней, протоколы вскрытия, патоморфологический материал 119 ВИЧ-инфицированных пациентов, умерших от различных причин в период с 2004 по 2010 г.г. Статистическая обработка данных проводилась с использованием критериев Манна–Уитни и критерия  $\chi^2$ , корреляционного анализа (Spearman Rank Order Correlations), статистический пакет «Статистика», v.6.

Характеристика пациентов с ВИЧ-инфекцией представлена в табл. 1.

Таблица 1 — Характеристика пациентов, включенных в исследование

Показатель	N	%
Возраст (годы): средний (годы), n=119	35,6±6,68	
до 30 лет	20	16,8
31–40 лет	77	64,7
41–50 лет	18	15,1
51 и старше	4	3,4
Мужчины	85	71,4
Женщины	34	28,6
Стадия СПИД	105	88,2
«Стаж» ВИЧ-инфекции: средний (годы), n=100	6,5±4,10	

Как видно из табл. 1, среди умерших пациентов мужчин было в 2,5 раз больше чем женщин. При этом преобладали пациенты возрастной группы от 30 до 40 лет. Возраст самого молодого пациента составил 23 года, самого старшего – 72 года. Сведения о «стаже» ВИЧ-инфекции были установлены у 100 пациентов, при чем у 73 (73%) «стаж» заболевания оказался менее 10 лет.

Антиретровирусная терапия (АРТ) была назначена 14 (11,8%) пациентам, но курсы АРТ были короткими, в пределах недель и месяцев, пациенты часто отказывались от приема АРП. Лишь 1 пациент в группе получил 18-ти месячный курс АРТ.

Большинство пациентов в группе были одиночками (холостыми или разведенными), семейные пациенты составили 30,7%. По социальному статусу пациенты распределились следующим образом: безработные — 66,7%, рабочие — 29,1%, инвалиды — 2,6%, прочие — 3,5%. Пребывание в местах лишения свободы в прошлом установлено у 28,6% пациентов.

**Результаты и их обсуждение.** Проанализирована частота таких ГТФ как употребление парентеральных наркопрепаратов (ПИН), алкоголя (АЛК), коинфекции ВГС и ВГВ. Злоупотребление алкоголем (АЛК) отмечено у 56 пациентов (47,1%), ПИН — у 69 (58,0%), коинфекция ВГС — в 95 (79,8%) случаев (табл. 2).

Таблица 2 — Частота гепатотоксических факторов у ВИЧ-инфицированных пациентов (абс./%)

Фактор	абс.	%
АЛК	4	3,4
ПИН	7	5,9

ПИН + АЛК	4	3,4
ВГС	21	17,6
ВГС + АЛК	16	13,4
ВГС + ПИН	29	24,4
ВГС + ПИН + АЛК	29	24,4
ВГВ + АЛК	3	2,5
Отсутствие ГТФ	6	5,0

Примечание:

1. ВГС — вирус гепатита С;
2. ВГВ — вирус гепатита В;
3. ПИН — потребитель инъекционных наркотических препаратов;
4. АЛК — злоупотребление алкоголем.

Как видно из табл. 2, часто у одного и того же пациента имело место сочетанное воздействие ГТФ. Изолированное воздействие каждого ГТФ выявлялось в относительно незначительном количестве случаев наблюдения. Наиболее распространенными ГТФ были комбинированные воздействия ВГС, ПИН и алкоголя, встречавшиеся у 74 пациентов в группе. Таким образом, коинфекция ВГС у ВИЧ-инфицированных пациентов часто протекает на фоне комбинированного воздействия различных ГТФ. Данный факт необходимо учитывать при интерпретации причин и связанного с ними характера поражения печени у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Проанализированы различия в частоте ГТФ в зависимости от пола, семейного положения, социального статуса, пути инфицирования ВИЧ. Установлено, что у мужчин достоверно чаще встречалась комбинация ВГС + ПИН + АЛК при сравнении с женщинами (25 (29,4%) и 4 (11,7%), соответственно,  $p < 0,05$ ). Не установлено различий в частоте ГТФ в зависимости от семейного положения, социального статуса, нахождения в МЛС.

Путь инфицирования ВИЧ был установлен у 91 пациента на основании данных медицинской документации и кода постановки на учет по ВИЧ-инфекции. Парентеральный путь инфицирования в результате ПИН был у 72 (79,1%) пациентов, половой — у 19 (20,9%). Частота ГТФ у пациентов с различными путями инфицирования ВИЧ представлена в табл. 3.

Таблица 3 — Частота гепатотоксических факторов у ВИЧ-инфицированных пациентов при парентеральном и половом пути инфицирования ВИЧ (абс./%)

Фактор	Парентеральный путь, n=72	Половой путь, n=19
АЛК	1 (1,3%)	1 (5,3%)
ПИН	7 (9,7%)	-
ПИН + АЛК	4 (5,6%)	-
ВГС	3 (4,2%)*	8 (42,1%)
ВГС + АЛК	2 (2,6%)*	7 (36,8%)
ВГС + ПИН	26 (36,1%)*	-
ВГС + ПИН + АЛК	28 (38,9%)*	-
ВГВ + АЛК	1 (1,3%)	-
Отсутствие ГТФ	-	3 (15,8%)*

Примечание:

1. ВГС — вирус гепатита С;
2. ВГВ — вирус гепатита В;
3. ПИН — потребитель инъекционных наркотических препаратов;
4. АЛК — злоупотребление алкоголем,
5. \* —  $p < 0,05$ , тест  $\chi^2$ .

Как видно из табл. 3, изолированное воздействие ВГС достоверно чаще отмечено в группе с половым путем инфицирования, в то время как в группе с парентеральным путем инфицирования ВГС-инфекция чаще встречалась в комбинации с ПИН и АЛК.

В табл. 4 представлена частота ГТФ у ВИЧ-инфицированных пациентов, умерших от «печеночных» и других («не печеночных») причин смерти в группе наблюдения.

Таблица 4 — Частота гепатотоксических факторов у ВИЧ-инфицированных пациентов, умерших от «печеночных» и других причин смерти (абс./%)

Фактор	«Печеночные» причины, n=26	«Не печеночные» причины, n=93
АЛК	1 (3,8%)	3 (3,2%)
ПИН	-	7 (7,5%)
ПИН + АЛК	1 (3,8%)	3 (3,2%)
ВГС	3 (11,5%)	18 (19,4%)
ВГС + АЛК	11 (42,3%)*	5 (5,4%)
ВГС + ПИН	2 (7,7%)	27 (29,0%)
ВГС + ПИН + АЛК	8 (30,8%)	21 (22,6%)
ВГВ + АЛК	-	3 (3,2%)
Отсутствие ГТФ	-	6 (6,5%)

Примечание:

1. ВГС — вирус гепатита С;
2. ВГВ — вирус гепатита В;
3. ПИН — потребитель инъекционных наркотических препаратов;
4. АЛК — злоупотребление алкоголем;
5. \* —  $p < 0,05$ , тест  $\chi^2$ .

«Печеночные» причины, связанные с декомпенсацией терминальной стадии поражения печени (цирроза печени) различной этиологии были установлены у 26 (21,8%) пациентов в группе. Смерть остальных пациентов была связана с различными «не печеночными» причинами: туберкулезом (36,1%), поражением ЦНС (18,5%), поражением органов дыхания (ОД) в виде неспецифической пневмонии (9,3%), сепсисом (5,0%), опухолями (6,7%), сердечно-сосудистой патологией (2,5%).

Как видно из таблицы 4, в группе «печеночной» смерти отмечена достоверно более высокая частота комбинированного воздействия ГТФ-ВГС+АЛК. Обращает на себя внимание, что в группах «печеночной» и «не печеночной» летальности частота коинфекции ВГС (24 (92,3%) и 71 (76,3%),  $p > 0,05$ , соответственно) и частота ПИН (11 (42,3%) и 58 (62,3%),  $p > 0,05$ , соответственно) были сравнимы. В то же время алкоголизм достоверно чаще встречался в группе «печеночной» летальности по сравнению с «не печеночной» — 22 (84,6%) и 35 (37,6%) случаев, соответственно,  $p < 0,05$ .

Результаты, представленные в табл. 4, подчеркивают важную роль токсического воздействия алкоголя, в том числе и в комбинации с другими ГТФ в формировании декомпенсированного поражения печени, приводящего к смерти ВИЧ-инфицированных пациентов.

#### Заключение:

1. У пациентов с ВИЧ-инфекцией в 95% случаев установлено воздействие различных гепатотоксических факторов таких как ВГС, ВГВ, алкоголизм, ПИН. При этом у 68,1% пациентов выявлено комбинированное воздействие нескольких ГТФ.

2. ВГС-инфекция установлена у 95 (79,8%) ВИЧ-инфицированных пациентов и в 74 случаях протекала на фоне комбинированного поражения печени комплексом гепатотоксических факторов: ПИН и/или алкоголизм.

3. У пациентов с парентеральным путем инфицирования ВИЧ наиболее распространенными ГТФ являлись ПИН в комбинации с ВГС и/или алкоголем, составившие в сумме — 84,7%.

4. У пациентов с половым путем инфицирования ВИЧ наиболее распространенным ГТФ являлись ВГС в комбинации с алкоголем, составившие в сумме – 84,2%.

5. Наиболее значимым гепатотоксическим фактором в формировании «печеночной» летальности ВИЧ-инфицированных пациентов являлся алкоголь в сочетании с ВГС и ПИН.

#### Литература

1. Liver-related deaths in persons infected with the human immunodeficiency virus: the D:A:D study / R. Weber [et al.] // Arch. Intern. Med. – 2006. – Vol. 166. – P. 1632-1641.

2. Печеночная летальность ВИЧ-инфицированных пациентов / Н.В. Матиевская [и др.] // Мед. панорама. – 2011. – № 1. – С. 3-6.

3. Thomas, D.L. Hepatitis C and human immunodeficiency virus infection/ D.L. Thomas // Hepatology. – 2002. – Vol. 36. – P. 201-209.

4. Price, J.C. Liver disease in the HIV-infected individual / J.C. Price, C.L. Thio // Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2010. – Vol. 8, N 12. – P. 1002-1012.

5. Szabo, G. Mechanisms of alcohol-mediated hepatotoxicity in human immunodeficiency-virus-infected patients / G. Szabo, S. Zakhari // World. J. Gastroenterol. – 2011. – Vol. 17, N 20. – P. 2500-2506.

6. Role of alcohol in the progression of liver disease caused by hepatitis C virus infection / G. Ostapowicz [et al.] // Hepatology. – 1998. – Vol. 27. – P. 1730-1735.

Поступила 24.09.2012

## HEPATOTOXIC FACTORS IN HIV-INFECTED PATIENTS

**Matsiyenskaya N.V.**

*Grodno State Medical University, Grodno, Belarus*

Types and distribution of hepatotoxic factors (HCV, IDU, alcoholism) and their combinations in 119 died patients with HIV-infection have been analyzed according to data of medical documents. Different hepatotoxic factors were established in 95% of patients. Combinations of several factors were revealed in 68,1% of patients. HCV-infection were established in 95 (79,8%) patients and in 74 cases HCV-infection were presented in combinations with IDU and/or alcoholism. According to our data more significant factor for development of «liver» mortality of HIV-infected patients was alcohol consumption in combination with HCV and IDU.

**Keywords:** HIV, HCV, alcoholism, IDU, “liver” mortality.

## ДЕТЕКЦИЯ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В К ЛАМИВУДИНУ И АДЕФОВИРУ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В

**Гасич Е.Л.<sup>1</sup>, Еремин В.Ф.<sup>1</sup>, Сосинович С.В.<sup>1</sup>, Яговдик-Тележная Е.Н.<sup>2</sup>,  
Руммо О.О.<sup>3</sup>, Щерба А.Е.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

<sup>2</sup>*Белорусский государственный медицинский университет;*

<sup>3</sup>*РНПЦ трансплантации органов и тканей, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В статье впервые представлены данные по разработке подходов к получению диагностической тест-системы для определения мутаций резистентности к ингибиторам обратной транскриптазы у пациентов с гепатитом В. Были проведены исследования по определению мутаций резистентности ВГВ к ингибиторам обратной транскриптазы с использованием разработанных нами пар праймеров и выявлено 2 изолята ВГВ, устойчивых к ламивудину и адефовиру у пациентов с трансплантацией печени, получавших противовирусную терапию.

**Ключевые слова:** вирус гепатита В, генотипы/субтипы, ингибиторы обратной транскриптазы, резистентность.

**Введение.** Вирусный гепатит В (ВГВ) является глобальной медицинской и социальной проблемой из-за повсеместного распространения в различных группах населения и

широкого спектра клинических проявлений. Несмотря на повсеместное проведение вакцинации против гепатита В, показатели заболеваемости ВГВ достаточно высоки. По экспертным оценкам ВГВ в мире инфицировано более 2 млрд. человек, а число хронических носителей достигает 400 млн. человек. Хронический гепатит В (ХГВ) приводит к развитию цирроза печени, декомпенсированного гепатита и гепатоцеллюлярной карциномы у 25–30% инфицированных лиц, при этом ежегодно умирает более 1 млн. человек [1].

Течение и развитие инфекции из острой в хроническую форму зависит от взаимоотношения вируса и иммунной системы хозяина. Более того, на степень прогрессии значительное влияние оказывает генотип вируса, вирусная нагрузка, поэтому задача терапии ХГВ состоит в ограничении или регрессии заболевания путем подавления репликации ВГВ. Вирус обладает высокой репликативной активностью, приводящей к появлению мутантных штаммов (10<sup>10</sup> точечных мутаций в сутки) [2].

Лечение ВГВ связано с новыми терапевтическими подходами, включающими не только назначение ИФН-α (стандартного, пегилированного), но и нуклеоз(т)идных аналогов — ингибиторов обратной транскриптазы. В настоящее время в мире используется 4 препарата из этой группы — ламивудин, энтекавир, адефовир и телбивудин, которые обладают разной противовирусной эффективностью.

Резистентность ВГВ к ламивудину возникает в 15–20% случаев за каждый год применения. Существует основные 4 формы мутаций, вызывающие резистентность к ламивудину: L180M + M240V (наблюдается примерно у 60% пациентов), V173L + L180M + M204V, M204I и L180M + M204I. По сравнению с ламивудином, резистентность к адефовиру возникает лишь у небольшого процента пациентов (примерно у 3–4% через 3 года) и она связана с двумя основными мутациями обратной транскриптазы — A181V и N236T. Резистентность к энтекавиру развивается чаще всего лишь у пациентов с уже имевшимися мутациями резистентности к ламивудину [3].

Формирование лекарственной резистентности к аналогам нуклеоз(т)идов при проведении противовирусной терапии приводит к развитию рецидива и способствует неблагоприятному исходу заболевания.

**Цель исследования:** установить мутации резистентности ВГВ у пациентов, леченных ламивудином и/или адефовиром.

**Материалы и методы.** Клинические образцы. Проведено исследование 16 образцов сыворотки/плазмы крови, полученных от пациентов с ВГВ-инфекцией, получающих терапию ламивудином и/или адефовиром, на наличие мутацией резистентности ВГВ.

Иммуноферментный анализ для определения HBsAg и антиHBeAg осуществляли на тест-системах ВекторБест (Россия).

Выделение ДНК ВГВ проводили с использованием коммерческого набора «ДНК-сорб», производства Центрального НИИ эпидемиологии (Россия), согласно прилагаемой инструкции.

Количественное определение ДНК ВГВ выполняли на тест-системе «АмплиСенс® HBV-Монитор-FRT» производства Центрального НИИ эпидемиологии (Россия), согласно прилагаемой инструкции, на амплификаторе RotorGene (Австралия).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) выполнялась на амплификаторе «CorbetResearch» (Австралия) с праймерами, синтезированными в ОДО «Праймтех» (Беларусь).

Гель-электрофорез проводили в 2% агарозном геле, содержащем бромид этидия.

Полученные фрагменты специфической ДНК очищали с помощью колонок SigmaSpinTM Post-Reaction Clean-up Columns (Sigma, США).

Для проведения секвенирующей ПЦР применяли набор «BigDyeterminators v.3.1» производства Applied Biosystems (США).

Очистка продуктов секвенирующей ПЦР выполнялась ацетатно-спиртовой преципитацией.

Электрофорез очищенных фрагментов после секвенирующей ПЦР проводили на приборе «ABI PRISM 3100-AVANT» (AppliedBiosystems, США).

Анализ полученных фрагментов генома ВГВ осуществили с использованием программных продуктов «SequencingAnalysisSoftwrev.5.1.1», «BioEditv7.0.9.0», «SeqScapev.2.6».

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы «Mega 4» (neighbor-joiningmethods). Для выравнивания генетических последовательностей использовали программу Clustal W.

Определение генотипов ВГВ осуществляли по методике, описанной ранее [4].

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica v.6.

**Результаты и их обсуждение.** Нами было исследовано 16 образцов сыворотки/плазмы крови, полученных от пациентов с диагнозом «хронический гепатит В», получающих противовирусную терапию ламивудином и адефовиром. Среди обследованных пациентов было 8 женщин в возрасте от 24 до 59 лет (средний возраст  $42,6 \pm 9,9$  лет) и 8 мужчин в возрасте от 18 до 61 года (средний возраст  $35,9 \pm 12,1$  лет).

НВsAg выявлялся во всех исследуемых образцах ( $n=15$ ). Антитела к НВeAg были определены в 8 случаях (46,7%,  $n=15$ ), что свидетельствует о хронической персистирующей форме гепатита В.

Во всех исследованных сыворотках/плазме крови определялась ДНК ВГВ, а вирусная нагрузка варьировала в пределах от  $1,3 \times 10^4$  до  $>1,0 \times 10^{12}$ , что свидетельствовало о высокой репликативной активности вируса. Развитие ХГВ было вызвано D (81,3%,  $n=13$ ) и A (18,7%,  $n=3$ ) генотипами ВГВ. В структуре распределения D генотипа доминировали D2 (46,2%,  $n=6$ ) и D3 (46,2%,  $n=6$ ) субтипы ВГВ, D1 субтип ВГВ был выявлен только у одного пациента (7,6%,  $n=6$ ). Во всех случаях A генотип был представлен A2 субтипом.

Мутации в участке Р-гена были определены во всех исследуемых образцах. Однако, только в 2-х случаях были выявлены мутации резистентности к аналогам нуклеоз(т)идов, которые привели к появлению лекарственной устойчивости. Результаты представлены на рисунке

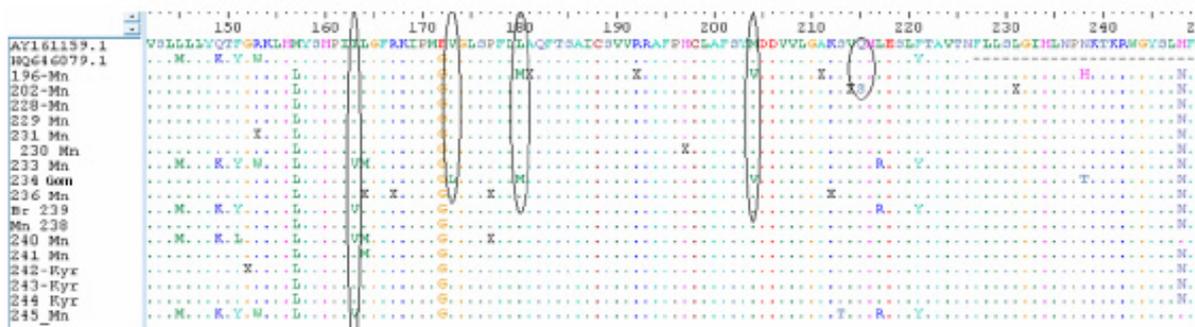


Рисунок — Аминокислотная последовательность участка Р гена ВГВ. Значками отмечены замены в аминокислотных последовательностях

Так, пациентке К., 18 лет (№ 196), проживающей в г. Минске, была выполнена пересадка печени в апреле 2010 г. Диагноз ХГВ с развитием цирроза печени установлен в 2006 г. Начиная 2007 г. пациентка получала ламивудин, но препарат принимался нерегулярно. После трансплантации печени был назначен Неогепатект (BiotestPharmaGmbH Германия) в дозе 35000 ЕД, на фоне приема которого ДНК ВГВ не выявлялась. Через год была отмечена реактивация ВГВ и вирусная нагрузка ВГВ в сыворотке/плазме крови увеличилась до 880000 Ед/мл. Методом ИФА был выявлен НВsАgi анти-НВeАb. Ламивудин был назначен повторно, но принимался так же нерегулярно. Пациентка К. умерла в 2011 г.

Проведенные нами исследования показали, что у этой больной ХГВ с развитием цирроза печени был вызван D2 субтипом ВГВ. На фоне нерегулярного приема ламивудина в течение 4-х лет у нее появились мультирезистентные мутации в участке Р-гена ВГВ: rtL180M (В-домен), rtA181AV (В-домен), rtM204V (С-домен). Считается, что наличие изолированной мутации rtL180M не влияет на эффективность лечения ламивудином, а мутация в локусе rtM204V ведет только к появлению частичной резистентности. Однако одновременное появление этих мутаций способствует увеличению риска развития мутаций резистентности к препаратам противовирусной терапии. Мутация rtA181AV определила развитие резистентности к адефовиру. Таким образом, единственным эффективным препаратом для лечения являлся тенофовир, хотя и сохранялась частичная чувствительность к энтекавиру.

Пациентке Ч. (№ 234, 40 лет), проживающей в г. Гомеле, была так же выполнена пересадка печени в марте 2009 г. в связи с прогрессированием заболевания Вильсона-Коновалова. В мае 2010 г. в сыворотке крови был впервые выявлен HBsAg, при этом уровень ДНК ВГВ превышал  $1,0 \times 10^8$  МЕ/мл. Больной Ч. начали терапию ламивудином. На фоне приема препарата в течение 1 года отмечалась положительная динамика в снижении титра вирусной нагрузки (май 2011 г. —  $1,0 \times 10^6$  МЕ/мл, июль 2011 г. —  $4,6 \times 10^5$  МЕ/мл). Через 4 месяца количество ДНК ВГВ в сыворотке/плазме крови увеличилось почти в 100 раз ( $3,9 \times 10^7$  МЕ/мл). Методом ИФА был выявлен HBsAg, но анти-HBeAb не определялись.

Молекулярно-генетические исследования показали, что у пациентки Ч. выявлялся D2 субтип ВГВ. Секвенирование позволило установить мутации, ассоциированные с появлением резистентности к ламивудину и частично, к энтекавиру: V173L, L180M, M204V, которые привели к снижению эффективности противовирусной терапии, и, как следствие, значительному увеличению репликативной активности вируса.

Таким образом, нами были впервые проведены исследования по определению мутаций резистентности ВГВ к ингибиторам обратной транскриптазы (ИОТ) и выявлено 2 штамма ВГВ, устойчивых к ламивудину и адефовиру у пациентов с трансплантацией печени, получавших противовирусную терапию.

Установлено, что для эффективной терапии ВГВ необходимо проводить постоянный молекулярно-генетический мониторинг за циркуляцией резистентных штаммов ВГВ, особенно у пациентов, получающих противовирусную терапию, с целью ранней диагностики появления резистентности. Известно, что резистентные штаммы вируса могут не только формироваться в течение терапии нуклеоз(т)идными аналогами, но и присутствовать в популяции ВГВ до начала лечения [5].

**Выводы.** Таким образом, нами отработана методика для определения генотипов и мутацией резистентности в Р-гене генома ВГВ. Впервые обнаружены 1 штамм ВГВ с мутациями мультирезистентности к ламивудину и адефовиру и 1 — с мутациями резистентности к ламивудину.

Для подбора оптимальной схемы лечения пациентов с острой и хронической формами ВГВ необходимо проводить постоянный молекулярно-генетический мониторинг по выявлению резистентных штаммов ВГВ, как до начала терапии ИОТ, так и в течение всего периода лечения.

#### Литература

1. HBV a silent killer [Electronic resource] / Center for Disease Control and Prevention. – Mode of access: [cww.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/b/hbv\\_silent\\_killer](http://cww.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/b/hbv_silent_killer). – Data of access: 19.02.2007.
2. Simmonds, P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans / P. Simmonds // J. Gen. Virol. – 2001. – Vol. 82. – P. 693-712.
3. Malmstrom, S. Mutation analysis of lamivudine resistant hepatitis B virus strains by TaqMan PCR / S. Malmstrom, C. Hannoun, M. Lindh // J. Virol. Methods. – 2007. – Vol. 143. – P. 147-152.
4. Молекулярно-генетическая характеристика вируса гепатита В, выявляемого в Беларуси / Е.Л. Гасич [и др.] // Здравоохранение. – 2010. – № 10. – С. 74-77.

Поступила 17.09.2012

## HBV LAMIVUDIN AND ADEFOVIR RESISTANCE MUTATIONS IN PATIENTS WITH CHRONIC HBV-INFECTION

Gasich E.L.<sup>1</sup>, Eremin V.F.<sup>1</sup>, Sasinovich S.V.<sup>1</sup>, Jagovdik-Telezhnaja E.N.<sup>2</sup>, Rummo O.O.<sup>3</sup>, Scherba A.E.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;

<sup>2</sup>Belarusian State Medical University;

<sup>3</sup>Republican Research & Practical Center for Organ and Tissue Transplantation, Minsk, Belarus

The data of resistance mutations to reverse transcriptase inhibitors determination in patients with a liver transplantation is presented for the first time. Two HBV strains with resistance to lamivudine and adefovir in patients receiving antiviral therapy with liver transplantation were revealed.

**Keywords:** hepatitis B virus, genotypes / subtypes, reverse transcriptase inhibitors, resistance.

## ПОЛУЧЕНИЕ И АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА, ВКЛЮЧАЮЩЕГО АНТИГЕНЗНАЧИМЫЕ ФРАГМЕНТЫ НЕСТРУКТУРНОГО NS3–БЕЛКА ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Фомина Е.Г., Счесленок Е.П., Школина Т.В., Фомин Д.И., Владыко А.С.

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Получен рекомбинантный полипептид, содержащий антигенные детерминанты неструктурного NS3–белка вируса гепатита С. Показана его антигенная специфичность с помощью иммуноблоттинга. Полученный полипептид будет использоваться в качестве антигена при комплектации тест-систем отечественного производства для выявления антител к вирусу гепатита С.

**Ключевые слова:** рекомбинантный полипептид, антигенная специфичность, тест-системы для выявления антител к вирусу гепатита С.

**Введение.** Основой лабораторной диагностики гепатита С служат знания о строении вируса, его репликации, информация о динамике появления и исчезновения маркеров инфицирования, а также современные иммунохимические и молекулярно-биологические методы определения антигенов, антител и нуклеиновых кислот.

Первая попытка создания диагностических препаратов была предпринята уже через год после открытия вируса, когда в 1989 г. группа исследователей фирмы «Chiron Corporation» под руководством Q-L. Choo осуществила клонирование РНК ВГС и получила иммунореактивные олигопептиды, вступающие в реакцию с антителами, циркулирующими в крови больных хроническим гепатитом «ни А, ни В» [1]. Это событие определило быстрый прогресс в разработке и промышленном выпуске диагностических препаратов. Полученные олигопептиды стали основой диагностических препаратов для выявления антител к ВГС. Несмотря на более чем 20 летний опыт в разработке диагностических тест-систем, которые эволюционировали до 4-го поколения, позволяющих одновременно выявлять антигены вируса и антитела к нему, постановка диагноза «вирусный гепатит С» может быть затруднена по ряду причин.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей РНК изолятов ВГС, циркулирующих в различных регионах мира, выявил их значительную генетическую гетеро-

генность. Даже у отдельного больного вирус циркулирует как популяция вирусных частиц, у которых геномы отличаются друг от друга на 1–2% (квазивиды). Генетическое разнообразие позволяет объяснить длительное (иногда пожизненное) носительство вируса (накопленные мутации позволяют вирусу уклоняться от иммунного ответа хозяина), частое развитие хронического заболевания, трудности в терапии и создании эффективных вакцинных и диагностических препаратов.

Основным методом, применяемым для детекции анти-ВГС, стал твердофазный иммуноферментный анализ, как метод, отвечающий требованиям практического здравоохранения — т.е. обладающий высокой чувствительностью, специфичностью и простотой проведения.

По данным литературы, тест-системы 3-го и 4-го поколения способны выявлять до 99–100% носителей ВГС. Однако, среди иммунокомпрометированных лиц, например, таких как пациенты после трансплантации органов, инфицированные ВИЧ, этот показатель значительно ниже — 50–95% [2]. S.George с соавторами показали, что у 8,4% больных ВИЧ-инфекцией регистрируются ложноотрицательные результаты выявления анти-ВГС [3]. Еще одна важная проблема при проведении исследований на наличие анти-ВГС — ложноположительные результаты. Их появление может быть связано с неспецифическим взаимодействием компонентов реакции, возможными перекрестными реакциями с другими вирусными антигенами и многими другими факторами. Уровень ложноположительных результатов при выявлении анти-ВГС с использованием различных диагностических препаратов может достигать 10–20% [4–6]. Повышенный уровень таких результатов отмечен среди больных онкологическими и аутоиммунными заболеваниями, лиц с иммунодефицитными состояниями и больных сифилисом [6].

Таким образом, при разработке диагностических препаратов одной из главных задач является подбор и включение в комплектацию тест-системы в качестве антигенов рекомбинантных полипептидов, содержащих только антигензначимые участки, кодированные структурными и неструктурными зонами РНК ВГ, и элиминация последовательностей, дающих перекрестные реакции с другими инфекционными агентами, а также конструирование антигенов с учетом генотипов вируса, циркулирующих на данной территории.

Целью данного исследования явилось: получение и антигенная характеристика фрагмента неструктурного белка вируса гепатита С, кодируемого NS3–областью генома, для включения его в качестве антигена в диагностическую тест-систему для выявления антител к вирусу гепатита С.

**Материалы и методы.** Реакции амплификации, рестрикции и лигирования проводили с использованием ферментов фирмы «Fermentas», следуя рекомендациям производителя. Для выделения вирусной РНК использовали коммерческий препарат TRI-реагент BD (Sigma) и «РИБО-сорб» производства «Амплисенс» (Россия).

**Результаты и их обсуждение.** Фрагменты NS3-белка являются составной частью антигенного компонента всех диагностических тест-систем для выявления антител к вирусу гепатита С. Обязательное наличие этого антигена в составе тест-систем связано с тем, что антитела к данному антигену появляются раньше или практически одновременно с антителами к нуклеокапсидному белку, что позволяет диагностировать заболевание на более ранних стадиях инфицирования. Анти-NS3 могут являться самостоятельным диагностическим маркером острой инфекции. Высокие титры анти-NS3 при остром гепатите С свидетельствуют о значительной вирусной нагрузке, а длительное сохранение их в острой фазе связано с высоким риском хронизации инфекционного процесса.

Неструктурный (NS3) белок содержит домены, кодирующие ферменты, играющие ведущую роль в жизненном цикле вируса.

Во-первых, он участвует в процессинге полипротеина, являясь сериновой протеазой, отщепляющей от полипротеина все неструктурные белки. Во-вторых, белок NS3 играет важную

роль в репликации вируса, обладая хеликазной и нуклеотидтрифосфатазной активностью. В-третьих, NS3-белок способен специфически взаимодействовать с каталитической субъединицей клеточной протеинкиназы А, участвующей в передаче клеточных сигналов. Длительное присутствие NS3-протеина в клетке может привести к злокачественной трансформации гепатоцитов и развитию гепатоклеточной карциномы [7, 8].

Согласно данным литературы, антигенные детерминанты в составе белка NS3 локализованы в его С-концевой части. Описанные в литературе рекомбинантные полипептиды, полученные в бактериальной системе экспрессии, включали различные достаточно протяженные фрагменты белка: 1027–1657 а.о., 1192–1459 а.о., 1007–1537 а.о., 1356–1459 а.о. и др. Некоторые из полученных полипептидов слабо экспрессировались, другие были плохо растворимы или нестабильны, часть полученных полипептидов давала большой процент ложноположительных реакций. Интересно отметить, что непротяженные клонированные линейные фрагменты этой области белка NS3 (per1 1192–1457а.о., per2 1210–1233а.о., per3 1433–1457 а.о.) не обладали специфической антигенной активностью. Удаление фланкирующих последовательностей с N-концевой части полипептида практически не сказывалось на антигенной специфичности, в то время как удаление С-концевого фрагмента оказалось критичным и приводило к потере антигенной специфичности полипептида. Было сделано предположение о том, что С-концевой фрагмент содержит аминокислотные последовательности, образующие конформационно-зависимый эпитоп с прилежащими последовательностями и наличие его в клонированной последовательности для получения рекомбинантного полипептида обязательно. Ключевая роль в формировании такого эпитопа, возможно, принадлежит остаткам гистидина, расположенным в положении 1444 а.о. и 1455 а.о. [9-11].

Исходя из профиля гидрофобности неструктурного белка вируса гепатита С, наиболее гидрофильный участок локализован в области 1425 и 1550 а.о.

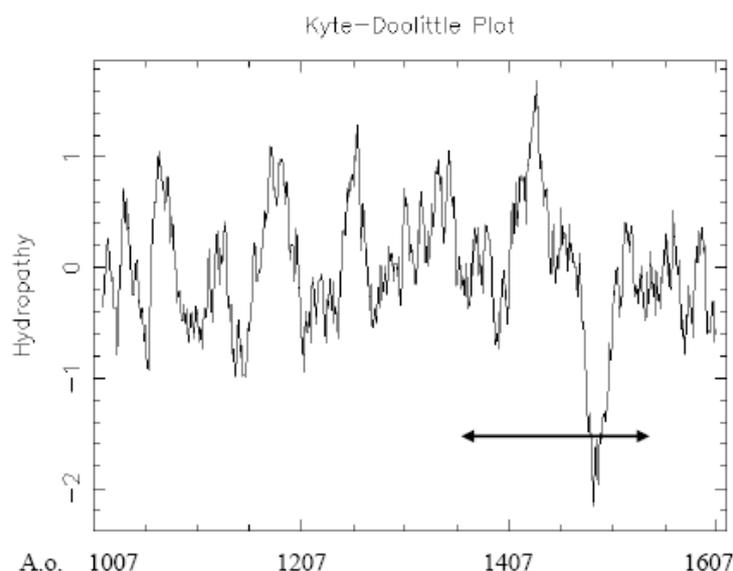


Рисунок 1 — Профиль гидрофобности аминокислотных остатков неструктурного белка NS3 вируса гепатита С

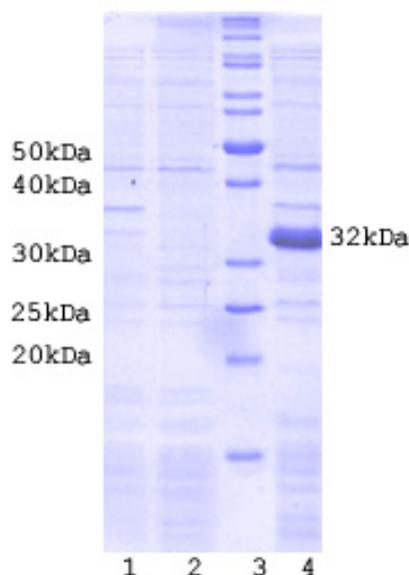
Согласно анализу данных литературы по картированию антигенных детерминант и в соответствии с профилем гидрофобности аминокислотных остатков, входящих в состав белка, для получения рекомбинантного полипептида была выбрана область, включающая 1356–1537 а.о. (обозначена на рисунке 1 стрелкой).

Для получения фрагмента ДНК, кодирующего обозначенную область генома вируса, подобрана и синтезирована пара праймеров, включающая дополнительные последователь-

ности сайтов рестрикции для клонирования в экспрессирующий вектор. Матрицей в процессе обратной транскрипции служила РНК вируса гепатита С генотипа 1в, выделенная из сыворотки крови пациента с диагнозом «вирусный гепатит С». В результате процесса ОТ и амплификации синтезирован фрагмент генома вируса, кодирующий антигенные детерминанты неструктурного белка NS3 размером 563 п.н. Амплифицированный фрагмент клонирован в полилинкер вектора рJC40.

Специфичность вставки клонированного фрагмента оценивали методом прямого секвенирования в составе рекомбинантной плазмиды (данные не представлены).

Для получения полипептида рекомбинантной плазмидой трансформировали перmissive штамм бактериальных клеток *E. coli* BL21DE3. Индукцию синтеза белка проводили добавлением в среду культивирования бактерий изопропилтиогалактопиранозида (IPTG) в концентрации 0,4 мМ. Как видно из рисунка 2, на фоне подавления синтеза клеточных белков видна мажорная полоса экспрессируемого полипептида с молекулярной массой 32 кДа.

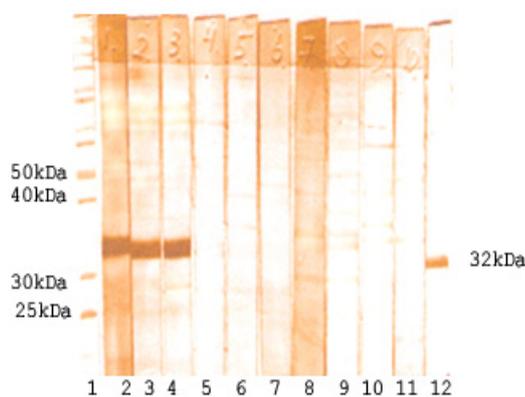


Дорожки: 1 — лизат бактериальных клеток *E. coli*, штамм BL21DE3, содержащий рекомбинантную плазмиду, без индукции IPTG; 2 — лизат бактериальных клеток *E. coli*, штамм BL21DE3, не содержащий рекомбинантную плазмиду, после индукции IPTG; 3 — маркеры молекулярных масс; 4 — лизат бактериальных клеток *E. coli*, штамм BL21DE3, содержащий рекомбинантную плазмиду, после индукции IPTG

Рисунок 2 — Электрофоретический анализ рекомбинантного полипептида, кодируемого NS3-областью генома вируса гепатита С

Полученный полипептид содержит в N-концевой части остатки гистидина и может быть очищен с помощью металлохеллатной хроматографии. Как показали исследования по хроматографической очистке белка, вероятно, высокий уровень продукции полипептида приводит к тому, что полученный полипептид находится в тельцах включения и его очистка требует дополнительных манипуляций. Высокий уровень экспрессии рекомбинантного полипептида, минорное количество клеточных белков в грубом клеточном лизате позволяет использовать его в качестве антигена без дополнительной очистки.

Оценку антигенной специфичности полученного полипептида проводили с использованием иммуноблоттинга. В качестве референс-сывороток использовали сыворотки пациентов с диагнозом «вирусный гепатит С», предварительно протестированные на наличие спектра антител к вирусу гепатита С и содержащие (К+) или не содержащие (К-) антитела к белку NS3 вируса, полученные из инфекционной больницы. Тестирование сывороток проводили с использованием коммерческих тест-систем «БЕСТ анти-ВГС – СПЕКТР» производства Вектор-Бест, Новосибирск, Россия.



Дорожки: 1 — маркеры молекулярных масс; 2–4, 12 — лизат клеток, содержащий рекомбинантный полипептид, обработанный сыворотками, содержащими антитела к белку NS3; 5–7 — лизат клеток, содержащий рекомбинантный полипептид, обработанный сыворотками, не содержащими антител к белку NS3; 8, 9 — лизат клеток, не содержащий рекомбинантный полипептид, обработанный положительными сыворотками; 10, 11 — лизат клеток, не содержащий рекомбинантный полипептид, обработанный отрицательными сыворотками

Рисунок 3 — Оценка специфичности рекомбинантного NS3-полипептида методом иммуноблоттинга

Как показали проведенные исследования (рисунок 3), рекомбинантный полипептид специфически связывался с антителами положительных сывороток, содержащих антитела к белку NS3 вируса гепатита С, о чем свидетельствует полоса преципитации в области 32 кДа, соответствующей области электрофоретической подвижности полученного рекомбинантного полипептида.

Данный полипептид будет использоваться в качестве антигена в тест-системе диагностической рекомбинантной для выявления антител к вирусу гепатита С.

#### Литература

1. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome / Q.L. Choo [et al.]. — Science. — 1989. — Vol. 244, N 4902. — P. 359-362.
2. Pawlotsky, J.M. Diagnostic tests for hepatitis C / J.M. Pawlotsky // J. Hepatol. — 1999. — Vol 31, suppl. 1. —P. 71-79.
3. Antibody negative HCV infection in HIV-positive individuals / S. Georg [et al.] // Proc. 10th Int. Symp. Viral Hepat. Liver Dis. — Antiviral Ther. — 2000. — Vol. 5, suppl. 1. — P. 70.
4. Definition of false-positive reactions in screening for hepatitis C virus antibodies / M. Schroter [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37, N 1. — P. 233-234.
5. False-positive tests for syphilis associated with human immunodeficiency virus and hepatitis B virus infection among intravenous drug abusers. Valencian Study Group on HIV Epidemiology / I. Hernandez-Aguado [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 1998. — Vol. 17, N 11. — P. 784-787.
6. False-positive reaction between syphilis and hepatitis C infection / E. Sonmez [et al.] // Isr. J. Med. Sci. — 1997. — Vol. 33, N 11. — P. 724-727.
7. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites / A. Grakoui [et al.] // J. Virol. — 1993. — Vol. 67. — P. 2832-2843.
8. Hepatitis C virus NS3 protein polypeptide stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes / J.A. Suzich [et al.] // J. Virol. — 1993. — Vol. 67. — P. 6152-6158.
9. Antigenicity of a recombinant NS3 protein representative of ATPase/helicase domain from hepatitis C virus / N. Pentón [et al.] // Clin. Biochem. — 2003. — Vol. 36, N 1. — P. 41-49.
10. Dipti, C.A. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity / C.A. Dipti, S.K. Jain, K. Navin // Protein Expr. Purif. — 2006. — Vol. 47, N 1. — P. 319-328.
11. A new NS3 recombinant protein shows improved antigenic properties for HCV diagnosis / D.O. Palenzuela [et al.] // Biotecnología Aplicada. — 2006. — Vol. 23. — P. 94-98.

Поступила 03.08.2012

## ISOLATION AND ANTIGENIC CHARACTERISTICS OF RECOMBINANT POLYPEPTIDE, INCLUDING ANTIGENIC DETERMINANTS OF HEPATITIS C VIRUS NONSTRUCTURAL NS3 PROTEIN

Fomina E.G., Scheslenok E.P., Shkolina T.V., Fomin D.I., Vladyko A.S.

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

We obtain a recombinant polypeptide containing the antigenic determinants of hepatitis C virus non-structural NS3 protein. The protein reacted only to antibodies in the HCV positive plasma showing a high sensitivity and specificity in immunoblotting. The resulting polypeptide was used as an antigen for a complete set of test-systems for detection of antibodies to hepatitis C virus.

**Keywords:** recombinant polypeptide, antigen specificity, test system, antibodies detection, hepatitis C virus.

## ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

Гулинская О.В., Цыркунов В.М.

*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь*

**Резюме.** На госпитальном этапе проведена комплексная оценка показателей углеводного обмена у пациентов с хроническим гепатитом С в сочетании с сахарным диабетом и без сопутствующей патологии. Для выявления инсулинорезистентности были определены уровень глюкозы крови, инсулина и С-пептида, а также рассчитаны индексы НОМА-IR и НОМА--cell. Полученные в результате исследования данные о наличии инсулинорезистентности у пациентов с хроническим гепатитом С требуют коррекции и должны рассматриваться как одна из новых целей в терапии гепатита С.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, хронический гепатит С, инсулинорезистентность.

**Введение.** Хронический гепатит С (ХГС) является одной из самых распространенных инфекций у человека. В настоящее время в мире насчитывается до 500 млн. инфицированных вирусом гепатит С (HCV). HCV инфицированы 2–3% населения планеты и около 1,44% населения Беларуси. У пациентов с гепатитом С отмечена ассоциация с сахарным диабетом (СД). Распространенность СД 2 типа у пациентов с ХГС без цирроза колеблется от 4,9 до 33%. Распространенность HCV среди пациентов с СД как 1, так и 2 типа выше по сравнению с общей популяцией. В последнее время появляется все больше данных, подтверждающих прямое действие HCV на метаболизм глюкозы [1, 2].

Патогенетически СД 2 типа представляет собой гетерогенную группу нарушений обмена веществ, что определяет его значительную клиническую неоднородность. В основе его патогенеза лежит инсулинорезистентность (снижение опосредованной инсулином утилизации глюкозы тканями), реализуемая на фоне секреторной дисфункции β-клеток, заключающейся в замедлении «раннего» секреторного выброса инсулина в ответ на увеличение уровня глюкозы в крови. При этом 1-я (быстрая) фаза секреции, заключающаяся в опорожнении везикул с накопленным инсулином, фактически отсутствует, тогда как 2-я (медленная) фаза секреции, осуществляется в ответ на стабилизирующуюся гипергликемию постоянно, в тоническом режиме, и, несмотря на избыточную секрецию инсулина, уровень гликемии на фоне инсулинорезистентности не нормализуется.

Следствием гиперинсулинемии является снижение чувствительности и числа инсулиновых рецепторов, а также подавление пострецепторных механизмов, опосредующих эффекты инсулина (инсулинорезистентность). Вследствие инсулинорезистентности гепатоцитов и портальной гиперинсулинемии происходит гиперпродукция глюкозы печенью и развивается гипергликемия, которая выявляется у большинства пациентов с СД 2 типа, в том числе и на ранних этапах заболевания [3].

Сама по себе гипергликемия, неблагоприятно влияющая на характер и уровень секреторной активности  $\beta$ -клеток (глюкозотоксичность) и в конечном счете приводящая к истощению продукции инсулина  $\beta$ -клетками, приводит к развитию у пациентов симптомов дефицита инсулина — похудения, кетоза, особенно при сопутствующих инфекционных заболеваниях, включая ХГС. Тем не менее, остаточная продукция инсулина, которой оказывается достаточно для предотвращения кетоацидоза, при СД 2 типа практически всегда сохраняется.

При СД 2 типа, ожирении и гиперлипидемии, также нарушается соотношение между количеством жира, проникающего в печеночную клетку, и способностью клетки к его утилизации. Главная опасность этого состояния заключается в том, что избыточный жир под влиянием разнообразных факторов начинает окисляться с образованием высокоактивных соединений, дополнительно повреждающих печеночную клетку [4].

Так, СД 2 типа чаще наблюдается среди пациентов с HCV-ассоциированным циррозом печени по сравнению с популяцией пациентов, имеющих цирроз печени иной этиологии. Мультивариантный анализ показал, что HCV-инфекция может рассматриваться как независимый предиктор развития СД 2 типа, а во многих нормативных документах национальных гепатологических ассоциаций СД 2 типа рассматривается как одно из внепеченочных проявлений ХГС. Эти данные могут свидетельствовать о тесной взаимосвязи HCV-инфекции и частоты развития СД 2 типа. Поскольку у пациентов ХГС повышен риск развития резистентности к инсулину, они могут сталкиваться с отдаленными последствиями ХГС (цирроз, печеночноклеточный рак, смерть) и СД (ожирение, сердечно-сосудистые заболевания, смерть). Пациентов с ХГС следует регулярно обследовать на резистентность к инсулину, сердечно-сосудистые заболевания и СД [5, 6].

Снижение уровня инсулина наблюдается при СД 1 типа, тогда как при СД 2 типа уровень инсулина может быть в норме, либо повышен (гиперинсулинизм). Концентрации инсулина у здоровых людей варьирует от 4 до 25 мкМЕ/мл, но инсулин метаболизируется преимущественно печенью, а метаболизм и выведение С-пептида осуществляется почками, поэтому определение данного показателя может быть полезным для правильной интерпретации изменений содержания инсулина в крови при нарушении функции печени. Уровень С-пептида натощак равен 0,5–3,2 нг/мл. Повышение уровня С-пептида наблюдается при гипертрофии  $\beta$ -клеток и при СД 2 типа, снижение — при СД 1 типа, при инсулинотерапии (нормальная реакция поджелудочной железы в ответ на введение экзогенного инсулина) и при инсулинорезистентном СД 2 типа [7].

В настоящее время существует несколько подходов к диагностике инсулинорезистентности (метод эугликемического гиперинсулинемического клэмпса, расчеты индексов НОМА, FGIR и QUICKI, по Саго и др.).

Наиболее простым, доступным и информативным методом оценки резистентности к инсулину является индекс инсулинорезистентности НОМА-IR (НОМА-IR — Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) — это соотношения уровней глюкозы и инсулина натощак (Н), которое рассчитывают по формуле:

$$\text{НОМА-IR} = [\text{ГлН (ммоль/л)} \times \text{ИнсН (мкМЕ/мл)}] : 22,5,$$

где ГлН — концентрация глюкозы в сыворотке крови натощак;

ИнсН — концентрация инсулина в сыворотке натощак.

За оптимальный показатель НОМА-IR принимается его значение 1,0.

Согласно литературным данным признаком наличия инсулинорезистентности является увеличение индекса НОМА-IR выше 2,16 [8, 9]. Для более полной диагностики совместно с индексом НОМА-IR определяют индекс НОМА- $\beta$ -cell, который является показателем функции  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, который рассчитывается по формуле:

$$\text{НОМА-}\beta\text{-cell} = [20 \times \text{ИнсН (мкМЕ/мл)}] : [\text{ГлН (ммоль/л)} - 3,5],$$

где ГлН — концентрация глюкозы в сыворотке крови натощак;

ИнсН — концентрация инсулина в сыворотке натощак.

Идеальной нормальной функции  $\beta$ -клеток соответствует показатель НОМА- $\beta$ -cell = 100%, а признаком гиперфункции  $\beta$ -клеток поджелудочной железы является увеличение индекса НОМА- $\beta$ -cell свыше 230,76% [10].

**Цель исследования:** диагностика инсулинорезистентности по основным показателям углеводного обмена у пациентов с ХГС на фоне СД и без сопутствующей патологии.

**Материалы и методы** исследования. Были обследованы 65 пациентов с ХГС, у 35 из которых ХГС протекал на фоне СД (I группа — ХГС+СД) и 30 пациентов с ХГС без сопутствующих заболеваний (II группа). В группы включены пациенты, сопоставимые по возрасту и полу (возраст колебался от 38 до 70 лет). Длительность СД и ХГС не превышала 15 лет. Диагноз СД был верифицирован и все пациенты получали медикаментозную терапию. Диагноз ХГС был подтвержден наличием у всех пациентов общепринятых вирусологических, иммунологических, морфологических (у ряда пациентов) и клинико-биохимических маркеров инфекционного процесса.

У всех пациентов, помимо общеклинических лабораторных исследований, определялись следующие показатели: глюкоза крови натощак, глюкоза крови через 2 часа после еды, уровень инсулина и С-пептида. Кроме того рассчитывались индексы инсулинорезистентности (НОМА-IR) и гомеостатический индекс функции  $\beta$ -клеток поджелудочной железы (НОМА- $\beta$ -cell).

Проверка на нормальность распределения оцениваемых показателей проводилась с помощью критерия Шапиро–Уилка W. Сравнение описательных характеристик между группами обследованных проводилось с помощью t-теста (теста Стьюдента) и с помощью U-критерия Манна–Уитни. Значения приведены как среднее значение  $M \pm$  стандартное отклонение (SD). Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ . Статистический анализ проводился с помощью программы Statistica 6.0

**Результаты и их обсуждение.** Данные основных показателей углеводного обмена и печеночного гомеостаза, а также их сравнение у пациентов обследуемых групп, отражены в табл.

Таблица — Сравнительная характеристика основных показателей углеводного обмена у пациентов ХГС и СД ( $M \pm SD$ )

Показатель	Группа I (СД+ХГС), n=35	Группа II (ХГС), n=30	p
АсАТ, Ед/л	78,77 $\pm$ 62,87	114,73 $\pm$ 99,11	0,03
АлАТ, Ед/л	91,57 $\pm$ 71,98	143,10 $\pm$ 104,75	0,007
Глюкоза натощак, ммоль/л	8,05 $\pm$ 2,48	4,93 $\pm$ 0,59	0,0001
С-пептид, нг/мл	1,719 $\pm$ 1,278	0,660 $\pm$ 0,622	0,0001
Инсулин, мкМЕ/мл	22,49 $\pm$ 20,27	24,53 $\pm$ 15,82	0,151
НОМА-IR	7,86 $\pm$ 7,36	5,68 $\pm$ 4,33	0,46
НОМА- $\beta$ -cell, %	149,03 $\pm$ 192,32	330,65 $\pm$ 143,05	0,001

Примечание:

1.  $M \pm SD$  — стандартное отклонение;
2. p — достоверность различий между I и II группами;
3. СД — сахарный диабет, ХГС — хронический гепатит С;
4. АсАТ — аспаргатаминотрансфераза, АлАТ — аланинаминотрансфераза;
5. НОМА-IR — индекс инсулинорезистентности, НОМА- $\beta$ -cell — гомеостатический индекс функции  $\beta$ -клеток поджелудочной железы.

Как видно из табл., показатели активности АсАТ и АлАТ были достоверно выше у пациентов с ХГС без сопутствующего СД, что свидетельствовало об более выраженной лабильности мембран гепатоцитов и более активном воспалительном процессе, а с другой стороны, могло быть связано с наличием более выраженной жировой дистрофии (гепатоза) у пациентов ХГС, протекающем на фоне СД.

При исследовании углеводного обмена показатель глюкозы крови натощак был достоверно выше у пациентов I группы, тогда как при «чистом» варианте ХГС данный показатель существенно не отличался от нормы.

В связи с тем, что уровень инсулина не имел статистически значимых отклонений в группах сравнения, было проведено определение уровня С-пептида, который позволяет оценить секрецию инсулина даже на фоне приема экзогенного инсулина, что важно при обследовании больных с СД, протекающим на фоне сопутствующего ХГС.

Как видно из табл. 1, у пациентов II группы отмечено достоверное снижение уровня С-пептида, что было косвенным признаком резистентности к инсулину.

При подсчете индекса НОМА-IR установлено, что высокий уровень (более 2,16) был выявлен у 30 пациентов I группы (85,7%) и у 27 пациентов II группы (90%). Это доказывало наличие инсулинорезистентности у пациентов с ХГС. При сопоставлении величины индекса НОМА-IR в группах показатели существенно не отличались, несмотря на то, что II группа не имела нарушений уровня гликемии натощак, и соответственно, СД.

Индекс НОМА-β-cell был выше нормы у 17,1% (6 пациентов) I группы, что позволяло заключить о наличии у пациентов данной группы адекватной коррекции углеводного обмена. Тогда как, во 2 группе индекс НОМА-β-cell выше допустимой нормы наблюдался у 76,7% (23 пациента), что свидетельствовало о наличии гиперфункции β-клеток поджелудочной железы у данной категории пациентов и предполагало проведение немедленной коррекции. При сравнении величин индекса НОМА-β-cell в группах установлено, что во 2 группе наблюдалось достоверное увеличение данного показателя, подтверждающее гиперфункцию β-клеток поджелудочной железы у пациентов с ХГС ( $p < 0,001$ ).

**Заключение.** Инсулинорезистентность при хроническом гепатите С является закономерным процессом, относящимся к внепеченочным проявлениям HCV-инфекции. Существующие математические модели оценки инсулинорезистентности (НОМА-IR и НОМА-β-cell) позволяют диагностировать скрытую резистентность к инсулину у пациентов с хроническим гепатитом С. Формирование латентно протекающей инсулинорезистентности при ХГС необходимо рассматривать как одну из новых задач в диагностике и терапии.

#### Литература

1. Жаров, С.Н. Гепатит С / С. Н. Жаров, Б. И. Санин, В. И. Лучшев // Леч. врач. – 2008. – № 4. – С. 2-4.
2. Chronic hepatitis C and type II diabetes mellitus: a prospective cross-sectional study / C.O. Zein [et al.] // Am. J. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 100. – P. 48-55.
3. Bugianesi, E. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease / E. Bugianesi, A.J. McCullough, G. Marchesini // Hepatology. – 2005. – Vol. 42. – P. 987-1000.
4. Community-based study of hepatitis C virus infection and type 2 diabetes: an association affected by age and hepatitis severity status / C.S. Wang [et al.] // Am. J. Epidemiol. – 2003. – Vol. 158. – P. 1154-1160.
5. Kawaguchi, T. Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2 / T. Kawaguchi, T. Ide, E. Taniguchi // Am. J. Gastroenterology. – 2007. – Vol. 102. – P. 570-576.
6. Mehta, S.H. Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes / S.H. Mehta, F.L. Brancati, S.A. Strathdee // Hepatology. – 2003. – Vol. 38. – P. 50-56.
7. Beischer, W. Proinsulin and C-peptide in humans / W. Beischer // Hormones in Normal and Abnormal Human Tissues / eds. Fotherby and S. Pal. – Berlin: Walter De Gruyter. – 1983. – P. 1-43.
8. Yazicioglu, G. Insulin resistance in chronic hepatitis C / G. Yazicioglu, F. Isitan, H. Altunbas // Int. J. Clin. Pract. – 2004. – Vol. 58. – P. 1020-1022.
9. Инсулинорезистентность и методы ее диагностики / М.Г. Творогова [и др.] // Лаб. мед. – 2003. – № 6. – С. 24-28.
10. Bortoletto, G. Insulin resistance (IR) defined by the homeostasis model of assessment insulin resistance (НОМА-IR) index has a direct effect on early viral kinetics during pegylated-interferon therapy for chronic hepatitis C / G. Bortoletto, S. Realdon, F. Dal Pero // Hepatology. – 2007. – Vol. 46, suppl. 1. – P. 361.

Поступила 24.07.2012

## INSULIN RESISTANCE AT PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

Gulinskaya O.V., Tsyrkunov V.M.

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

The hospital stage complex assessment of carbohydrate metabolism indicators in patients with chronic hepatitis C in a combination with diabetes and without comorbidity has been carried out. To identify insulin resistance blood glucose, insulin and C-peptide levels were determined, as well as the HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) and HOMA- $\beta$ -cell indexes were calculated. The research data obtained on the presence of insulin resistance in patients with chronic hepatitis C demand correction from patients require correction and should be considered as one of the new targets in the hepatitis C therapy.

**Keywords:** diabetes mellitus, chronic hepatitis C, insulin resistance.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЭЛАСТАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПАНКРЕАТИТОМ

Окулич В.К., Прудников А.Р. Корнилов А.В., Сосинович Д.Г.,  
Савкина Ю.Г., Гончарова А.И.

*Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь*

**Резюме.** Исследована активность панкреатической и нейтрофильной эластаз в сыворотке пациентов с острым панкреатитом. В результате проведенного исследования установлена корреляционная зависимость между активностью панкреатической эластазы и уровнем глюкозы в крови, что может указывать на снижение продукции поджелудочной железой инсулина у больных с острым панкреатитом. Также установлена связь между уровнем нейтрофильной эластазы и содержанием сегментоядерных нейтрофилов в крови, что может, показывает активность процесса воспаления в поджелудочной железе.

**Ключевые слова:** эластаза, БАПНА-амидаза, острый панкреатит.

**Введение.** Серьезной медицинской проблемой являются заболевания поджелудочной железы, к которым относится панкреатит. Панкреатит — группа заболеваний и синдромов, при которых наблюдается воспаление поджелудочной железы.

Острый панкреатит является одной из сложных и окончательно не решенных проблем хирургии. Заболеваемость острым панкреатитом из года в год неуклонно растет и варьирует в пределах 200–800 пациентов на 1 млн. населения в год (по данным мировой статистики) [1]. Наиболее тяжелым контингентом больных с острыми воспалительными заболеваниями поджелудочной железы являются пациенты с гнойно-некротическими осложнениями острого панкреатита. Основными причинами летальных исходов при остром панкреатите (деструктивном) являются панкреатогенный шок и полиорганная недостаточность в ранние сроки заболевания и гнойные осложнения в более поздний период. Присоединение инфекции при панкреонекрозе резко ухудшает прогноз заболевания и в 1,5–2 раза увеличивает летальность, а среди выживших больных у многих возникает стойкая утрата трудоспособности. Гнойные осложнения развиваются у 30% больных и диагностируются в сроки от 14 до 30 дней с момента развития острого панкреатита [2]. В ряде случаев с самого начала процесс в поджелудочной железе приобретает характер гнойного воспаления с образованием флегмоны или абсцесса. В таких случаях первичная роль инфекции несомненна. Однако чаще всего при остром панкреатите роль инфекции второстепенна, когда на фоне развивающихся в железе изменений происходит вторичное инфицирование очагов некроза с развитием всех основных признаков гнойного процесса [3].

Принято различать экзогенные и эндогенные источники инфицирования хирургического больного. Ведущую роль в эндогенном инфицировании отводят микрофлоре

желудочно-кишечного тракта. В качестве наиболее вероятных путей достижения места локализации при панкреатите указывают транслокацию микроорганизмов из кишечника, гематогенную диссеминацию, попадание возбудителя в поджелудочную железу во время рефлюкса содержимого желчевыводящих путей или двенадцатиперстной кишки. При экзогенном инфицировании микроорганизмы из внешней среды проникают в зоны некроза через дренажные трубки или тампоны. Но вопрос об источниках послеоперационных гнойных осложнений и путях распространения возбудителей до конца не изучен, что является существенной причиной неудовлетворительных результатов лечения больных с инфекционными осложнениями острого панкреатита [4, 5].

Существует много инструментальных и лабораторных методов диагностики заболеваний поджелудочной железы. У больных панкреатитом исследуют кровь, мочу, слюну, каловые массы, дуоденальное и перитонеальное содержимое. При этом наибольшее значение имеют следующие показатели: повышение уровня амилазы в крови и моче в 5–10 раз, появление эластазы-1 в плазме крови и кале, повышение уровня трипсина в сыворотке крови, снижение его ингибитора и уменьшение отношения ингибитор/трипсин и др. [4].

Однако не все ферменты поджелудочной железы являются специфичными. Например, содержание в крови такого фермента, как амилаза, может изменяться при карциноме поджелудочной железы, гепатите, паротите, хронической почечной недостаточности. Поэтому для диагностики панкреатита целесообразно использовать тот фермент, который выделяется только поджелудочной железой.

Иммуноферментный метод определения эластазы-1 в кале на сегодняшний день является «золотым стандартом» — самым информативным из неинвазивных методов диагностики экзокринной недостаточности поджелудочной железы. Этот фермент абсолютно специфичен для поджелудочной железы, не разрушается при прохождении через ЖКТ и, что немало важно, на результаты теста не влияет заместительная ферментная терапия. Также используется метод определения сывороточной БАПНА-амидазной активности, который является более простым в использовании и намного дешевле, так как является микрометодом, что расширяет возможности его использования и при других хирургических инфекциях [6].

Несмотря на сравнительно большую чувствительность определения уровня трипсина и эластазы в динамике заболевания, в диагностике острого панкреатита определение активности этих панкреатических ферментов не имеет широкого клинического применения, в связи с трудоемкостью и дороговизной методик.

Поэтому разработка новых лабораторных методов диагностики панкреатита представляет, несомненно, практический интерес.

**Цель исследования:** изучить уровень активности панкреатической и нейтрофильной эластазы, а также БАПНА-амидазы в сыворотке крови пациентов с острым панкреатитом.

**Материалы и методы.** Нами была модифицирована методика определения активности эластазы в биологических жидкостях, которая была предложена К.-Н. Jung и Н. J. Kim [7]. Сущность модификации заключалась в том, что вместо дорогостоящих фильтров, предназначенных для извлечения из раствора остатков эластин-Конго красного, было применено осаждение субстрата путем центрифугирования [8].

Забор сыворотки крови брали у пациентов, находившихся на лечении на базе больницы скорой медицинской помощи города Витебска. Для исследования эластазной активности сыворотки крови было взято 20 сывороток больных с острым панкреатитом, которые были разделены на две группы: группа 1 с панкреонекрозом и группа 2 — лица с острым панкреатитом без некротического процесса в поджелудочной железе.

Для определения эластазной активности пробы, содержащие сыворотку крови, перед использованием осаждали центрифугированием в течение 7 мин (10 тыс. об/мин; центрифуга MICRO 120). Для постановки метода использовали эластин-Конго красный

(диаметр частиц 37–75 микрон, производство Sigma) в концентрации 0,8 г на 1 мл буфера как субстрат для фермента, сыворотки, ротовую жидкость и 2 серии буферных растворов (0,2 М солянокислый трис-буфер) с рН 7,4 и 8,8, так как существует несколько разновидностей эластазы: панкреатическая с оптимумом рН 8,8 (ЕI 8,8) и нейтрофильная с оптимумом рН 7,4 (ЕI 7,4) Эластаза расщепляла эластин, и конго-красный переходил в раствор, изменяя его цвет с бесцветного на красный с максимальным спектром поглощения 495 нм (рисунок).

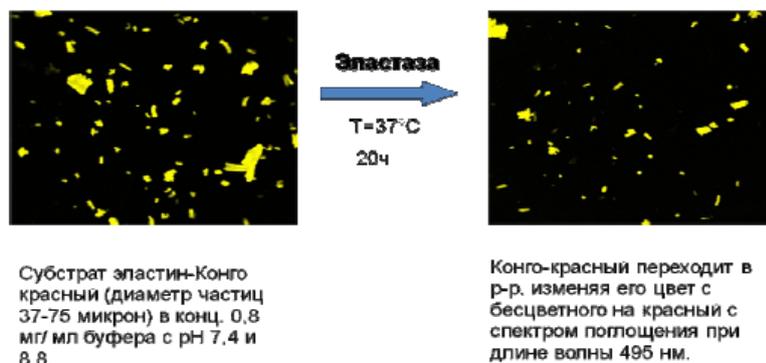


Рисунок — Снимок частиц эластазы до и после инкубации, полученный на конфокальном микроскопе

Для удобства постановки вместо пробирок использовались эппендорфы. В один ряд эппендорфов вносили последовательно: 400 мкл раствора эластин-Конго красного на трис-НСI буфере рН 7,4 и 100 мкл сыворотки крови или ротовой жидкости. Во второй ряд — по 400 мкл раствора эластин-Конго красного на трис-НСI буфере рН 8,8 и 100 мкл сыворотки крови. Контролем служили пробы, содержащие буферный раствор с соответствующим рН в количестве 400 мкл и 100 мкл сыворотки крови. Далее проводили инкубацию проб в термостате при  $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч. Затем пробы извлекали из термостата и центрифугировали в течение 7 мин (10 тыс об/мин; MICRO 120) для осаждения оставшегося эластина-Конго красного в виде не разрушенных частиц. Из надосадка брали в дублях по 150 мкл раствора и переносили в лунки 96 луночного полистиролового планшета. Планшет помещали в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 492 нм (максимально близкой к 495 нм) определяли оптическую плотность в лунках. Результат рассчитывался как разница оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных.

Для определения БАПНА-амидазной активности сывороток в качестве субстрата протеолиза использовали бензоиларгинин-р-нитроанилид. Выбор субстрата обусловлен тем, что распад БАПНА происходит только в результате расщепления амидной (аналога пептидной) связи по аминокислотам Arg-Lis. В лунки плоскодонного стерильного планшета для ИФА вносилось 0,2 мл раствора БАПНА (24 мг БАПНА растворяется в 0,9 мл диметилсульфоксида и доводится до 30 мл 0,05М трис-NaOH буфером-рН7,4) и 0,005 мл исследуемой сыворотки. Учет результатов реакции осуществлялся после 20-ти часовой инкубации при температуре  $37,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  на анализаторе иммуноферментном фотоэлектрическом при длине волны 410 нм [9].

**Результаты и их обсуждение.** Ранее нами было установлено, что у пациентов с острым панкреатитом средняя активность эластазы при рН 7,4 в сыворотке крови выше, чем у доноров. У группы доноров средняя активность фермента составила  $0,267\pm 0,04$  Еоп, для группы пациентов с острым панкреатитом —  $0,327\pm 0,109$  Еоп ; $p=0,01$  [9].

При сравнении уровней эластазной активности при рН 7,8 и 8,8 без разделения пациентов на группы достоверных различий получено не было (ЕI 7,4 —  $0,236\pm 0,109$ , ЕI 8,8 —  $0,260\pm 0,138$  ,  $p=0,249$ ).

Средний уровень эластазной активности при рН 7,4 в группе пациентов без панкреонекроза составил  $0,219 \pm 0,098$  Еоп, для группы пациентов с панкреонекрозом —  $0,288 \pm 0,130$  Еоп;  $p > 0,05$ . Средний уровень эластазной активности при рН 8,8 составил соответственно  $0,257 \pm 0,116$  Еоп и  $0,287 \pm 0,200$  Еоп ;  $p > 0,05$ .

Значимой корреляционной зависимости БАПНА-амидазной активности от активности различных видов эластазы обнаружено не было (БАПНА-амидаза и EL7,4  $R = 0,485$   $p = 0,185$ ; БАПНА-амидаза и EL8,8  $R = 0,0008$ ;  $p = 0,99$ ).

При исследовании корреляционной зависимости активности эластазы сыворотки крови с показателями биохимического анализа крови пациентов получены следующие данные, которые отражены в табл.

Таблица — Корреляционная зависимость показателей биохимического анализа крови у больных панкреатитом с активностью различных видов эластазы.

Вид эластазы	Глюкоза	Мочевина	Креатинин	Сегментоядерные нейтрофилы	Палочкоядерные нейтрофилы
El 8,8	$R = 0,46^* p = 0,04$	$R = -0,118$	$R = -0,418$	$R = 0,258$	$R = 0,055$
El 7,4	$R = 0,03$	$R = 0,090$	$R = 0,36$	$R = 0,482^* p = 0,019$	$R = 0,064$

Примечание: \* — статистически подтвержденные данные.

Во всех остальных случаях  $p > 0,05$ .

В результате можно констатировать, что обнаружена статистически подтвержденная корреляционная зависимость между активностью панкреатической эластазы и уровнем глюкозы в крови ( $R = 0,46$ ;  $p = 0,04$ ), между уровнем нейтрофильной эластазы и содержанием сегментоядерных нейтрофилов в крови ( $R = 0,482$ ;  $p = 0,019$ ).

#### Выводы:

1. С помощью модифицированной методики определения активности эластазы в биологических жидкостях установлен повышенный уровень нейтрофильной эластазы у больных острым панкреатитом по сравнению с донорской группой, однако статистически достоверных различий в активности эластазы при рН 7,4 и 8,8 получено не было, также не установлено достоверных различий в уровне эластазной активности между группами лиц с панкреонекрозом и с острым панкреатитом без осложнений.

2. Значимой корреляционной зависимости эластазной активности от уровня БАПНА-амидазной активности не обнаружено, что позволяет предположить, что данные активности имеют различное происхождение.

3. Статистически подтвержденная корреляционная зависимость между активностью панкреатической эластазы и уровнем глюкозы в крови ( $R = 0,46$ ;  $p = 0,04$ ), что может указывать на снижение продукции поджелудочной железой инсулина у больных с острым панкреатитом. Также установлена связь между уровнем нейтрофильной эластазы и содержанием сегментоядерных нейтрофилов в крови ( $R = 0,482$ ;  $p = 0,019$ ), что показывает активность воспаления.

#### Литература

1. Jonson, C.H. Pancreatic Diseases / C.H. Jonson, C.W. Imrie. — London; Berlin; Tokyo: Springer, 1999. — 253 с.
2. Савельев, В.С. Комплексное лечение панкреонекроза / В.С. Савельев, Б.Р. Гельфандт, М.И. Филимонов // Анналы хирургической гепатологии. — 2000. — № 2. — С. 12-16.
3. Савельев, В.С. Панкреонекроз. Состояние и перспектива / В.С. Савельев, В.А. Кубышкин // Хирургия. — 1993. — № 6. — С. 22-28.
4. Маркова, И.В. Фармакология / И.В. Маркова, М.В. Неженцев. — Сотис, 1994. — 456 с.
5. Фомина, И.П. Пефлоксацин (абактал): значение в современной терапии бактериальных инфекций / И.П. Фомина, Л.Б. Смирнова // Антибиотики и химиотерапия. 2000. — № 8. — С. 42-47.
6. Костюкевич, О.И. Хронический панкреатит: от патогенеза к терапии [Электронный ресурс] / О.И. Костюкевич // Рус. мед. журн. — Режим доступа [http://www.rmj.ru/articles\\_6765.htm](http://www.rmj.ru/articles_6765.htm). — Дата доступа: 22.07.2012.
7. Jung, K.-H. Development of an agar diffusion method to measure elastase inhibition activity using Eelastin-Congo

red [Electronic resource] / К.-Н. Jung, H.J. Kim // J. Microbiol. Biotechnol. – 2006 – Vol. 16, N 8. – P. 1320-1324. – Mode of access: [http://www.jmb.or.kr/journal/view2.html?book=Journal&tops=&start=0&scale=50&key=all&key\\_word=&Vol=16&Num=8&PG=&year1=&year2=&sort=publish\\_Date+desc&aut\\_box=Y&sub\\_box=Y&sos\\_box=&key\\_box=&pub\\_box=Y&abs\\_box=&mod=vol&mnum=12](http://www.jmb.or.kr/journal/view2.html?book=Journal&tops=&start=0&scale=50&key=all&key_word=&Vol=16&Num=8&PG=&year1=&year2=&sort=publish_Date+desc&aut_box=Y&sub_box=Y&sos_box=&key_box=&pub_box=Y&abs_box=&mod=vol&mnum=12). – Date of access: 12.09.2012.

8 Определение активности эластазы в биологических жидкостях / В.К. Окулич [и др.] // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации. – 2012 – №. 67. – С. 100-101.

9. Определение БАПНА-амидазной активности микроорганизмов, сывороток крови и иммуноглобулинов класса G: инструкция на метод, рег. № 6-0101 / В.К. Окулич [и др.]. – 2002.

10. Нестеренко, Ю.А. Гнойно-некротические осложнения острого панкреатита: руководство для врачей и преподавателей / Ю.А. Нестеренко, А.Н. Лищенко, С.В. Михайлуков. – М., 1998.

Поступила 12.09.2012

## DETERMINATION OF ELASTASE ACTIVITY IN SERUM

### OF PATIENTS WITH PANCREATITIS

Okulich V.K., Prudnikau A.R., Karnilau A.V., Sosinovich D.G., Saukina Y.G., Goncharova A.I.

*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus*

The activity of pancreatic and neutrophil elastases in serum of patients with acute pancreatitis has been investigated. The study established correlation between the activity of pancreatic elastase and blood glucose levels that may indicate a decrease in production of insulin from the pancreas of patients with acute pancreatitis. A link between the level of neutrophil elastase and the content of segmented neutrophils in the blood has been found that may show the activity of the process of inflammation in the pancreas.

**Keywords:** elastase, BAPNA-amidase, acute pancreatitis.

## ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ ПРИ ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ – КАК ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ФАКТОРЫ ЭТИОПАТОГЕНЕЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ

Амвросьева Т.В.<sup>1</sup>, Богущ З.Ф.<sup>1</sup>, Поклонская Н.В.<sup>1</sup>, Вайханская Т.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РНИЦ эпидемиологии и микробиологии;

<sup>2</sup>РНИЦ «Кардиология», Минск, Беларусь

**Резюме.** Работа посвящена изучению связи дилатационной кардиомиопатии с присутствием в организме пациентов кардиотропных вирусных патогенов, среди которых выбраны: энтеровирусы, вирус Эпштейна–Барр, вирус ветряной оспы, парвовирус В19, аденовирусы, вирусы простого герпеса, вирус герпеса человека 6 типа, цитомегаловирус. По результатам проведенных молекулярно-генетических исследований уровень выявления нуклеиновых кислот детектируемых возбудителей в тканях сердца пациентов составил 64,3%. Активная вирусная инфекция была зарегистрирована у 11,2% больных. Среди ассоциированных с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) кардиотропных вирусов наиболее часто определялись энтеровирусы, вирус герпеса человека 6 типа и парвовирус В19. Полученные данные обосновывают необходимость вирусологического обследования пациентов с ДКМП для выявления возможных этиопатогенетических факторов заболевания с последующей целенаправленной коррекцией проводимой терапии.

**Ключевые слова:** дилатационная кардиомиопатия, ДКМП-ассоциированные вирусные агенты.

**Введение.** В течение многих лет энтеровирусная инфекция (ЭВИ) ассоциировалась с развитием миокардитов и дилатационной кардиомиопатии (ДКМП). По результатам ВОЗ, полученным в течение 10-летнего периода наблюдений, вирусы Коксаки В наиболее часто ассоциируются с развитием кардиопатологии (34,6 на 1000), второе место занимают вирусы гриппа В (17,4 на 1000), далее следуют — вирусы гриппа А (11,7 на 1000), Коксаки А (9,1

на 1000) и цитомегаловирусы (ЦМВ) (8,0 на 1000) [1]. Доминирующая роль энтеровирусов (ЭВ) в развитии миокардитов была подтверждена многочисленными результатами исследований зарубежных и отечественных ученых [2–6]. С применением молекулярно-биологических методов диагностики для обнаружения вирусов *in situ* в тканях сердца было установлено, что частота ЭВИ сердца у больных миокардитами и ДКМП может составлять 30–50% [3, 4]. Результаты наших собственных исследований, проведенных в 2002–2004 гг. на группе пациентов РНПЦ «Кардиология» находятся в полном соответствии с этими данными: наличие энтеровирусной РНК было выявлено у 36,4% пациентов с хроническими кардитами и кардиомиопатиями [5, 6]. Позднее появилась информация о возможной роли в кардиопатологии ряда других вирусных агентов — аденовирусов (АдВ) [7], ЦМВ [8], вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), Варицелла–Зостер вируса (ВЗВ), вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ 6 т.), парвовируса В19 (ПВ-В19) [9, 10], вируса гепатита С (ВГС), вируса иммунодефицита человека и др.

Исходя из вышеизложенного, настоящая работа посвящена выявлению у больных с ДКМП маркеров вирусных инфекций, вызываемых ВПГ, ВЗВ, ЦМВ, ВГЧ 6 т., ПВ-В19, АдВ, ЭВ и ВЭБ — как предполагаемых этиопатогенетических факторов развития данной патологии.

**Материалы и методы.** В исследованиях использовали клинический материал 93 пациентов с клиническим диагнозом ДКМП, находящихся на стационарном лечении РНПЦ «Кардиология» в период с января 2011 г. по июнь 2012 г.: сыворотка крови (от 89 пациентов), а также образцы тканей сердца (от 14 пациентов). В качестве контроля исследовался клинический материал от пациентов (n=24) без клинических признаков кардиопатологии. При подборе пациентов в группу контроля учитывался средний возраст и процентное соотношение по половому признаку в соответствии с опытной группой пациентов.

Выявление IgM методом иммуноферментного анализа. Образцы цельной крови инкубировали 1 час при температуре 37 °С, затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 минут, после чего отбирали сыворотку. Детекцию IgM в сыворотках крови осуществляли с использованием коммерческой тест-системы «Тест-система диагностическая для выявления антител класса М к энтеровирусам методом иммуноферментного анализа» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Беларусь).

Выделение нуклеиновых кислот из сывороток крови и биопсийного материала. Для выделения вирусных нуклеиновых кислот из сывороток крови применяли коммерческие наборы «РНК-СОРБ» производства «АмплиСенс» (Россия) и «TRI-zol» производства «Qiagen» (Германия). Выделение вирусных нуклеиновых кислот из тканей сердца проводили с помощью лизирующего реагент «TRI-zol» производства «Qiagen» (Германия). Фрагменты биоптатов предварительно гомогенизировались.

Детекция вирусных нуклеиновых кислот. Реакция обратной транскрипции для получения энтеровирусной кДНК осуществлялась с использованием набора для обратной транскрипции «RevertAid» производства «Fermentas» (Литва) и «РЕВЕРТА-Л» производства «АмплиСенс» (Россия). Амплификация вирусных нуклеиновых кислот проводилась с использованием коммерческих тест-систем производства «АмплиСенс» (Россия). Для диагностики ЭВ, ВЗВ и ПВ-В19 использовалась ПЦР тест-система с учетом результатов в реальном времени. АдВ, ВПГ 1 и 2 типов, ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ 6 типа детектировались с помощью ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов.

Статистическую обработку проводили с помощью пакетов статистических программ «Statistica 6,0 for Windows», EXCEL. Данные считались статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$  по скорректированному критерию  $\chi^2$  и по точному одностороннему методу Фишера, применяемых в статистике при анализе качественных признаков.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты вирусологического обследования пациентов.

Группа пациентов с ДКМП (n=93) была обследована в отношении 8 возбудителей вирусных инфекций, ассоциируемых с развитием данной патологии: ВПГ 1 и 2 типов, ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ 6, ВЗВ, ПВ-В19, АдВ и ЭВ. Клинический материал (сыворотка крови, эндомикардиальные биоптаты) анализировался на наличие генетических маркеров всего вышеуказанного спектра кардиотропных вирусов, а в отношении ЭВ, как наиболее признанных вирус-ассоциантов ДКМП, проводились исследования сывороток крови по выявлению ранних маркеров инфекции — антиэнтеровирусных IgM.

По результатам проведенной гено- и серодиагностики у 27 из 93 обследованных пациентов были выявлены генетические и/или серологические маркеры детектируемых вирусных патогенов, что составило 29,0%.

Результаты детекции вирусных нуклеиновых кислот в тканях сердца пациентов с ДКМП. Наибольшую ценность в диагностике вирусных инфекций у кардиологических больных имеет факт выявления вирусного агента или его компонентов непосредственно в клетках сердца, что может свидетельствовать о его патогенной роли в развитии заболевания. В настоящее время достигнут определенный прогресс в области разработки относительно безопасных и доступных методов взятия биопсии сердечных тканей, однако эта процедура все же остается достаточно травмоопасной, вследствие чего ее применяют на практике только с точки зрения максимальной целесообразности. Несмотря на то, что биоптаты сердца по-прежнему являются «штучным» (редким) объектом исследования, нам удалось провести молекулярно-генетический анализ тканей сердца 14 пациентов с ДКМП. Проведенные исследования показали, что в миокарде 64,3% обследованных больных (у 9 из 14) присутствовал генетический материал одного или нескольких вирусных патогенов. При этом положительные результаты были получены в отношении 6 из 8 детектируемых возбудителей, среди которых (табл. 1) доминировал ВГЧ 6 типа (35,7%). Следующие позиции в рейтинге выявленных вирусных агентов заняли ЭВ (21,4%), ВЭБ и ПВ-В19 (по 14,3%), ВЗВ и АдВ (по 7,1%). Генетический материал ВПГ и ЦМВ в исследуемых биоптатах не был обнаружен.

Таблица 1 — Уровни выявления генетического материала кардиотропных вирусов в тканях сердца больных ДКМП

Вид материала	Кол-во позитивных пациентов / уровни выявления НК, %								Всего позитивных пациентов / уровень выявления НК, %
	ВПГ	ВЗВ	ЦМВ	ВЭБ	ВГЧ 6 т	ПВ-В19	АдВ	ЭВ	
Ткани сердца (n=14)	0	1 / 7,1	0	2 / 14,3	5 / 35,7	2 / 14,3	1 / 7,1	3 / 21,4	9 / 64,3

У большинства позитивных пациентов (66,7%) была зарегистрирована моноинфекция, у остальных (33,3%) имело место смешанное инфицирование тканей сердца двумя и более вирусными патогенами (рисунок 1).

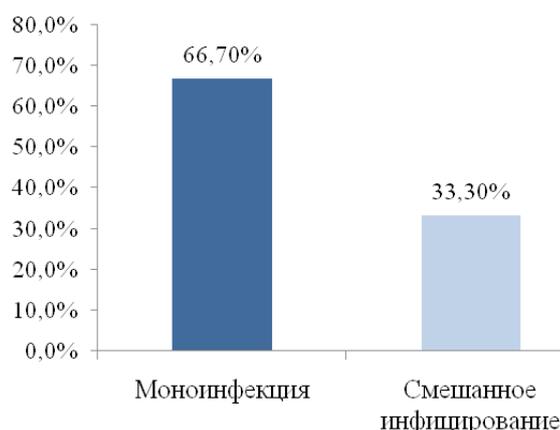


Рисунок 1 — Уровни моноинфекции и смешанного инфицирования в группе позитивных пациентов с ДКМП

В качестве возбудителей моноинфекции выступили ЭВ, ВГЧ 6 типа, ВЭБ (рисунок 2). Смешанное инфицирование было представлено следующими комбинациями кардиотропных вирусов: ВЗВ+ВГЧ 6 типа+АдВ+ПВ-В19; ВГЧ 6 типа+ ПВ-В19; ВЭБ+ВГЧ 6 типа.

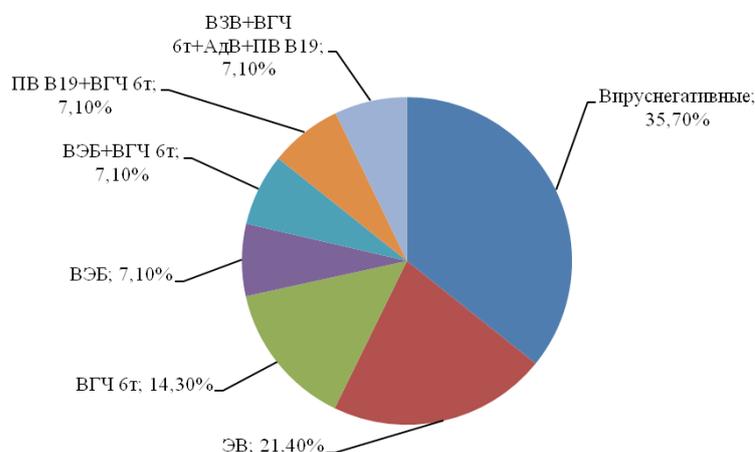


Рисунок 2 — Результаты молекулярно-генетических исследований биопсийных образцов тканей сердца пациентов с ДКМП

Уровни выявления маркеров вирусов-ассоциантов в сыворотке крови больных с ДКМП. По результатам проведенных исследований сывороток крови пациентов с ДКМП (n=89) общий уровень выявления генетических и/или серологических маркеров детектируемых возбудителей составил 21,3% (табл. 2). При этом в сыворотках крови определялись нуклеиновые кислоты практически всего исследуемого спектра кардиотропных вирусов, за исключением ЭВ и ВГЧ 6 типа. Среди обнаруженных вирусных патогенов доминировали ВЭБ и ПВ-В19 (3,3%).

Таблица 2 — Уровни выявления генетических и серологических маркеров кардиотропных вирусных агентов в сыворотках крови больных ДКМП

Вид материала	Кол-во позитивных пациентов / уровни выявления, %									Всего позитивных пациентов / уровень выявления НК и IgM, %
	НК								IgM	
	ВПГ	ВЗВ	ЦМВ	ВЭБ	ВГЧ 6 т	ПВ-В19	АдВ	ЭВ	ЭВ	
Сыворотка крови (n=89)	1 / 1,1	1 / 1,1	1 / 1,1	3 / 3,3	0	3 / 3,3	2 / 2,2	0	11 / 12,4	19 / 21,3
Группа контроля (n=24)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 / 4,2	1 / 4,2

Среди позитивных больных (n=19) генетические маркеры были зарегистрированы у 42,1% пациентов с ДКМП (n=8). Наличие антиэнтеровирусных Ig M обнаружено у 47,4% обследованных (n=9). У 10,5% пациентов (n=2), наряду с генетическим вирусным материалом, выявлялись Ig M к ЭВ (рисунок 3).

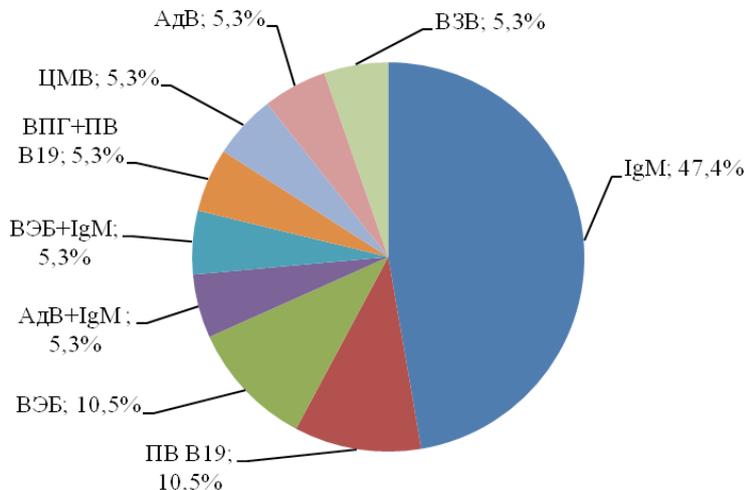


Рисунок 3 — Результаты исследований сывороток крови позитивных пациентов с ДКМП

Как известно, обнаружение вирусспецифического генетического материала в сыворотке крови указывает на наличие в организме больного активной вирусной инфекции. По результатам настоящих исследований общий уровень регистрации активной инфекции, вызванной кардиотропными вирусами, составил 11,2% (у 10 из 89 обследованных). Указанные уровни выявления вирусных нуклеиновых кислот в группе пациентов с ДКМП, при сравнении их с таковыми в контрольной группе, имели статистически достоверные различия ( $p=0,016$  по скорректированному критерию  $\chi^2$  и  $p=0,008$  по точному одностороннему методу Фишера).

Серологические маркеры ранней ЭВИ обнаруживались у 12,4% пациентов с ДКМП (11/89). При сравнении данного показателя с аналогичным в контрольной группе пациентов статистические различия оказались недостоверными ( $p>0,05$  по скорректированному критерию  $\chi^2$  и по точному одностороннему методу Фишера).

В целом же разница результатов комплексного вирусологического обследования больных с клиническим диагнозом ДКМП (всего 93 человека, из них позитивных — 27) и группы контроля, которую составили пациенты без каких-либо клинических признаков (всего 24 человека, из них позитивных — 1) была статистически достоверна ( $p=0,011$  по скорректированному критерию  $\chi^2$  и  $p=0,007$  по точному одностороннему методу Фишера). При этом отмечалось отсутствие корреляции между выявлением маркеров вирусных инфекций в сыворотке крови и в эндомикардиальных биоптатах больных ДКМП. Так, при параллельном исследовании клинического материала 9 пациентов только у 2 (22,2% — 2/9) маркеры вирусных инфекций были выявлены как в клетках сердца, так и в сыворотке крови. У 7 пациентов (77,8% — 7/9) при наличии инфицированности клеток сердца в сыворотке крови вирусные маркеры не определялись.

**Заключение.** Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют об относительно высоком уровне выявления у пациентов с ДКМП маркеров ряда вирусных инфекций. Представленные данные об ассоциации сердечной патологии с наличием в организме пациентов активной вирусной инфекции, сопровождающейся инфицированием эндомикардиальных тканей, является хорошей доказательной базой в пользу предполагаемой роли кардиотропных вирусов как возможных этиопатогенетических факторов в развитии ДКМП. Полученные в на-

стоящем исследовании результаты указывают на целесообразность и необходимость, при наличии анамнестических и клинических показаний, осуществления вирусологического обследования пациентов с ДКМП и использования молекулярно-генетических исследований эндомикардиальных биопсий с целью выявления вирусных факторов риска заболевания и коррекции проводимой терапии с включением в нее соответствующих противовирусных средств.

#### Литература

1. The causes of dilated cardiomyopathy: a clinicopathologic review of 673 consecutive patients / E.K. Kasper [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 1994. – Vol. 23. – P. 586-590.
2. Acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children / A..B. Martin [et al.] // Circulation. – 1994. – Vol. 90. – P. 330-339.
3. Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy / H.J. Why [et al.] // Circulation. – 1994. – Vol. 89. - P. 2582-2589.
4. Serological and molecular evidence of enteroviral infection in patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy / N.V. Paklonskaya [et al.] // 1st FEMS Congr. Eur. Microbiol: abstr. – Lubiana, 2003. – P. 483.
5. Современная схема лабораторной диагностики энтеровирусных инфекций сердца / Т.В. Амвросьева [и др.] // Журн. микробиол. – 2004. – № 3. – С. 58-62.
6. Энтеровирусные инфекции сердца у больных миокардитами и кардиомиопатиями / Т.В. Амвросьева [и др.] // Вестн НАН Беларуси. Сер. мед. наук. – 2004. – № 3. – С. 73-79.
7. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction / M. Pauschinger [et al.] // Circulation. – 1999. – Vol. 99. – P. 1348-1354.
8. Cytomegalovirus associated inflammatory heart muscle disease / B. Maisch [et al.] // Scand. J. Infect. Dis. – 1993. – Vol.88, supp 1. – P. 135-148.
9. Porter, H.J. B19 parvovirus infection of myocardial cells / H.J. Porter, A.M. Quantrill, K.A. Fleming // Lancet. – 1988. – Vol. 1. – P. 535-536.
10. Association of parvovirus B19 genome in children with myocarditis and cardiac allograft rejection: diagnosis using the polymerase chain reaction / K.O. Schowengerdt [et al.] // Circulation. – 1997. – Vol. 96. – P. 3549-3554.

Поступила 31.08.2012

## VIRAL INFECTIONS IN DILATED CARDIOMYOPATHY: POSSIBLE CAUSE OF DISEASE

**Amvrosieva T.V.<sup>1</sup>, Bohush Z.F.<sup>1</sup>, Poklonskaya N.V.<sup>1</sup>, Vaikhanskaya T.G.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Republican Research & Practical Centre for Epidemiology and Microbiology;*

<sup>2</sup>*Republican Research & Practical Centre «Cardiology», Minsk, Belarus*

The relationship between dilated cardiomyopathy (DCM) and the occurrence of cardiotropic viruses, such as enteroviruses, Epstein–Barr virus, varicella-zoster virus, parvovirus B19, adenoviruses, herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and cytomegalovirus have been investigated. Nucleic acids of these pathogens were detected in 64.3% of heart tissue samples of patients with DCM. Active viral infection was reported in 11.2% of patients. Among the pathogens associated with DCM, the most frequently detected were enteroviruses, human herpesvirus 6, and parvovirus B19. These data justify the need for identification of DCM-associated patient-specific viruses in order to adjust the treatment strategy accordingly.

**Keywords:** dilated cardiomyopathy, DCM-associated viruses.

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* НА НАНОКОМПОЗИТНЫЕ СЕНСОРНЫЕ ПОКРЫТИЯ ИЗ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ПРОТИВОХЛАМИДИЙНЫХ АНТИТЕЛ КЛАССА IGG: НАНОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Асташонок А.Н.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Созданы микросенсорные покрытия из поликлональных противохламидийных IgG, которые позволяют иммобилизовать различные по морфологии частицы *Chlamydia trachomatis*. Среди исследованных форм возбудителя методом атомно-силовой

микроскопии выявлены различия не только по размерам (высоте, длине, ширине), но и по структуре поверхностного S-слоя оболочки с гексагональным типом укладки, и прерывистости на поверхности локальных областей, содержащих шероховатые и гладкие участки. Представленные данные позволят расширить знания о структурной организации возбудителя, механизмах морфогенеза отдельных частиц хламидий и роли поверхностных структур, обуславливающих вирулентные и иммуногенные свойства *C. trachomatis*.

**Ключевые слова:** *Chlamydia trachomatis*, наноскопия, топография.

**Введение.** Среди многообразия инфекционной патологии человека значительный удельный вес занимают хламидийные инфекции, которые являются серьезной проблемой современного здравоохранения, так как имеют широкое распространение и существенно влияют на здоровье населения [1]. Особое место в структуре данных инфекций занимает вид *Chlamydia trachomatis*, имеющий способность поражать не только урогенитальный тракт, но и костно-суставную, дыхательную, сердечно-сосудистую, нервную и другие системы человека [2].

Известно, что хламидии существенно отличаются от других микроорганизмов жизненным циклом, который включает последовательную смену двух высокоспециализированных форм, адаптированных для внутри- и внеклеточного существования [3]. Уникальность такого цикла обеспечивает возможность не только репродукции внутри клетки-хозяина, но и преобразование под влиянием неблагоприятных факторов (обработка антибиотиками, цитокинами,  $\gamma$ -интерфероном, совместная репродукция с вирусами семейства *Herpesviridae*) в L-подобные или персистирующие формы возбудителя, способные к длительному существованию в организме в покоящемся состоянии, но при благоприятных условиях реверсировать в исходные активные формы [4, 5].

Многочисленные проведенные электронно-микроскопические исследования точно охарактеризовали внутреннюю морфологию ретикулярных (РТ), элементарных (ЭТ), а также промежуточных (ПТ) форм *C. trachomatis*, особенности морфогенеза возбудителя на различных фазах жизненного цикла и ультраструктуру мембраны, ограничивающей внутриклеточное хламидийное включение. С помощью сканирующей электронной микроскопии было показано, что возбудитель имеет неоднородную поверхность: на ней имеются многочисленные куполообразные полусферические выпячивания в виде выступов [5]. Эти структуры напоминают микрофиламенты, которые пронизывают внутреннюю цитоплазматическую мембрану и выходят из наружной мембраны возбудителя. Функция данных структур окончательно не установлена. Предполагается, что они участвуют не только во взаимодействии возбудителя с эукариотической клеткой, но и в транспорте питательных веществ из цитоплазмы инфицированных клеток внутрь мембраны включения для последующего созревания и дифференцировки ретикулярных и элементарных телец [6]. Для реализации фаз жизненного цикла необходим ряд последовательных биохимических превращений, природа которых, несмотря на интенсивное изучение, остается малоизученной. Ультраструктурные и биохимические различия между ЭТ и РТ, по-видимому, обусловлены особым механизмом регуляции экспрессии генов во время цикла развития [4]. Однако, каковы особенности деления на поздних стадиях морфогенеза РТ *C. trachomatis* для последующей дифференцировки в инфекционные ЭТ остаются практически неизученными. Также мало освещены вопросы, касаемые организации и укладки антигенов на поверхности различающихся по морфологии телец возбудителя, отвечающих за иммуногенные и вирулентные свойства.

**Цель исследования:** создать сенсорные покрытия из поликлональных противохламидийных антител класса IgG и иммобилизовать различные морфотипы частиц *C. trachomatis*, образовавшиеся при репродукции в культуре клеток.

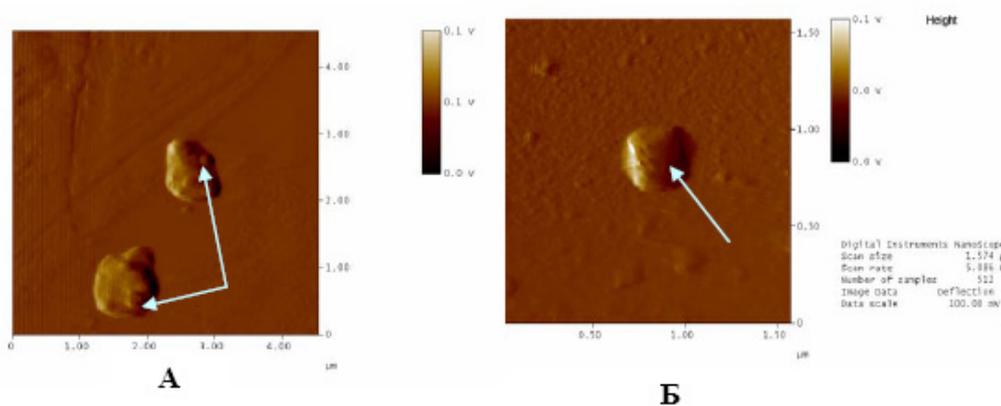
**Материалы и методы.** В работе использовали штамм *C. trachomatis* MT-2A (серовар D). Штамм адаптирован к перевиваемым клеточным линиям Vero, McCoу (инфекционный титр — 5,5 lg ТЦД50/мл). Для проведения атомно-силовой микроскопии перед иммобилизацией возбудителя использовали кремниевые подложки, предварительно

модифицированные с использованием методов микроконтактной печати для послойного осаждения полиэлектролитов и поликлональных биотинилированных противохламидийных IgG (PA 1-27223, Thermo Fisher Scientific, США), направленных к различным поверхностным детерминантам *C. trachomatis* [7]. На приготовленные подложки наносили аликвоты исследуемого материала в объеме 40 мкл. Подложки тщательно промывали водой, высушивали на воздухе и фиксировали в 70% этиловом спирте. Анализ поверхности проводили с помощью атомно-силового микроскопа «Veeco» («Nanoscope 3D», США) с использованием J-сканера. Использовали контактные 100- и 200-мкм кантилеверы «Nanogobe» из Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> с константой упругости 0,12 и 0,36 Н/м. Сила воздействия иглы на образец составляла 1–7 нН, а частота строчной развертки при получении изображения — 5 Гц. Статистическую обработку данных проводили на компьютере с применением пакета прикладных программ «STATISTICA 6». Достоверность различий между статистическими параметрами определяли по t-критерию Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** С использованием метода микроконтактной печати на поверхности гидрофильного кремния были сформированы сенсорные покрытия, состоящие из чередующихся полос бычьего сывороточного альбумина и противохламидийных биотинилированных IgG, промотирующих адгезию *C. trachomatis*.

При сканировании в контактном режиме с помощью атомно-силовой микроскопии на локально-активированной поверхности подложек выявлялись не только одиночные, крупные, преимущественно плеоморфной или кокковидной формы частицы, но и более мелкие округлой или овальной формы тельца в виде отдельных локальных скоплений и регулярных цепочек. Детальный анализ поверхности крупных и мелких форм, соответствующих элементарным, ретикулярным и переходным формам *C. trachomatis*, показал существенные различия не только по морфологии отдельных частиц, находящихся во внеклеточном пространстве, но и по средним размерам (высоте, ширине, длине), площади поверхности и чередовании зон, содержащих шероховатые и гладкие участки.

Крупные частицы, соответствующие, вероятно, вышедшим во внеклеточное пространство РТ *C. trachomatis*, были представлены следующими мортипами. Первый соответствовал тельцам овальной или слегка вытянутой формы размером  $0,65 \pm 0,02$  мкм, имеющие гладкую поверхность. Вторым был представлен одиночными тельцами кокковидной или плеоморфной формы размером  $0,89 \pm 0,01$ . Примечательно, что при детальном сканировании их поверхности были обнаружены локальные участки с «кратероподобными впадинами» между выступами (рисунок, А). Последние напоминали вид пузырьков или вздутий, располагались параллельно оси частицы и имели средние размеры 0,1–0,15 мкм. И, наконец, третий и четвертый типы визуализировались как крупные одиночные частицы размером от 1,1 до ~1,4 мкм, но с преобладанием гладких участков на поверхности.



- А — плеоморфные РТ с неоднородным микрорельефом на своей поверхности, обусловленным множественными пузырьками или вздутиями (показаны стрелками); размер скана — 4:4 мкм.  
 Б — плеоморфной формы ЭТ со сглаженными участками микрорельефа без характерных выступов или впадин на поверхности; размер скана — 1,5:1,5 мкм

Рисунок — АСМ фотографии частиц, соответствующих внеклеточным формам РТ и ЭТ *C. trachomatis* (штамм МТ-2А).

Согласно данным, полученным ранее [8, 9] поверхность оболочки ЭТ и РТ хламидий весьма не однородна: на ней имеются многочисленные выступы, имеющие диаметр порядка 50 нм, которые, как предполагается, представляют собой элементы секреторного аппарата возбудителя. Эти структуры могут служить в качестве каналов для обмена продуктами метаболизма между клеткой-хозяином и возбудителем. Подобные поверхностные выступы (surface projections) крепятся к структуре, напоминающей вид «цветка», которая состоит из 9 субъединиц. Обнаружение на поверхности крупных РТ *C. trachomatis* локальных зон, содержащих «пузырьки» и выступы диаметром ~0,1–0,15 мкм указывает на возможность деления и формирования из них ЭТ. Ультраструктурной основой такого процесса, по-видимому, является фрагментация протопласта возбудителя, необходимой для последующей отшнуровки сформированных мелких шаровидных форм во внеклеточное пространство. Это согласуется с данными [2, 5] о том, что для хламидий характерна асинхронность цикла развития, т.е. одновременное присутствие во внутриклеточном включении всех жизненных форм возбудителя. Некоторые исследователи, выявившие на ультраструктурном уровне подобные РТ для других представителей семейства *Chlamydiaceae*, полагают, что формирование ЭТ из этих частиц напоминает механизм своеобразной споруляции, что обуславливает возможность длительного переживания возбудителя во внеклеточном пространстве [9]. Тем не менее, биологический смысл и механизм данного явления остается в настоящее время практически неизученным.

Следует отметить, что в наших исследованиях визуализировались и мелкие, округлой или овальной формы тельца (рисунок, Б), располагавшиеся чаще всего одиночно или в виде скоплений из двух или трех соединенных друг с другом частиц. Они также различались по средним размерам (высоте, ширине, длине), площади поверхности. Однако поверхность таких частиц была структурированной и при воздействии иглой микроскопа с силой 5–7 нН их клеточная стенка сохраняла свою жесткость и упругость [10]. Напротив, при исследовании поверхности крупных частиц и надавливании на них той же силой кантилевером визуально наблюдались процессы ее отслоения. При этом их клеточная стенка разрывалась. Известно, что жесткий каркас других грамотрицательных бактерий представляет собой одну крупную гладкостенную мешкообразную структуру из сложного полисахарида-пептида — муреина. Однако в клеточной стенке хламидий отсутствует пептидогликановый слой, их наружная мембрана имеет ассиметричной волнообразной структуры, вследствие чего

целостность и структурированность поверхности элементарных и ретикулярных телец возбудителя поддерживается сложным комплексом (остовом), состоящим из двухслойных или унитарных мембран. Оболочка описанных нами крупных, одиночных РТ оказалась более разрыхленной, что, вероятно, свидетельствует о менее выраженной ригидности их наружной мембраны вследствие изменения и перераспределения на поверхности ключевых антигенов.

Помимо описанных выше двух внеклеточных форм возбудителя были выявлены одиночные овальной или слегка вытянутой формы частицы размером  $\sim 0,4-0,5$  мкм, соответствующие промежуточным или переходным формам хламидий. В отличие от ЭТ, они отличались присутствием на поверхности локальных зон, содержащих шероховатые участки. Известно, что промежуточные частицы имеют несколько большие размеры, чем элементарные тельца [6]. Кроме того, их внутренний матрикс представлен своеобразным фибриллярным нуклеоидом, находящимся на разных стадиях конденсации, а также рибосомами, локализуемых по периферии цитоплазмы. Обнаружение на поверхности данных частиц зон с шероховатыми участками указывает на особую упорядоченность в расположении ключевых поверхностных антигенов, обладающих вирулентной и иммуногенной активностью, а также, по-видимому, усиливающих метаболическую активность, что необходимо для участия в первичной дифференцировке возбудителя в инициальные (дисперсные) РТ и, наоборот, в ЭТ на ранних и поздних этапах морфогенеза *C. trachomatis*.

Таким образом, при наноскопии в контактном режиме отдельных более мелких частиц, соответствующих элементарным тельцам хламидий не было выявлено резких перепадов высот. Их поверхность сохраняла свою структурированность. Напротив, при детальном исследовании поверхности более крупных кокковидной или овальной формы частиц были выявлены существенные различия как по их средним размерам (высоте, ширине, длине), так и количеству локальных участков с шероховатыми участками. По-видимому, выявленные различия в поверхностной организации ЭТ, ПТ и РТ обусловлены не только биохимическими и молекулярно-генетическими характеристиками отдельных видов хламидий, но и в пределах конкретного вида определяются биологическими свойствами отдельных штаммов, относящихся к определенным сероварам возбудителя.

**Заключение.** Методом атомно-силовой микроскопии получены результаты, свидетельствующие о существовании гетерогенности в структурной организации различных морфологических форм возбудителя. Среди исследованных форм возбудителя выявлены различия не только по размерам (высоте, длине, ширине), но и структуре поверхностного S-слоя оболочки и прерывистости на поверхности локальных областей, содержащих шероховатые и гладкие участки. Кроме того, на поверхности оболочки крупных одиночных частиц, соответствующих РТ возбудителя, обнаружены зоны с «кратероподобными впадинами» между выступами. Последние напоминали вид пузырьков или вздутий, лежащих попарно параллельно оси частицы. Примечательно, что на поверхности более мелких частиц, соответствующих элементарным тельцам не было обнаружено подобных выступающих участков — поверхность их сохранялась преимущественно более структурированной. Вероятно, на этапе перехода РТ в ЭТ *C. trachomatis* имеет место не только простое деление без формирования перегородки, но и фрагментация участков кариоплазмы для отшнуровывания новых дочерних клонов. При этом внутри РТ образуются обособленные унитарные мембраны, служащие своеобразным «компартоментам» для формирования, созревания и последующего выброса элементарных частиц во внеклеточное пространство.

Таким образом, избранный подход на основе метода микроконтактной печати с использованием поликлональных противохламидиновых IgG позволяет иммобилизовать и визуализировать различные морфотипы *C. trachomatis*.

#### Литература

1. Адаскевич, В.П. Инфекции, передаваемые половым путем / В.П. Адаскевич. – Н. Новгород: Медицина, 2001. – 145 с.
2. Perry, L.L. Chlamydial colonization of multiple mucosae following infection by any mucosal route / L.L. Perry, S. Hughes // *Infect. Immun.* – 1999. – Vol. 67. – P. 3686-3689.
3. Битти, В.Л. Персистенция хламидий: от клеточных культур до патогенеза хламидийной инфекции / В.Л. Битти, Р.П. Моррисон, Д.И. Бирн // *Заболевания, передаваемые половым путем.* – 1995. – № 6. – С. 3-18.
4. AbdelRahman, Y.M. The chlamydial developmental cycle / Y.M. AbdelRahman, R.J. Belland // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2005. – Vol.29. – P. 949-959.
5. Chlamydia trachomatis enters a viable but noncultivable (persistent) state within herpes simplex virus type 2 co-infected host cells / S. Deka [et al.] // *Cell. Microbiol.* – 2006. – Vol. 8. – P. 149-162.
6. Wyrick, P.B. Chlamydia trachomatis persistence in vitro: an overview / P.B. Wyrick // *J. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 201. – P. 88-95.
7. Локальная модификация поверхности кремния молекулами белков / И.В. Парибок [и др.] // *Журн. общей химии.* – 2007. – № 3. – С. 395-399.
8. Miashita, N. The morphology of Chlamydia pneumonia / N. Miashita, Y. Kanamoto, A. Matsumoto // *J. Med. Microbiol.* – 1993. – Vol. 38. – P. 418-425.
9. Matsumoto, A. Electron microscopy observation of surface projections on Chlamydia psittaci reticulate bodies / A. Matsumoto // *J. Bacteriol.* – 1982. – Vol. 150. – P. 358-364.
10. Использование атомно-силовой микроскопии для визуализации Chlamydia trachomatis / А.Н. Асташонок [и др.] // *Современные достижения бионанотехнологии: сб. тез. 6-й междунар конф.* – М., 2012. – С. 8.

Поступила 07.08.2012

### **CHLAMYDIA TRACHOMATIS IMMOBILIZATION ON NANOCOMPOSITE SENSOR COATINGS WITH POLYCLONAL ANTICHLAMYDIAL IGG ANTIBODIES: NANOSCOPICAL RESEARCH**

**Astashonok A.N.**

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

Microsensor coverage with polyclonal antichlamydial IgG for immobilization of variety *Chlamydia trachomatis* morphotypes have been created. Among the investigated forms of the pathogen by using atomic-force microscopy there were revealed differences not only in size (height, width, length), but in structure of the S-layer surface with hexagonal type of lattice and interruption on their surface local areas with rough and smooth zones. These experimental data will permit to increase knowledge in structural organization of the pathogen, mechanisms of morphogenesis of the separate chlamydial particles and elucidate the role of surface structures, which provide virulent and immunogenic properties of *C. trachomatis*.

**Keywords:** *Chlamydia trachomatis*, nanoscopy, topography.

### **ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ И ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИТЕЛ В ВЫПОТАХ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РЕВМАТОИДНЫХ АРТРИТАХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ХЛАМИДИЙНОЙ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ**

**Дейкун Д.А.<sup>1</sup>, Рубаник Л.В.<sup>1</sup>, Асташонок А.Н.<sup>1</sup>, Князева О.Р.<sup>1</sup>, Ермолович М.А.<sup>1</sup>, Полещук Н.Н.<sup>1</sup>, Талако Т.М.<sup>2</sup>, Варонько И.А.<sup>2</sup>, Сорока Н.Ф.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

<sup>2</sup>*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В статье представлены результаты микробиологических и вирусологических исследований синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом, ассоциированным с хламидийной урогенитальной инфекцией (n=41).

**Ключевые слова:** вирусы, хламидии, синовиальная жидкость, ревматоидный артрит.

**Введение.** Ревматоидный артрит (РА) — хроническое системное иммуновоспалительное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением периферических

(синовиальных) суставов по типу деструктивно-эрозивного полиартрита. Проблема РА остается актуальной в практическом здравоохранении, поскольку занимает одно из лидирующих мест среди причин временной и стойкой утраты трудоспособности населения. Половина больных РА становятся инвалидами в первые 5 лет от начала заболевания. После 20 лет болезни примерно 90% пациентов инвалидизируются в большей или меньшей степени [1]. Установлено, что РА в основном болеют лица в возрасте 20–50 лет. Женщины в 3–4 раза чаще, чем мужчины. По данным ВОЗ, больные РА составляют 2% населения планеты [2].

До сих пор остается мало изученной этиология и многие механизмы патогенеза РА, что обуславливает актуальность постоянного поиска причин развития болезни. В настоящее время выявлено несколько инфекционных агентов, которые могут являться пусковым механизмом в развитии патологического процесса при ревматоидном артрите.

В ряде работ вирусы рассматриваются как возможные этиологические факторы различных форм артритов, в частности ревматоидного артрита. Цитомегаловирус, парвовирус В19, вирус Эпштейна–Барр, вирус простого герпеса, а также вирусы краснухи, ретровирусы и специфические фрагменты нуклеиновых кислот (НК) других вирусов обнаруживаются при ПЦР исследовании в синовиальной жидкости (СЖ) и синовиальной ткани (СТ) [3]. У таких пациентов чаще встречается моноинфекция, однако опубликованы данные о том, что в суставе могут обнаруживаться вместе несколько вирусных патогенов. Согласно исследованиям, могут встречаться два и более вирусов одновременно [1–4].

Актуальным на сегодняшний день является изучение артропатий бактериального генеза. СЖ и синовиальную оболочку исследуют на наличие НК и антител к *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Campylobacter sp*, *Mycoplasma sp*, *Neisseria*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Salmonella*, *Pseudomonas Mycobacterium tuberculosis* и др. [5–7] Однако, наибольшее внимание уделяется *Chlamydia trachomatis*. Имеются сообщения о выявлении хламидий или хламидийных антигенов как в синовиальной жидкости, так и в синовиальной ткани пациентов [8–10].

**Цель исследования:** используя микробиологические, вирусологические методы в сочетании с молекулярно-генетическим и иммунологическим анализом выявить наличие в СЖ возбудителей из различных классов и семейств и проследить наличие антител к этим патогенам.

**Материалы и методы.** Исследована СЖ 41 больного РА, находящегося на стационарном лечении и амбулаторном наблюдении отделения ревматологии УЗ «9-я клиническая больница» г. Минска. Возраст пациентов — от 15 до 75 лет ( $43 \pm 12$  лет), соотношение мужчин и женщин было 1:1,4. Продолжительность суставного синдрома до включения в исследование в среднем составила от одной недели до 10 лет ( $1 \pm 0,6$  года).

СЖ была одновременно исследована несколькими методами: ПЦР, ИФА, РИФ. Выделение ДНК проводили с помощью комплекта реагентов «Проба НК» (ДНК-Технология, Россия). Выявление ДНК хламидий проводили с помощью ПЦР набора «АмплиСенс *Chlamydia trachomatis*-Eph». Наличие ДНК герпесвирусов определяли с использованием ПЦР наборов «АмплиСенс HSVI,II-EPh», «АмплиСенс CMV-EPh» и «АмплиСенс EBV-EPh» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). ДНК парвовируса В19 выявляли методом гнездовой ПЦР с использованием праймеров к NS1-VP1u фрагменту генома: e1855f (5'-САСТАТГААААСТГГГСАА-3') и В19-R1 (5'-ГГААСТТССГГСАААСТТТССТТГ-3') в качестве наружной пары, e1863f (5'-АААСТГГГСААТАААСТАСАС-3') и В19-R2(5'-GТАГТСТТТТАСТАСТТГТГСТТГ-3') в качестве внутренней. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в 1x ТАЕ буфере.

Для выявления в СЖ видоспецифических иммуноглобулинов классов IgM, IgA, и IgG к *Chlamydia trachomatis* использовали ИФА наборы «Хламибест *C.trachomatis*-IgM», «Хламибест *C.trachomatis*-IgA» и «Хламибест *C.trachomatis*-IgG». Обнаружение IgG к белку теплового шока (сHSP60) хламидий проводили с помощью набора реагентов

«Хламидест сHSP60-IgG». Выявление IgG к главному белку наружной мембраны (МOMP) и плазмидному белку *pgp3 Chlamydia trachomatis* проводили, используя набор «Хламидест МOMP+pgp3-IgG». Постановку реакций проводили в соответствии с инструкциями производителя («Вектор-Бест», Россия). Учет результатов осуществляли на иммуноферментном анализаторе «АИФ-М/340» («Витязь», Республика Беларусь) при длине волны 450 нм.

Для выявления антител *Borrelia burgdorferi* проводили реакцию непрямой иммунофлюоресценции с использованием набора «НИФМ-Лайм-АТ» (РНПЦЭМ, Республика Беларусь). Учет результатов выполняли с помощью флуоресцентного микроскопа «Nikon E50i» (Nikon, Япония).

Для изучения СЖ с помощью электронной микроскопии, проводили инфицирование суточной культуры клеток McCoу согласно методическим рекомендациям «Метод выделения хламидий в культуре клеток McCoу. Определение чувствительности хламидий к противомикробным препаратам». Полученные образцы инфицированных культур клеток McCoу заключали в аралдит по общепринятой методике. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме Ultracut E (Reichert, Австрия) и исследовали на микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония).

**Результаты и их обсуждение.** Результаты ПЦР исследования показали, что наиболее часто в СЖ выявлялась ДНК Epstein–Barr virus: в 13 из 41 (31,7%) образцах. ДНК *Cytomegalovirus* и *Herpes simplex virus* 1 и 2 типов была обнаружена в разных образцах с равной частотой встречаемости (в 4,9% случаев). ДНК парвовируса В19 выявлялась у 2 из 28 (7,17%) пациентов. НК *Chlamydia trachomatis* была обнаружена в 3 из 41 (7,3%) случаях. Следует отметить, что в 2 из 29 (7,17%) случаев одновременно встречалась ДНК ЭБВ и парвовируса В19. В 1 из 41 (2,44%) одновременно обнаружена ДНК ВПГ и ЭБВ. В 2 из 41 (4,87%) образцах одновременно выявлялась ДНК *Chlamydia trachomatis* и ЭБВ.

Методом ИФА в синовиальной жидкости у 1 из 41 (2,4%) выявлены IgM и IgA к *Chlamydia trachomatis*. В 1 из 41 (2,4%) случая уровень антител IgM находился в серой зоне (сомнительный результат). IgG к МOMP *Chlamydia trachomatis* обнаружены в 7 из 41 (17,1%) образцах в титре 1:5. IgG к МOMP и плазмидному белку *pgp3 Chlamydia trachomatis* выявлены в 8 из 39 (20,5%) образцах СЖ, сомнительный результат получен в 2 из 39 (5,1%) случаев. Частота выявления IgG к белку теплового шока (сHSP60) хламидий в СЖ составила 4 из 40 (10,0%), в 2 из 40 (5,0%) был получен сомнительный результат.

Методом РИФ в 14 из 41 (34,1%) исследуемых СЖ были обнаружены антитела к спирохете *Borrelia burgdorferi* в титрах 1:64 — 1:512. Антитела в титре 1:32, расцениваемые как сомнительные, обнаружены в 10 из 41 (24,4%) случаев. Результаты в табл.

Таблица — Результаты исследования синовиальной жидкости

Результат	РИФ	ИФА					ПЦР				
	<i>Borrelia burgdorferi</i> IgG	<i>Chlamydia trachomatis</i>					<i>Chl. tr.</i>	ВПГ	ЦМВ	ЭБВ	Парво-вирус В19
		IgM	IgA	IgG	МOMP+pgp3 IgG	Hsp 60 IgG					
Пол.	14 34,1%	1 2,45%	1 2,4%	7 17,1%	8 20,5%	4 10,0%	3 7,3%	2 4,9%	2 4,9%	13 31,7%	2 7,17%
Отр.	17 41,5%	39 95,1%	40 97,6%	34 82,9%	29 74,4%	34 85,0%	38 92,7%	39 95,1%	39 95,1%	28 68,3%	26 92,9%
Сомн.	10 24,4%	1 2,45%	0	0	2 5,1%	2 5,0%	-	-	-	-	-
Общ. кол-во	41	41	41	41	39	40	41	41	41	41	28

Примечание:

1. РИФ — выявление антител возбудителя в реакции иммунофлюоресценции;
2. ИФА — выявление специфических антител методом иммуноферментного анализа;
3. ПЦР — выявление фрагмента ДНК методом полимеразной цепной реакции;
4. Пол. — положительный, Отр. — отрицательный, Сомн. — сомнительный.

В результате проведения ПЦР исследования в 17 из 41 (41,46%) образцах была обнаружена НК возбудителя(ей). В остальных 24 из 41 (58,54%) пробах НК исследуемых возбудителей не выявлялась. Моноинфекция установлена в 12 случаях из 17 (70,59%), в частности: *Chlamydia trachomatis* — у 1 пациента (n=12; 8,3%), *Herpes simplex virus* 1 и 2 типов — в 1 образце (n=12; 8,3%), *Cytomegalovirus* — в 2 пробах (n=12; 16,7%), *Epstein-Barr virus* — в 8 случаях (n=12; 66,6%). Микстинфекция выявлена в 5 образцах СЖ из 17 (29,41%). ДНК *Chlamydia trachomatis* и *Epstein-Barr virus* одновременно выявлялись в 2 случаях (n=5; 40%), ДНК *Parvovirus B19* и *Epstein-Barr virus* — в 1 пробе (n=5; 20%), ДНК *Herpes simplex virus* 1 и 2 типов и *Epstein-Barr virus* вместе обнаруживались у 1 пациента (n=5; 20%).

Следует отметить, что среди обследованного нами контингента лиц при исследовании СЖ ДНК *Chlamydia trachomatis* определялась сравнительно реже, чем НК герпесвирусов. *Chlamydia trachomatis* в диагностическом титре 10–3–10–5 ГЭ/мл нами была обнаружена лишь в 3 из 41 (7,3%) образцах. Вероятно, это связано с особой формой персистентной инфекции, при которой репликация нуклеиновой кислоты не высока. При этом необходимо учитывать, что предел чувствительности используемых коммерческих ПЦР тест-систем и направленность их на детекцию только одного консервативного участка генома, не всегда позволяет обнаружить нуклеиновую кислоту. Однако, в ряде работ отмечено, что при исследовании биоптатов синовиальной оболочки вероятность обнаружения ДНК возбудителя значительно выше, чем в СЖ. Это согласуется с работами, в которых показана возможность выделения *Chlamydia trachomatis* из синовиальной оболочки и способность возбудителя проникать и размножаться в хондроцитах [2, 9].

Кроме того, в синовиальной жидкости (выпоте) у части пациентов выявлялись специфические антитела к *Chlamydia trachomatis* в диагностически значимых титрах. По-видимому, антитела либо проникают путем диффузии из периферической крови, либо локально продуцируются плазматическими клетками в воспаленном суставе, благодаря чему активизируется система гуморального и клеточного иммунитета. Выявленная относительно высокая частота обнаружения в суставной жидкости антител к *Chlamydia trachomatis* указывает на важную роль хламидий в формировании локального очага воспаления.

Проведенное ультраструктурное исследование культуры клеток McCoy, зараженных материалом (синовиальной жидкостью) пациентов, позволило не только расширить класс выявляемых возбудителей, но и подтвердить наличие *Chlamydia trachomatis* в исследуемом материале. В результате проведенной работы были выявлены различные бактериальные и вирусные агенты, в частности *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma sp.*, *Borrelia sp.*, *Micrococcaceae* и представители семейства *Herpesviridae*.

Избранный подход с использованием комплексной лабораторной диагностики с одной стороны свидетельствует о наличии специфических противохламидийных антител в синовиальной жидкости у части пациентов, а с другой указывает на возможную роль других возбудителей, выступающих в качестве «помощников» в нарушении нормального функционирования костно-суставной системы при хламидиозе. Несомненно, вирусы также могут рассматриваться как возможные триггерные факторы в развитии аутоиммунных ревматических болезней.

**Заключение.** Выявление антигенов или нуклеиновой кислоты возбудителя(ей) в СЖ, в совокупности с выработкой специфического иммунного ответа свидетельствует о патогенетической роли возбудителя(ей) в формировании очага воспаления. Проведенный молекулярно-биологический и иммуноферментный анализ показал ассоциативную форму развития патологического процесса у части пациентов.

Таким образом, используя прямые и косвенные диагностические тесты в СЖ можно выявить несколько патогенов, относящихся к различным классам и семействам, что указывает на полиэтиологичность развития рематоидного артрита.

Дальнейшие исследования по изучению причин активации персистирующих вирусов

и бактерий, включая специфический антителогенез в локальном очаге, позволит расширить знания о патогенетических механизмах развития артропатий.

#### Литература

1. Сигидин, Я.А. Ревматоидный артрит / Я.А. Сигидин, Г.В. Лукина. – М.: АНКО, 2001. – 328 с.
2. Коршунов, Н.И. Ревматоидный артрит: диагностика и лечение / Н.И. Коршунов // Рус. мед. журн. – 2005. – Т. 13, № 14. – С. 956-962.
3. Detection of multiple viral DNA species in synovial tissue and fluid of patients with early arthritis / H. Stahl [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2000. – Vol. 59. – P. 342-346.
4. Latent Epstein-Barr virus (EBV) infection and cytomegalovirus (CMV) infection in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis determined by RNA- and DNA-in situ hybridization / Y. Mehraein [et al.] // Modern Pathology. – 2004. – Vol. 17. – P. 781-789.
5. Иммуногенные свойства и молекулярно-генетические особенности нативного и инактивированного штамма Chlamydia trachomatis MT-2A Серовар D / Н.Н. Полещук [и др.] // Журн. микробиол. – 2011. – № 5. – С. 51-56.
6. AlaChromosomal DNA from a variety of bacterial species is present in synovial tissue from patients with various forms of arthritis / C. Herve. [et al.] // Arth. Rheum. – 2001. – Vol. 44, N 7. – P. 1689-1697.
7. Bacterial DNA in synovial fluid cells of patients with juvenile onset spondyloarthropathies / C. Pacheco-Tena [et al.] // Rheumatology (Oxford). – 2001. – Vol. 40, N 8. – P. 920-927.
8. О патогенетических аспектах урогенных артритов, ассоциированных с хламидиями: возможность микроорганизмов размножаться в клетках суставного хряща / А.Ф. Панасюк [и др.] // Тер. архив. – 1998. – № 5. – С. 45-48.
9. Alteration of Chlamydia trachomatis biologic behavior in synovial membranes / R. Nanagara [et al.] // Arthr. Rheum. – 1995. – Vol. 38. – P. 1410-1417.
10. Особенности обнаружения и механизмы персистенции возбудителя Chlamydia trachomatis / Н.Н. Полещук [и др.] // Мед. новости. – 2003. – № 3. – С. 65-70.

Поступила 09.08.2012

## IDENTIFICATION OF THE PATHOGENS AND ANTIBODIES DETECTION IN THE SYNOVIAL FLUID EFFUSION AT RHEUMATOID ARTHRITIS ASSOCIATED WITH UROGENITAL CHLAMYDIAL INFECTIONS

Dejkun D.A.<sup>1</sup>, Rubanik L.V.<sup>1</sup>, Astashonok A.N.<sup>1</sup>, Kniazeva O.R.<sup>1</sup>, Yermolovich M.A.<sup>1</sup>,  
Poleschuk N.N.<sup>1</sup>, Talako T.A.<sup>2</sup>, Varonko I. A.<sup>2</sup>, Soroka N.F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;

<sup>2</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The results of microbiological and virological investigations of synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis associated with chlamydial urogenital infection have been presented (n = 41).

**Keywords:** viruses, *chlamydia*, synovial fluid, rheumatoid arthritis.

## ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ПОЛОВЫХ ПАРТНЕРОВ

Костюк С.А., Бадыгина Н.А., Гаврусев А.А., Кулага О.К.,  
Полуян О.С., Руденкова Т.В.

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

**Резюме.** Отличия в анатомии и физиологии репродуктивных систем у мужчин и женщин обуславливают различия в частоте выявления ДНК возбудителей инфекций урогенитального тракта. Для получения достоверных результатов ПЦР-анализа нужно правильно выбирать вид биологического материала для исследования. Для женщин оптимальным является комплексное взятие биологического материала, включающее соскобы из уретры, цервикального канала и заднего свода влагалища, а для мужчин в качестве биологического материала лучше всего подходит сок предстательной железы. При консультировании половых партнеров необходимо учитывать не только спектр возбудителей, выявленных у самого пациента, но и результаты, полученные у его партнера, для выбора адекватной лечебной тактики.

**Ключевые слова:** половые партнеры, урогенитальные инфекции, биологический материал.

**Введение.** Инфекции урогенитального тракта являются сложной медицинской проблемой в связи с их широким распространением, тяжестью вызываемых последствий и влиянием на репродуктивное здоровье населения. Сходства клинической картины течения инфекций урогенитального тракта различной этиологии определяют необходимость использования высокочувствительных и высокоспецифичных методов клинической лабораторной диагностики для постановки диагноза [1]. Характерными особенностями современного течения инфекций урогенитального тракта являются смешанный характер инфицирования и одновременное поражение нескольких органов урогенитального тракта. Широкое распространение антибактериальных препаратов приводит к включению адаптационных механизмов инфекционных агентов, что выражается снижением их патогенности, появлением атипичных малоактивных форм возбудителей, что существенно затрудняет процесс диагностического поиска и выбор лечебной тактики [2–4].

Различия в анатомии и физиологии репродуктивных систем мужчин и женщин, обуславливают различия в частоте выявления инфекционных агентов. Это связано в первую очередь с концентрациями возбудителей в биологическом материале из урогенитального тракта мужчин и женщин. Выявление возбудителей урогенитальных инфекций только у одного из половых партнеров создает проблемы для врачей клинических специальностей, затрудняя процесс диагностического поиска и препятствуя назначению адекватных схем лечения, а также ставит под сомнение как надежность методов применяемых для диагностики инфекций урогенитального тракта, так и компетентность сотрудников лабораторной службы [2, 5].

**Цель исследования:** изучить частоту выявления возбудителей инфекций урогенитального тракта *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*), *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*), *Ureaplasma urealyticum* (*Ur. urealyticum*), *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) у половых партнеров, имеющих в анамнезе длительный незащищенный контакт, используя метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

**Материалы и методы.** Выявление ДНК *C. trachomatis*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *Ur. urealyticum*, *T. vaginalis* было проведено методом ПЦР-РВ с использованием тест-систем «АмплиСенс» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ).

Основную группу исследования составили 52 пары (мужчины и женщины). Критерием включения пары в исследование было наличие у партнерши воспалительного процесса урогенитального тракта, обусловленного *C. trachomatis* и/или *M. hominis* и/или *M. genitalium* и/или *Ur. urealyticum* и/или *T. vaginalis*.

В качестве биологического материала для исследования использовались:

– у женщин: моча, соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала, уретры, заднего свода влагалища;

– у мужчин: моча, соскоб из эпителиальных клеток из уретры, сок предстательной железы.

Статистическую обработку данных проводили с использованием статистической программы SPSS версия 15.

**Результаты и их обсуждение.** У пациенток основной группы исследования (n=52) патология репродуктивной системы была представлена следующими нозологическими формами: уретрит — 51,92±5,73% (n=27), вагинит — 61,54±6,14% (n=32); эрозия шейки матки — 42,31±5,35% (n=22); цервицит — 26,92±4,64% (n=14), сальпингоофорит — 36,54±5,41% (n=19). У мужчин (n=52) были выявлены уретрит — 13,46±2,35% (n=7), простатит 7,69±2,11% (n=4).

В биологическом материале женщин основной группы исследования (n=52) ДНК *C. trachomatis* была выявлена в 19,23±3,42% (n=10) случаев в соскобах из уретры и цервикального

канала, в моче и соскобах из заднего свода влагалища ДНК возбудителя была выявлена в  $13,46 \pm 2,21\%$  ( $n=7$ ) и  $7,69 \pm 1,33\%$  ( $n=4$ ) случаев, соответственно. ДНК *M. hominis* была выявлена в  $3,85 \pm 1,12\%$  ( $n=2$ ) случаев в соскобах из уретры и цервикального канала, в  $1,92 \pm 0,25\%$  ( $n=1$ ) случаев в моче, а в соскобах из заднего свода влагалища ДНК возбудителя выявить не удалось. ДНК *M. genitalium* была выявлена в  $5,77 \pm 2,25\%$  ( $n=3$ ) случаев в соскобах из уретры и цервикального канала, в других видах биологического материала (моча, соскобы из заднего свода влагалища) обнаружить ДНК возбудителя не удалось. ДНК *Ur. urealyticum* была выявлена в  $71,15 \pm 9,72\%$  ( $n=37$ ) случаев в соскобах из уретры и цервикального канала, в  $61,54 \pm 7,45\%$  ( $n=32$ ) случаев в моче, и в  $34,62 \pm 5,22$  ( $n=18$ )% случаев в соскобах из заднего свода влагалища. ДНК *T. vaginalis* была выявлена в  $23,08 \pm 4,72\%$  ( $n=12$ ) случаев в соскобах из заднего свода влагалища, в  $13,46 \pm 2,21\%$  ( $n=7$ ) случаев в соскобах из уретры и цервикального канала, в  $5,77 \pm 1,19\%$  ( $n=3$ ) случаев в моче (табл. 1).

Таблица 1 — Частота выявления возбудителей урогенитальных инфекций из различных видов биологического материала у женщин

Возбудитель	Моча	Соскоб из уретры и цервикального канала	Соскоб из заднего свода влагалища
	% (n)	% (n)	% (n)
<i>C. trachomatis</i>	$13,46 \pm 2,21$ ( $n=7$ )	$19,23 \pm 3,42$ ( $n=10$ )	$7,69 \pm 1,33$ ( $n=4$ )
<i>M. hominis</i>	$1,92 \pm 0,25$ ( $n=1$ )	$3,85 \pm 1,12$ ( $n=2$ )	-
<i>M. genitalium</i>	-	$5,77 \pm 2,25$ ( $n=3$ )	-
<i>Ur. urealyticum</i>	$61,54 \pm 7,45$ ( $n=32$ )	$71,15 \pm 9,72$ ( $n=37$ )	$34,62 \pm 5,22$ ( $n=18$ )
<i>T. vaginalis</i>	$5,77 \pm 1,19$ ( $n=3$ )	$13,46 \pm 2,21$ ( $n=7$ )	$23,08 \pm 4,72$ ( $n=12$ )

Исходя из полученных в ходе проведения исследования данных, можно сделать вывод, что для выявления ДНК *C. trachomatis*, *M. hominis*, *Ur. urealyticum* и *M. genitalium*, наиболее подходящим видом биологического материала являются соскобы из цервикального канала и уретры, а для выявления ДНК *T. vaginalis* — соскобы из заднего свода влагалища. Для проведения ПЦР-исследований на широкий спектр инфекционных агентов необходимо осуществлять комплексное взятие биологического материала, т.е. брать соскобы эпителиальных клеток нужно как из цервикального канала и уретры, так и из заднего свода влагалища. Это позволит получить достоверный результат ПЦР-анализа.

При проведении анализа полученных результатов установлено, что моноинфекция была выявлена в  $46,15 \pm 6,24\%$  ( $n=24$ ) случаев, при этом *C. trachomatis* была выявлена в  $1,92 \pm 0,25\%$  случаев ( $n=1$ ), *Ur. urealyticum* —  $40,39 \pm 9,72\%$  случаев ( $n=21$ ), *T. vaginalis* — в  $3,85 \pm 1,25\%$  случаев ( $n=2$ ). Доля микст-инфекции составила  $53,85 \pm 7,05\%$  случаев ( $n=28$ ), сочетание *C. trachomatis* и *T. vaginalis* было выявлено в  $3,85 \pm 1,25\%$  случаев ( $n=2$ ), *C. trachomatis* и *Ur. urealyticum* — в  $11,54 \pm 2,25\%$  случаев ( $n=6$ ), *M. hominis* и *Ur. urealyticum* — в  $1,92 \pm 0,25\%$  случаев ( $n=1$ ), *M. genitalium* и *T. vaginalis* — в  $1,92 \pm 0,25\%$  случаев ( $n=1$ ), *Ur. urealyticum* и *T. vaginalis* — в  $13,46 \pm 4,45\%$  случаев ( $n=7$ ), *Ur. urealyticum* и *M. genitalium* — в  $3,85 \pm 1,25\%$  случаев ( $n=2$ ), *C. trachomatis* и *M. hominis* — в  $1,92 \pm 0,25\%$  случаев ( $n=1$ ).

В биологическом материале мужчин основной группы исследования ( $n=52$ ) ДНК *C. trachomatis* была выявлена в  $11,54 \pm 2,02\%$  ( $n=6$ ) случаев в соке предстательной железы, в моче и соскобах из уретры ДНК возбудителя была выявлена в  $7,69 \pm 1,33\%$  ( $n=4$ ) случаев. ДНК *M. hominis* была выявлена в  $1,92 \pm 0,25\%$  ( $n=1$ ) случаев в соке предстательной железы, в моче и соскобах из уретры ДНК возбудителя выявить не удалось. ДНК *M. genitalium* была выявлена в  $1,92 \pm 0,25\%$  ( $n=1$ ) случаев в соке предстательной железы и соскобах из уретры, в моче обнаружить ДНК возбудителя не удалось. ДНК *Ur. urealyticum* была выявлена

в  $21,15 \pm 5,25\%$  ( $n=11$ ) случаев в соке предстательной железы, в  $13,46 \pm 2,21\%$  ( $n=7$ ) случаев в соскобах из уретры, в  $11,54 \pm 2,02\%$  ( $n=6$ ) случаев в моче. ДНК *T. vaginalis* была выявлена в  $13,46 \pm 2,21\%$  ( $n=7$ ) случаев в соке предстательной железы, в  $7,69 \pm 1,33\%$  ( $n=4$ ) случаев в соскобах из уретры и в моче (табл. 2).

Таблица 2 — Частота выявления возбудителей урогенитальных инфекций из различных видов биологического материала у мужчин

Возбудитель	моча	Соскоб из уретры	Сок предстательной железы
	% (n)	% (n)	% (n)
<i>C. trachomatis</i>	$7,69 \pm 1,33$ ( $n=4$ )	$7,69 \pm 1,33$ ( $n=4$ )	$11,54 \pm 2,02$ ( $n=6$ )
<i>M. hominis</i>	-	-	$1,92 \pm 0,25$ ( $n=1$ )
<i>M. genitalium</i>	-	$1,92 \pm 0,25$ ( $n=1$ )	$1,92 \pm 0,25$ ( $n=1$ )
<i>Ur. urealyticum</i>	$11,54 \pm 2,02$ ( $n=6$ )	$13,46 \pm 2,21$ ( $n=7$ )	$21,15 \pm 5,25$ ( $n=11$ )
<i>T. vaginalis</i>	$7,69 \pm 1,33$ ( $n=4$ )	$7,69 \pm 1,33$ ( $n=4$ )	$13,46 \pm 2,21$ ( $n=7$ )

Полученные в ходе исследования результаты, позволяют сделать вывод, что у мужчин самым оптимальным видом биологического материала для выявления ДНК всех изученных инфекционных агентов является сок предстательной железы. Использование в качестве биологического материала мочи или соскоба эпителиальных клеток из уретры снижает вероятность обнаружения ДНК возбудителей в среднем в 1,5 раз.

В результате проведенных исследований ДНК возбудителей инфекций урогенитального тракта была обнаружена в биологическом материале 21 мужчины. При этом доля моноинфекций составила  $76,19 \pm 7,54\%$  ( $n=16$ ) случаев, а микст-инфекций —  $23,81 \pm 3,17\%$  ( $n=5$ ) случаев. *C. trachomatis* в форме моноинфекции была выявлена в  $14,29 \pm 3,28\%$  ( $n=3$ ) случаев, *Ur. urealyticum* —  $33,33 \pm 5,12\%$  ( $n=7$ ) случаев, *M. hominis* —  $4,76 \pm 1,02\%$  ( $n=1$ ) случаев, *M. genitalium* —  $4,76 \pm 1,02\%$  ( $n=1$ ) случаев, *T. vaginalis* — в  $19,05 \pm 4,25\%$  случаев ( $n=4$ ). При микст-инфицировании были выявлены следующие ассоциации возбудителей: *C. trachomatis* и *T. vaginalis* —  $4,76 \pm 1,02\%$  ( $n=1$ ) случаев, *C. trachomatis* и *Ur. urealyticum* — в  $9,52 \pm 2,14\%$  ( $n=2$ ) случаев, *Ur. urealyticum* и *T. vaginalis* — в  $9,52 \pm 2,14\%$  ( $n=2$ ) случаев.

Анализ частоты выявления ДНК возбудителей инфекций урогенитального тракта у половых партнеров позволил установить, что частота выявления ДНК всех возбудителей выше у женщин. Так *C. trachomatis* выявлялась у женщин в 1,7 раз чаще, чем у мужчин, *M. hominis* в 2 раза чаще, *M. genitalium* в 3 раза, *Ur. urealyticum* в 3,4 раза, *T. vaginalis* — в 1,7 раз (табл. 3).

Таблица 3 — Частота выявления возбудителей урогенитальных инфекций у половых партнеров

Возбудитель	Женщины (n=52)		Мужчины (n=52)	
	Абс. ед.	Отн. ед. (%)	Абс. ед.	Отн. ед. (%)
<i>C. trachomatis</i>	10	$19,23 \pm 3,42$	6	$11,54 \pm 2,02$
<i>M. hominis</i>	2	$3,85 \pm 1,12$	1	$1,92 \pm 0,25$
<i>M. genitalium</i>	3	$5,77 \pm 2,25$	1	$1,92 \pm 0,25$
<i>Ur. urealyticum</i>	37	$71,15 \pm 9,72$	11	$21,15 \pm 5,25$
<i>T. vaginalis</i>	12	$23,08 \pm 4,72$	7	$13,46 \pm 2,21$

## Выводы:

1. В ходе проведения исследования было установлено, что у женщин с воспалительными процессами урогенитального тракта наиболее часто выявляется ДНК *Ur. urealyticum* (71,15±9,72%), *C. trachomatis* (19,23±3,42%), *T. vaginalis* (23,08±4,72), при этом доля моноинфекций составляет 46,15±6,24% случаев, а доля микст-инфекций — 53,85±7,05% случаев. У мужчин также в качестве инфекционных агентов преобладают *Ur. urealyticum* (21,15±5,25%), *C. trachomatis* (11,54±2,02%), *T. vaginalis* (13,46±2,21). У мужчин было зафиксировано преобладание моноинфекций (76,19±7,54%).

2. При сравнительном анализе частоты выявления ДНК возбудителей урогенитальных инфекций у половых партнеров частота совпадений была установлена на уровне 40,38% положительных результатов, при этом у женщин выявляемость ДНК инфекционных агентов была выше в 1,7–3,4 раза, что связано с анатомическими и физиологическими особенностями урогенитального тракта женщин.

3. Исходя из анализа полученных данных, для получения достоверных результатов ПЦР-исследования необходимо правильно выбирать вид биологического материала: для женщин оптимальным является комплексное взятие биологического материала, включающее соскобы из уретры, цервикального канала и заднего свода влагалища, а для мужчин — сок предстательной железы.

4. С целью повышения эффективности молекулярно-генетической диагностики инфекций урогенитального тракта и назначения адекватных схем лечения необходимо обследовать обоих половых партнеров для выявления полного спектра инфекционных агентов.

## Литература

1. Серов, В.Н. Особенности инфекции–заболевания в акушерстве, гинекологии и перинатологии / В.Н. Серов // Рус. мед. журн. – 2006. – Т.14, № 1. – С. 2-5.
2. Костюк, С.А. Ассоциированные урогенитальные инфекции в акушерстве и гинекологии: современный взгляд на проблему / С.А. Костюк, О.К. Кулага. – Минск: Змицер Колас, 2008. – 544 с.
3. Кулага, О.К. Современные особенности патогенеза и клинического течения трихомонадной инфекции у женщин и детей / О.К. Кулага, С.И. Михалевич // Мед. новости. – 2007. – № 2. – С. 7-10.
4. Rapid qualitative urinary tract infection pathogen identification by SeptiFast real-time PCR / Lehmann L.E. [et al.] // PLoS One. [Electronic resource]. – 2011. – Vol. 6, № 2. – e17146. – doi: 10.1371/journal.pone.0017146. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3040229/>. – Date of access: 20.07.2012.
5. Выявление урогенитальных трихомонад и их морфологическая характеристика / Н.Н. Полещук [и др.] // Здоровье. – 2004. – № 10. – С. 55-58.

Поступила 23.07.2012

## DIAGNOSTICS PROBLEMS OF UROGENITAL TRACT INFECTIONS IN SEXUAL PARTNERS

**Kostiuk S.A., Badygina N.A., Gavrusev A.A., Kulaga O.K., Poluyan O.S., Rudenkova T.V.**

*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus*

The differences in the anatomy and physiology of the reproductive systems between men and women cause distinctions in the frequency of DNA detection of the urogenital tract pathogens. To obtain reliable PCR results it is necessary to choose correctly type of the biological material for analyses. For women, it is optimal to capture complex of biologic materials, including swabs from urethra, cervix and vagina posterior fornix, and for men, it is better to use prostate fluid as the biological material. When counseling sexual partners need to consider not only the spectrum of pathogens detected in the patient, but also the results obtained in its partner, to choice appropriate treatment strategy.

**Keywords:** sexual partners, urogenital tract infections, biological material.

## ЧАСТОТА ЭКСПРЕССИИ ВИРУСНЫХ АНТИГЕНОВ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОДВЗДОШНОЙ КИШКИ (НА МАТЕРИАЛЕ БИОПСИЙ)

Зубрицкий М.Г.<sup>1</sup>, Недзьведь М.К.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Гродненское областное патологоанатомическое бюро, Гродно;

<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

**Резюме.** Частота заболеваний, вызванных герпетической и папилломавирусной инфекцией, обуславливает необходимость совершенствования их диагностики. Иммуногистохимическим методом выявлены антигены вирусов простого герпеса 1 и 2 типа, цитомегаловируса, вируса Эпштейн–Барр и папилломавируса в биопсиях из подвздошной кишки 50 пациентов, изучены морфологические проявления этих инфекций. Вирусные антигены в слизистой оболочке подвздошной кишки были обнаружены у 18 обследованных пациентов (36%). Наиболее часто выявлялся вирус простого герпеса 1 типа (30% пациентов). Высока частота сочетанной вирусной инфекции ( $p > 0,05$ ). Для поражения клеток папилломавирусом и вирусом простого герпеса 1 типа характерно появление внутриядерных включений.

**Ключевые слова:** герпес-вирусы, папилломавирус, морфология, иммуногистохимия.

**Введение.** Врачи самых различных специальностей встречаются в своей работе с проявлениями герпетической и папилломавирусной инфекции. Герпес-вирусы и папилломавирус обладают тропизмом к эпителиальным клеткам желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Описаны поражения различных отделов ЖКТ при инфицировании вирусами простого герпеса (ВПГ) 1-го и 2-го типов, вирусом Эпштейн–Барра (ВЭБ) и цитомегаловирусом (ЦМВ) [1–4]. Проведенные в последние годы исследования показали, что одним из основных этиологических факторов гастрита и дуоденита является хроническая активная ВЭБ-инфекция [5]. Вирусное поражение слизистой оболочки развивается на фоне иммунодефицита, поддерживает хроническое воспаление. Эрозивно-язвенное поражение ЖКТ сопровождается высокой контаминацией слизистой оболочки желудка и тонкого кишечника вирусами герпеса человека (ГВЧ), которая при деструктивном воспалении слизистой достигает до 60% [6], в том числе ГВЧ-4 (вирус Эпштейн–Барр относится к лимфопротрофиеративным, вызывает инфекционный мононуклеоз, лимфому Беркита, назофарингеальную карциному), ГВЧ-5 (цитомегаловирус относится к лимфопротрофиеративным, вызывает цитомегалию, рак предстательной железы). При этом, чем более выражена деструкция, тем более высока частота обнаружения вирусов в биопсиях [5, 7, 8]. Важное влияние на развитие воспалительного процесса при папилломавирусном поражении оказывает герпетическая инфекция [9, 10]. Тяжесть симптоматики в острой фазе болезни, частота и длительность рецидивирования при хронических формах вышеперечисленных вирусных инфекций, а также высокий процент бессимптомного вирусоносительства обуславливают настоятельную необходимость разработки новых методов диагностики, лечения и профилактики герпетической и папилломавирусной инфекции.

**Цель исследования:** изучить частоту поражения слизистой оболочки подвздошной кишки ВПГ1, ВПГ2, ВЭБ, ЦМВ, вирус папилломы человека (ВПЧ), а также морфологические проявления этих инфекций при биопсийном исследовании.

**Материалы и методы.** Изучен материал, полученный после взятия биопсий из подвздошной кишки от 50 пациентов (27 мужчин и 23 женщины, в возрасте 25–68 лет). С помощью стрептавидин-биотинового метода («Dako», Дания) в парафиновых срезах биоптатов выявлялись антигены вирусов ВПГ1, ВПГ2, ВЭБ, и ВПЧ. Продукты иммуногистохимической реакции выявляли по наличию светло- и темно-коричневых гранул в ядрах и цитоплазме клеток. Основные морфологические изменения оценивались

полуколичественно, как слабые, умеренные и выраженные. Для анализа результатов был использован стандартный пакет прикладных статистических программ Statistica 6.0. Для оценки связи между переменными применяли непараметрический корреляционный анализ Спирмана (R).

**Результаты и их обсуждение.** Тонкая кишка принимает участие во всех этапах пищеварения, включая всасывание и перемещение пищи. Здесь же происходит и всасывание продуктов переваривания в кровеносные и лимфатические капилляры. В подвздошной кишке много микроворсинок, секреторных гранул, лизосом, пиноцитозных пузырьков, происходит транспорт иммуноглобулинов, секреция ферментов и лизоцима. Высокая митотическая активность эпителия подвздошной кишки, а также то, что она обильнее, чем тощая кишка снабжена сосудами, являются факторами, способствующими поражению слизистой оболочки вирусами.

Вирусные антигены в слизистой оболочке подвздошной кишки были обнаружены у 18 больных (36%), из них ВЭБ — у 14 человек (28%), вирус простого герпеса 1 типа — у 15 больных (30%), вирус простого герпеса 2 типа — у 10 больных (20%), цитомегаловирус — у 2 пациентов (4%), ВПЧ у 11 человек (22%); сочетание двух вирусных инфекций у 4 человек (8%), трех вирусных инфекций у 9 обследованных (18%), четырех инфекций — у 2 пациентов (4%) и пяти инфекций у 1 человека (2%). Наиболее часто в слизистой оболочке желудка определялся ВПГ1. Обращает на себя внимание высокая частота сочетанной вирусной инфекции ( $p>0,05$ ). Степень экспрессии вирусных антигенов в изучаемых группах пациентов с разными моноинфекциями представлена в таблице 1.

Таблица — Степень экспрессии вирусных антигенов у пациентов с разными моноинфекциями, n=50

Степень экспрессии антигенов		ВПГ1, n=15, 30%	ВПГ2, n=10, 20%	ЦМВ, n=2, 4%	ВЭБ, n=14, 28%	ВПЧ, n=11, 22%	Вирусы не выявлены, n=32
Слабая	n	2	3	1	5	3	-
	%	13,3	30	50	35,7	27,2	-
Умеренная	n	4	2	1	4	4	-
	%	26,6	20	50	28,6	36,4	-
Выраженная	n	9	5	0	5	4	-
	%	59,1	50	0	35,7	36,4	-

Антигены вируса Эпштейн–Барр локализовались диффузно, особенно в местах развития полной кишечной метаплазии. Антигены вируса простого герпеса 1 типа распределялись практически всегда диффузно в ядрах и цитоплазме эпителиоцитов слизистой оболочки желудка. Антигены вируса простого герпеса 2 типа локализовались также диффузно, преимущественно в цитоплазме, с интенсивным ядерным окрашиванием в отдельных эпителиоцитах. Антигены цитомегаловируса и папилломавируса выявлялись преимущественно в клетках желез слизистой оболочки.

Наиболее часто (у 18% обследованных) ВПГ1 сочетался с ВПЧ ( $R=0,57$ ;  $p=0,006$ ), ВЭБ (у 24%,  $R=0,44$ ;  $p=0,03$ ) и ВПГ2 (у 18%,  $R=0,35$ ;  $p=0,04$ ). ВПГ2 с одинаково высокой вероятностью встречался в ассоциации с ВПЧ и ВЭБ (в обоих случаях у 12%,  $R=0,47$ ;  $p=0,008$ ). Выявляемость ВЭБ достоверно коррелировала с частотой встречаемости ВПЧ ( $R=0,47$ ;  $p=0,004$ ). Связь между ЦМВ и ВЭБ была на уровне тенденции к достоверности ( $R=0,27$ ;  $p=0,07$ ).

Инфицированность ВПГ1 не зависит от возраста, но достоверно связана длительностью основного заболевания ( $R=0,70$ ;  $p=0,03$ ). У ВПГ1 положительных пациентов длительность заболевания составляла 7 (5–8) лет, при негативном результате обследования на этот вирус — 3 (2–5) года ( $p=0,03$ ). Стаж заболевания у ВПЧ позитивных (ВПЧ+) пациентов был 7 (5–8) лет, у ВПЧ негативных (ВПЧ-) — 4 (2–5) года ( $p=0,005$ ), у носителей ВПГ2 — 6 (5–9) лет, у ВПГ2- пациентов — 4 (2–7) года ( $p=0,004$ ).

Половая принадлежность пациентов не оказывает достоверного влияния на частоту встречаемости изученных инфекционных агентов в слизистой желудка.

Общие для всех вышеперечисленных вирусов изменения в подвздошной кишке проявляются в виде хронического энтерита, а при длительном течении с формированием острых эрозий, а впоследствии язв, сначала острых, а затем хронических. Хронический энтерит — воспалительное заболевание тонкой кишки, сопровождающееся нарушениями в той или иной мере ее функций, чаще развивается как постинфекционный процесс, т.е., как правило, возбудителя острой инфекции уже нет. В механизме развития хронического энтерита главную роль играют три фактора: проникновение инфекционных агентов в тонкую кишку, где их нет у здоровых людей, нарушения защитной системы и выработки кишечных ферментов. Язва тонкой кишки простая (неспецифическая, идиопатическая, пептическая, трофическая, круглая и т.д.) — заболевание, характеризующееся появлением одного или множественных изъязвлений преимущественно в подвздошной кишке. Предрасполагающими факторами являются местные сосудистые нарушения, повышенная триптическая активность сока поджелудочной железы. Морфологическая картина определяется неспецифическим воспалением, возникающим в подслизистой основе и распространяющимся в дальнейшем на слизистую оболочку и всю стенку кишки. Воспалительный процесс носит сегментарный характер — пораженные сегменты чередуются с непораженными. К местным осложнениям относятся массивные кишечные кровотечения, перфорация стенки кишки, кишечная непроходимость, стенозирование кишки.

В настоящее время известно, что частое рецидивирование и более злокачественный характер течения герпетических и папилломавирусных поражений отмечается у лиц с иммуносупрессией различной степени выраженности. При инфицировании организма вирусом простого герпеса защитную роль играют специфические гуморальные и клеточные факторы иммунитета, связанные с участием антител, макрофагов, лимфоцитов и лейкоцитов, интерферона. Внутриклеточное расположение вируса простого герпеса защищает его от антител. В этом случае подавление репродукции вируса осуществляют клеточные элементы (Т-лимфоциты, макрофаги, полиморфно-ядерные лейкоциты).

При морфологическом исследовании во всех наблюдениях ВПГ1 отмечались внутриядерные герпетические включения I и II типа, феномен «тутовой ягоды», пустые ядра. Ядра при этом увеличены в размерах, деформируются, хроматин полностью исчезает, и ядра энтероцитов и эндотелиоцитов принимают гомогенный базофильный вид со сморщенной ядерной мембраной. Все изменения в клетках кишечника, включая внутриядерные включения, сочетаются с расстройством микроциркуляции. В сосудах микроциркуляторного русла отмечаются пролиферация эндотелия, иногда с полной закупоркой просвета, стаз, сладж и образование гиалиновых тромбов, мелкоочаговые периваскулярные кровоизлияния. Подобные изменения встречаются при поражении слизистой оболочки ВПГ2. Патологоанатомические изменения характеризуются отеком с очагами колликвационного некроза клеток с перифокальной сосудистой и пролиферативной реакцией. Иногда в сосудах выявляется продуктивное воспаление в сосудистых стенках или тромбоз микроциркуляторного русла. Наиболее тяжелые изменения наблюдаются в тонкой кишке при язвообразовании и заключаются в характерном метаморфозе, прежде всего энтероцитов с гиперхроматозом их ядер и последующим рексисом. В собственной пластинке слизистой оболочки наблюдается лимфо-гистио-плазмоцитарная инфильтрация.

При ВЭБ-инфекции слизистой оболочки кишки можно видеть микроизъязвления, а также внутриклеточные включения или скопление лимфоцитов вокруг кровеносных сосудов, обычно обнаруживают абсцессы в криптах, гранулемы и гигантские клетки, обычно связанные с инфильтрацией плазматическими или другими одноядерными клетками.

Инфицированные ЦМВ клетки в организме человека характеризуются увеличенными размерами и внутриядерными включениями в виде «глаза совы».

Когда речь идет о морфологических признаках папилломавирусной инфекции, то доминирующими являются изменения в строении ядер, в первую очередь, их полиморфизм, гиперхроматоз, а также увеличение количества ядер в клетке. Отмечается также увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения, а также различное количество цитоплазмы в расположенных рядом клетках. Повреждения в клеточных структурах могут проявляться в различной степени — от единичных изменений, до резко выраженного ядерного и клеточного полиморфизма, отмечаемого при высоких степенях дисплазии.

Следующим показателем морфологических изменений, происходящих при ВПЧ-поражении, является нарушение архитектоники эпителия. По мере роста степени диспластических изменений происходит стирание границ слоев эпителия. Это является результатом нарушенного созревания эпителиальных клеток. При выраженной дисплазии, также как и при раке на месте, все слои эпителия представляют собой мономорфную картинку. При морфологической оценке следует обращать пристальное внимание на фигуры митоза в клетках, которые при этом процессе обнаруживаются по всей толще эпителия.

Большое значение для диагностики имеет эндоскопическое исследование желудочно-кишечного тракта с последующим гистологическим исследованием полученного при биопсии материала.

В последнее десятилетие наметился определенный прогресс в изучении патогенеза, этиологической диагностики и лечении ряда клинических форм герпеса, который связан с иммунологическим подходом к проблеме и развитием исследований по молекулярной биологии вирусов, позволившими уточнить механизмы рецидивирующей герпетической и папилломавирусной инфекции. Дальнейшее изучение иммунитета при персистирующем герпесе, разработка новых методов получения и схем применения противовирусных химиопрепаратов, избирательно подавляющих репродукцию герпес-вирусов, папилломавируса и исключающих формирование резистентных вирусных форм, разработка и скрупулезное осуществление профилактических программ, позволит овладеть методами контролируемого этой инфекции и, возможно, перевести ее в раздел управляемых.

**Заключение.** При гистологическом исследовании биоптатов, взятых из подвздошной кишки у взрослых, в слизистой оболочке часто выявляются антигены герпетических вирусных инфекций — вирусов Эпштейн–Барра, простого герпеса 1 и 2 типов и папилломавируса. Эти изменения указывают как на снижение иммунорегуляторных процессов, в частности противоопухолевого иммунитета, так и общей резистентности организма. Перечисленные факторы снижения иммунитета можно рассматривать как основу для возможной контаминации слизистой желудка различными оппортунистическими инфекциями и вирусами, в том числе папилломавирусом и вирусами герпеса. Морфологическим маркером (качественным и часто — количественным) поражения кишечника вирусом простого герпеса является появление внутриядерных герпетических включений в энтероцитах, эндотелиоцитах сосудов, что обуславливает полиморфизм ядер пораженных клеток.

В настоящее время идут активные поиски способов прогноза развития вирусного поражения. Несомненный интерес представляет применение моноклональных антител, направленное на обнаружение маркерных белков на ранних этапах канцерогенеза.

Определение иммуногистохимического индекса таких белков позволило бы достаточно корректно оценивать проявления вирусной прогрессии на этапе молекулярных изменений.

#### Литература

1. Абросимова, Г.М. Диагностические аспекты гастроуденальной патологии у детей / Г.М. Абросимова, А.С. Эйберман, В.Д. Грифонов // Рус. мед. журн. – 2003. – № 3. – С. 116-117.
2. Волюнец, Г.В. Заболевания верхних отделов органов пищеварения у детей с хронической Эпштейна-Барр вирусной инфекцией / Г.В. Волюнец, А.И. Хавкин, Ф.П. Филатов // Рос. педиатр. журн. – 2004. – № 6. – С. 51-53.
3. Vilaichone, R.K. Necrotising ileitis caused by cytomegalovirus in patient with systemic lupus erythematosus: case report / R.K. Vilaichone, V. Mahachai, S. Eim-ong // J. MedAssoc. Thai. – 2001. – Vol. 84. – P. 469-73.
4. Fujiki, N. Herpes viruses – herpes simplex virus, varicella-zoster virus, EB virus, cytomegalovirus / N. Fujiki, K. Tashiro // Nippon-Rinsho. – 1997. – № 4. – P. 855-858.
5. Малашенкова, И.К. Клинические формы хронической Эпштейн Барр вирусной инфекции: вопросы диагностики и лечения / И.К. Малашенкова, Н.А. Дидковский, Ж.Ш. Сарсания // Леч. врач. — 2003. – № 9. – С. 32-38.
6. Нелюбин, В.Н. Бактериально-вирусное коинфицирование слизистой оболочки при гастроуденальной патологии / В.Н. Нелюбин, В.П. Мудров // Иммунопатол., аллергол., инфектол. – 2004. – № 2. – С. 111-115.
7. Kazmirchuk, V.E. Treatment of complicated Epstein-Barr viral infections / V.E. Kazmirchuk, M.I. Miroshnikova // Mod. Infect. – 2002. – Vol. 4. – P. 12-19.
8. Markov, L.S. Combined therapy of chronic recurrent herpetic (HSV) infection / L.S. Markov // Woman's Health. – 2001. – Vol. 3, N 7. – P. 57-66.
9. Baseman, J.G. The epidemiology of human papillomavirus infections / J.G. Baseman, L.A. Koutsky // J. Clin. Virol. – 2005. – Vol. 32. – P. 16-24.
10. Classification of papillomaviruses / E.M. de Villiers [et al.] // Virology. – 2004. – Vol. 324. – P. 17-27.

Поступила 20.07.2012

## FREQUENCY OF THE VIRUS ANTIGENES EXPRESSION AND THE ILEUM MORPHOLOGICAL CHANGES (BIOPSY MATERIAL)

Zubritsky M.G.<sup>1</sup>, Nedzved M.K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Grodno Regional Pathologoanatomical Bureau, Grodno;

<sup>2</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The frequency of the observed *herpes-viruses* and *human papillomavirus* diseases causes the need to improve their diagnosis. Immunohistochemistry revealed antigens of herpes simplex virus types 1 and 2, cytomegalovirus, *Epstein-Barr* virus and human papillomavirus in biopsies from the ileum of 50 patients, the morphological manifestations of these infections were studied. Virus antigens in the mucosa of the ileum were found in 18 patients surveyed (36%). The herpes simplex virus type 1 (30% of patients) was the most frequently detected. High frequency of concomitant viral infection ( $p > 0.05$ ) was observed. The occurrence of intranuclear inclusions was characterized for cells infected by papillomavirus and herpes simplex virus type 1.

**Keywords:** herpes-viruses, human papillomavirus, morphology, immunohistochemistry.

## «ГОРЯЧИЕ ТОЧКИ» АГРЕГАЦИИ В АМИЛОИДНЫХ БЕЛКАХ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ БОЛЕЗНЯХ

Капитулец С.П., Ничипорук О.И., Капитулец Н.Н., Кравченко Л.М.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

**Резюме.** В работе рассчитаны агрегационные профили физиологически неструктурированного (A $\beta$ -пептид) и нативно глобулярного (прион-протеин PrP<sup>C</sup>) амилоидных белков, ассоциированных с патогенезом болезни Альцгеймера и прионных болезней, соответственно. В аминокислотной последовательности белков идентифицированы «горячие точки» агрегации, определяющие в развернутом состоянии

способность полипептидов к образованию амилоида. Полученные результаты обсуждены с экспериментальными данными доступными в литературе.

**Ключевые слова:** нейродегенеративные болезни,  $\beta$ -амилоидный пептид, прион-протеин, «горячие точки» агрегации.

**Введение.** В последнее десятилетие интерес к феномену агрегации белковых молекул в амилоидные структуры при патологических состояниях переместился с позиций в целом игнорируемой проблемы в статус приоритетной как для биологической, так и медицинской науки и практики [1]. Связано это, в первую очередь, с установлением выраженной корреляции между накоплением амилоидных белков в человеческих тканях в виде нерастворимых внутри- и внеклеточных агрегатов (бляшек) и развитием многочисленных тяжелых и до настоящего времени неизлечимых расстройств и синдромов, включая системные амилоидозы и нейродегенеративные болезни [2]. Белки, вовлеченные в эти процессы, характеризуются отсутствием идентичных аминокислотных последовательностей и структуры. Среди них выделяют два основных класса: собственно неструктурированные, развернутые в нативном состоянии белки и глобулярные белки со стабильной уникальной трехмерной структурой [3]. Для белков первого класса ( $\beta$ -амилоидный пептид, амилин,  $\alpha$ -синуклеин и др.) не требуется развертывания третичной структуры полипептидной цепи и агрегация может происходить прямой самосборкой функционально развернутых полипептидов [3]. Глобулярные в нативном состоянии белки ( $\beta$ 2-микроглобулин, лизозим, транстиретин, прион-протеины и др.) агрегируют редко, что, по-видимому, определяется блокированием химически активных боковых радикалов аминокислотной последовательности за счет включения во внутренний гидрофобный кор белка, либо вовлечением в сеть контактов, стабилизирующих сам белок [4]. Соответственно, можно полагать, что присутствие в составе глобулярных белков специфических областей склонных к формированию агрегатов является намного более частым событием, чем у кодируемых функционально развернутых белков [5]. Дестабилизация глобулы, приводящая к увеличению количества развернутых участков полипептидной цепи, как установлено, является пусковым механизмом для развития патологий, ассоциированных с отложением в ткани агрегатов белков, которые в функциональном состоянии не агрегировали [3, 6].

Одним из основных вопросов в проблеме агрегации белков, не решенным до настоящего времени, является специфичность, с которой первичная последовательность аминокислот в полипептидной цепи определяет склонность его к агрегации в полностью или частично развернутом состоянии. Очевидно, что расшифровка этого механизма даст возможность управлять или, по крайней мере, минимизировать процессы нежелательной агрегации белков через проведение специфической терапии, направленной на блокирование патологических областей полипептида.

Первым успехом в этом направлении можно считать установление факта, что не все области белка одинаково важны для проявления агрегационной активности. Недавними исследованиями доказано, что очень короткие специфические аминокислотные участки могут действовать как «помощники» формирования амилоидных фибрилл [7]. Эти релевантные (значимые) области обычно называют «горячими точками» агрегации. Очевидно, что реактивность «горячих точек» особенно выражена у нативно развернутых белков и развернутых состояний глобулярных белков, поскольку у них отсутствует вторичная и третичная структуры и определенные внутрицепочечные взаимодействия, которые маскируют склонные к агрегации области.

В настоящее время установлено: (1) в основе процесса белковой агрегации лежат общие и простые принципы, по крайней мере, это справедливо для белков с полностью или частично развернутой полипептидной цепью, и (2) склонность белка к агрегации четко определяется составляющей его аминокислотной последовательностью [8]. Основываясь на этих фактах,

целью работы было идентифицировать наличие «горячих точек» агрегации у некоторых амилоидогенных белков, относящихся к физиологически развернутым ( $\beta$ -амилоидный пептид – A $\beta$ ) и нативно глобулярным белкам (прион-протеин – PrP) и сравнить полученные результаты с экспериментальными данными, имеющимися в литературе.

**Материалы и методы.** В работе использованы экспериментальные данные по агрегационной способности каждой из 20 нативных аминокислот (таблица 1), локализованных в центральном положении специфической области так называемого центрального гидрофобного кластера A $\beta$ -белка, находящегося в развернутой конформации, рассчитанные репортерным методом *in vivo* [9]. Постулируется, что индивидуальные внутренние агрегационные свойства, полученные анализом этой специфической области белка, применимы к развернутой аминокислотной последовательности любого полипептида.

Исследовали аминокислотные последовательности  $\beta$ -амилоидного пептида (A $\beta$ 40 и A $\beta$ 42) и прион-протеина (PrP<sup>C</sup>), вызывающих у человека болезнь Альцгеймера и трансмиссивные губкообразные энцефалопатии человека и животных (хомяка, овцы, быка) соответственно, полученные из электронной базы SwissProt database.

Агрегационные профили исследуемых белков были рассчитаны после присваивания соответствующих значений, представленных в таблице 1, каждому индивидуальному аминокислотному остатку (а.о.) в аминокислотных последовательностях. Поскольку «горячие точки» являются кластерами рядом расположенных аминокислотных остатков, последовательность полипептидов была сканирована при использовании скользящей рамки из 5, 7, 9 и 11 аминокислот с шагом через 1 аминокислоту. Суммы значений агрегационной активности аминокислот в скользящей рамке приписывались аминокислотам, расположенным в центре рамки. Крайним N-и C-терминальным аминокислотам определяли значения, рассчитанные для центральных аминокислот, при использовании соответствующих скользящих рамок. «Горячие точки» агрегации в последовательности белка были идентифицированы как области, содержащие, по крайней мере, не менее пяти аминокислотных остатков в длину (минимальный размер, установленный до настоящего времени, который необходим для пептида, чтобы сформировать амилоидную фибриллу аналогичную таковой образованной полным полипептидом [10]), у которых агрегационные свойства являются выше средней агрегационной способности всей аминокислотной последовательности. Среднюю способность белка к агрегации или пороговое значение «горячей точки» агрегации вычисляли как сумму агрегационных свойств индивидуальных аминокислот, деленную на общее количество аминокислотных остатков в цепи.

Таблица 1 — Агрегационные свойства аминокислот [9]

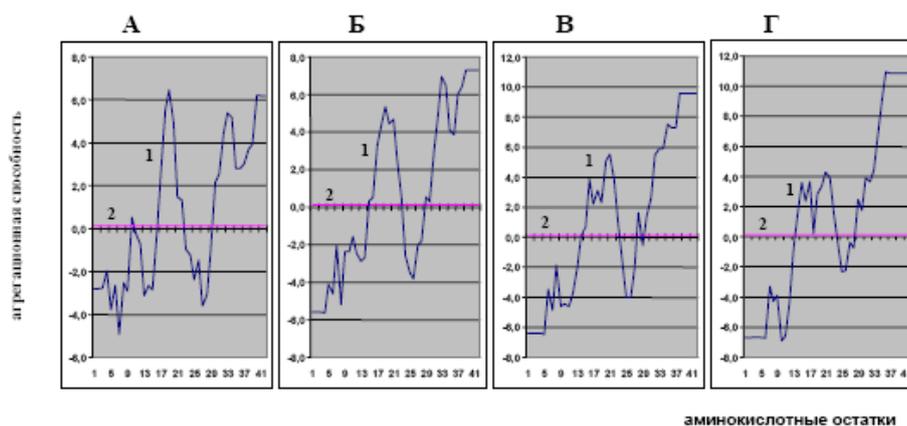
Аминокислоты				Показатель агрегационной активности
Русское название	Английское название	Аббревиатура	Свойства	
Изолейцин	Isoleucine	I	нейтральная, неполярная	1.822
Фенилаланин	Phenylalanine	F	нейтральная, неполярная	1.754
Валин	Valine	V	нейтральная, неполярная	1.594
Лейцин	Leucine	L	нейтральная, неполярная	1.380
Тирозин	tYrosine	Y	нейтральная, полярная	1.159
Триптофан	tWo rings	W	нейтральная, неполярная	1.037

Метионин	Methionine	M	нейтральная, неполярная	0.910
Цистеин	Cysteine	C	нейтральная, полярная	0.604
Аланин	Alanine	A	нейтральная, неполярная	-0.036
Треонин 5	Threonine	T	нейтральная, полярная	-0.159
Серин	Serine	S	нейтральная, поляр- ная	-0.294
Пролин	Proline	P	нейтральная, неполярная	-0.334
Глицин	Glycin	G	нейтральная, неполярная	-0.535
Лизин	before L	K	основная	-0.931
Гистидин	Histidin	H	основная	-1.033
Глутамин	Q-tamine	Q	нейтральная, полярная	-1.231
Аргинин	aRginin	R	основная	-1.240
Аспарагин	asparagiNe	N	нейтральная, полярная	-1.302
Глутаминовая кис- лота	gluEtamic acid	E	кислая	-1.412
Аспарагиновая кис- лота	asparDic acid	D	кислая	-1.836

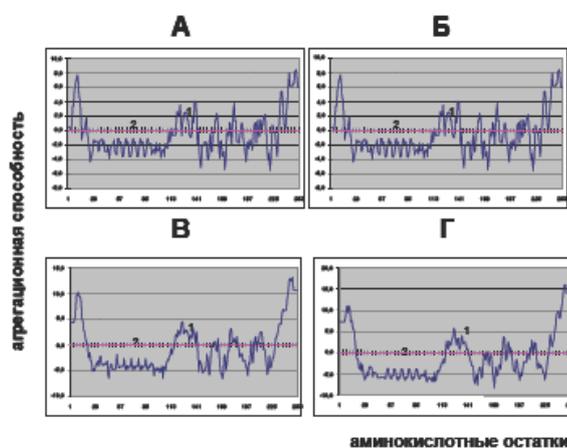
Дополнительно локализацию «горячих точек» агрегации в аминокислотных последовательностях исследуемых белков, проводили с помощью web-программы AGGRESCAN [11], как описано [12].

**Результаты и их обсуждение.** Анализ экспериментальных данных агрегационной активности нативных аминокислот показал, что наивысшей способностью к агрегации обладают изолейцин, фенилаланин, валин и лейцин, тогда как аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аспарагин, и аргинин проявляют самую низкую активность (таблица 1). Пролин лимитирует активность «горячей точки». В целом, именно гидрофобные аминокислоты имеют тенденцию вызывать агрегацию, тогда как полярные — промотируют их растворимость, что в целом согласуется с общими представлениями, что гидрофобные взаимодействия играют важную определяющую роль в белковой агрегации [13].

Вышеописанный подход был применен для анализа 6 различных аминокислотных последовательностей 2 белков:  $\beta$ -амилоидного пептида (A $\beta$  40 и A $\beta$  42) и прион-протеина (PrP<sup>C</sup>) человека, сирийского хомяка, овцы и быка, ассоциированных с отложением амилоида в центральной нервной системе. Для выявления «горячих точек» агрегации были апробированы 4 скользящие рамки, содержащие 5, 7, 9 и 11 а.о. Агрегационные профили двух белков (A $\beta$  42 и PrP<sup>C</sup> человека) на рисунках 1 и 2.



2 — пороговое значение «горячей точки» агрегации  
 А, Б, В, Г — скользящая рамка, содержащая 5, 7, 9 и 11 аминокислот соответственно  
 Рисунок 1 — Агрегационный профиль  $\beta$ -амилоидного белка ( $A\beta$  42)



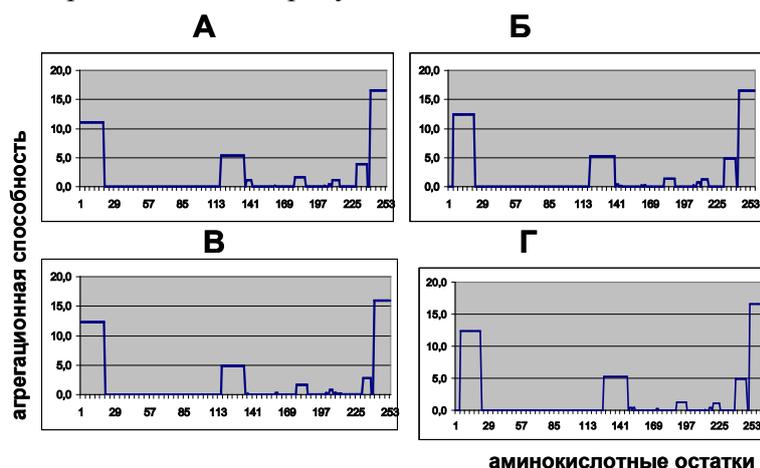
1 — агрегационная активность центральных аминокислот в скользящей рамке  
 2 — пороговое значение «горячей точки» агрегации  
 А, Б, В, Г — скользящая рамка, содержащая 5, 7, 9 и 11 аминокислот соответственно  
 Рисунок 2. Агрегационный профиль прион-протеина человека (PrPSc)

Видно, что обнаружение склонных к агрегации областей у амилоидных белков в целом не зависит от длины используемой скользящей рамки. Однако, отмечены, два существенных ограничения: (1) использование длинных рамок к относительно коротким последовательностям приводит к чрезмерному сглаживанию агрегационного профиля, при этом на графике различные «горячие точки» группируются вместе и тем самым маскируются, т.е. не могут быть разграничены при анализе; (2) применение коротких рамок к очень длинным последовательностям вызывает появление множества коротких графически малозначимых «горячих точек», характеризующихся низкими показателями агрегационной активности.

Следовательно, при выявлении «горячих точек» агрегации следует проводить оценку длины применяемой скользящей рамки относительно размера последовательности анализируемого белка. Это согласуется с тем, что для более длинных последовательностей белка необходимы более крупные «горячие точки», чтобы обеспечить их агрегационный потенциал, в то время как небольшие «горячие точки» являются достаточными для агрегации коротких пептидов. На основании полученных результатов и данных литературы установлено, что для последовательностей полипептидов, содержащих до 75 аминокислот, наилучшие результаты сканирования достигаются при использовании скользящей рамки длиной 5 а.о., для белков длиной  $\leq 175$  аминокислот — 7 а.о., для белков  $\leq 300$  аминокислот — 9 а.о. и для больших белков, содержащих  $>300$  аминокислот — 11 а.о. соответственно.

Концепция «горячей точки» агрегации допускает, что вклад индивидуального аминокислотного остатка в последовательности белка на общую агрегацию белка, так или иначе модулируется его непосредственным окружением. Согласно этому, влияние аминокислот на агрегацию белка не может быть должным образом вычислено простым сложением индивидуальных агрегационных активностей аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Чтобы обеспечить более достоверное описание влияния аминокислот на общую агрегационную способность, были рассчитаны индивидуальные профили агрегации для данных белков и идентифицированы различия между областями выше соответствующих профилей средней агрегационной способности полипептидов. Области «горячих точек» в каждом профиле были нормализованы числом остатков в рассматриваемых белках с использованием web-программы AGGRESCAN [12].

Результаты сканирования аминокислотной последовательности прион-протеина 4 видов млекопитающих представлены на рисунке 3.



А — человек; Б — овца; В — сирийский хомяк; Г — бык  
Рисунок 3 — «Горячие точки» агрегации прион-протеина (PrPC)

Полученные результаты были оценены в сравнении с доступными для анализа экспериментальными данными относительно (1) областей, известных как промотирующие агрегацию и фибриллизацию, (2) фрагментов, агрегирующих *in vivo* (чаще после протеолиза) и (3) синтетических коротких (усеченных) пептидов, для которых показана агрегация *in vitro*.

Внеклеточный гидрофобный  $\beta$ -амилоидный пептид ( $A\beta$ ) накапливается в мозге как продукт расщепления предшественника амилоидного белка (APP), и является критическим в этиологии болезни Альцгеймера — нейродегенеративного заболевания, характеризующегося потерей памяти и ухудшением когнитивных (познавательных) способностей [14]. Белки, составляющие амилоидные бляшки, в основном, представлены пептидами из 40 ( $A\beta$  40) и 42 аминокислотных остатков ( $A\beta$  42). Несмотря на то, что продукция  $A\beta$  42 в мозге ниже, он является более амилоидогенным, чем  $A\beta$  40. Две основных области с высокой агрегационной активностью можно выделить в агрегационном профиле у этого полипептида (рисунок 1). Причем, вторая область является, по-видимому, результатом вклада двух участков последовательности, включающих аминокислотные остатки 30–36 и 38–42 соответственно. Выявленные нами области, склонные к агрегации, превосходно согласуются с экспериментальными данными литературы (табл. 2).

Таблица 2 — «Горячие точки» агрегации в  $\beta$ -амилоидном пептиде (A $\beta$ 42) и сравнение с доступными для анализа экспериментальными данными

Идентифицированная «горячая точка»	Экспериментальные доказательства:	
	участие в процессе агрегации белка	наличие в структуре амилоидных фибрилл
16–21 а.о.	+	+
30–36 а.о.	+	+
38–42 а.о.	+	+

Так остатки 16–21 перекрываются с последовательностью центрального гидрофобного кластера A $\beta$ -пептида, включающего остатки 17–21, именно той специфической области, которая, как установлено, играет ключевую роль в A $\beta$ -агрегации и амилоидогенезе пептидов A $\beta$ 40 и A $\beta$ 42 при болезни Альцгеймера [15]. Кроме того имеются данные, что 16–21 а.о. локализованы в коре A $\beta$ -фибрил [16]. Аналогично, короткий фрагмент из 7 а.о., включающий остатки аминокислот в позициях 16–22, способен формировать соответствующие амилоидные фибриллы [17].

В отношении области 30–42 а.о., показано, что данный участок пептида, включающий оба отрезка и 30–36 а.о. и 38–42 а.о., также вовлечен в A $\beta$ -агрегацию. Методом пролин-сканирующего мутагенеза обнаружено, что область 31–36 а.о. чувствительна к inserции пролина и, вероятно, включена в  $\beta$ -листок A $\beta$ -фибриллы [15]. Вклад C-терминальной области 38–42 а.о. в A $\beta$ -амилоидогенез становится ясным из того обстоятельства, что, хотя A $\beta$  40 продуцируется в большем количестве *in vivo*, но превалирование в бляшках полноразмерного A $\beta$  42 намного выше [14]. Эксперименты с усеченными синтетическими A $\beta$  пептидами *in vitro* подтвердили, что A $\beta$  39 и A $\beta$  40 оставались кинетически растворимыми в течение нескольких дней, тогда как A $\beta$  42 немедленно агрегирует в амилоидные фибриллы [18]. Релевантность (значимость) выявленной области 30–42 а.о. также подтверждена структурными исследованиями, которые продемонстрировали, что аминокислотные остатки в положении 30–40 локализуются в коре A $\beta$ -фибрилл [19].

В свою очередь уникальность прион-протеина, как коррелята инфекционности большой группы прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний млекопитающих, включая куру, болезнь Крейтцфельда–Якоба, амиотрофический лейкоспонгиоз (АЛ) у человека, скрепи у овец и губкообразную энцефалопатию у крупного рогатого скота, определяется тем, что его аномально-свернутая изоформа (PrP<sup>d</sup>, d—disease) вовлекается в процесс конформационного преобразования эндогенного клеточного прион-протеина (PrP<sup>C</sup>, C — cell), в норме встречающегося во многих тканях организма, и трансформирует его в патологический PrP<sup>d</sup> с отложением агрегатов во вне- и внутринейрональных клетках. Поэтому основной патогенетический механизм прионных инфекций, очевидно, состоит в конформационном превращении нормального (клеточного) прионного белка PrP<sup>C</sup> в патогенную изоформу PrP<sup>d</sup>, катализирующую непосредственно последующее накопление PrP<sup>d</sup>. Белковая гипотеза прионов [20] обосновывает отсутствие каких-либо посторонних агентов, необходимых для развития инфекции. При этом прионные болезни могут быть инфекционными, семейными и спорадическими.

Нормальный клеточный прионный 1 белок (PrP<sup>C</sup>) является гликопротеином, прикрепленным на поверхности цитоплазматической мембраны клеток гликозилфосфоинозитольным якорем. Он состоит из двух структурно различных частей: C-концевой глобулярной части, главным образом,  $\alpha$ -спиральной природы и неструктурированной N-терминальной части [21]. Мисфолдинг PrP<sup>C</sup> в PrP<sup>d</sup> происходит посттрансляционно и приводит к увеличению процентного содержания  $\beta$ -листных структур, частично устойчивых к обработке протеолитическим ферментом — протеиназой К. В табл. 3 показаны рассчитанные агрегационные

профили некоторых полноразмерных прион-протеинов млекопитающих, содержащие «горячие точки» агрегации. Видно, что они расположены в N-терминальной части ( $\approx 1-22$  а.о.), центральной области ( $\approx 116-197$  а.о.) и C-концевой части ( $\approx 209-264$  а.о.) соответственно.

Таблица 3 — «Горячие точки» агрегации в прион-протеине (PrP<sup>C</sup>) млекопитающих

Вид	PrP <sup>C</sup> (а.о.)	Число «горячих точек»	Положение «горячих точек» в аминокислотной последовательности белка (а.о.)
Человек	253	7	1-20; 117-135; 137-142; 178-186; 209-214; 229-237; 240-253
Хомяк	253	5	1-20; 116-134; 177-185; 231-237; 240-253
Овца	256	6	5-22; 119-139; 181-189; 212-217; 231-240; 243-256
Бык	264	6	5-22; 127-147; 189-197; 220-225; 239-248; 251-264

Роль N-концевой последовательности в агрегации белка пока не понятна, поскольку она отсутствует в протеазоустойчивом коре PrP<sup>d</sup> [20, 21]. Немного информации имеется в литературе и о функциональной роли этой области, хотя, очевидно, что она не требуется ни для трансмиссии прионов, ни для их агрегации. Выявленные C-терминальные «горячие точки» включают почти всю последовательность  $\alpha$ -спирали C-конца глобулярного домена, обозначенную как спираль C [21]. Интересно, что некоторые мутации, связанные с болезнью Крейтцфельда–Якоба у человека, находятся в этой области прионного белка, и что они связаны с конверсией PrP<sup>C</sup> в PrP<sup>d</sup>, обладающего токсичностью. Кроме того, некоторые виды PrP, устойчивые к конверсии в PrP<sup>d</sup>, как обнаружено, имеют мутации в области C-спирали, а аминокислотные остатки в позициях 214 и 218, как показано, способны модулировать формирование PrP<sup>d</sup> [22]. Также важно отметить, что основные структурные различия между прионными белками у различных видов были найдены тоже на конце C-спирали [21].

Центральная область PrP<sup>C</sup>, связывающая неструктурированную N-концевую часть с глобулярным C-терминальным доменом, как полагают, играет основную роль в конформационных изменениях PrP<sup>C</sup>. Многочисленными исследованиями вторичной структуры синтетических пептидов PrP и их фибриногенных свойств установлено, что непрерывный сегмент прионного белка, охватывающий аминокислотные остатки 106–147, совпадающий со второй «горячей точкой» прион-протеинов, идентифицированной в нашем исследовании, является важным для проявления фибриногенных свойств белка [23]. Один из синтетических пептидов, PrP106-126, который локализован в пределах центральной области PrP и около N-конца протеазоустойчивого кора PrP<sup>d</sup>, разделяет многие свойства с инфекционной формой приона, поскольку, как показано, легко формирует амилоидные фибриллы с высоким содержанием  $\beta$ -структур, проявляет частичную устойчивость к обработке протеиназой К и обладает нейротоксичностью *in vivo* [24]. Нейротоксичность PrP106–126 зависит от экспрессии эндогенного PrP<sup>C</sup>, что позволяет использовать PrP106–126 в качестве адекватной модели при изучении нейротоксичности PrP<sup>d</sup> [24]. Другой пептид — PrP118–135 вызывал, как установлено, гибель нейронов через индукцию апоптоза [25]. Токсичность PrP118–135, однако, не зависела от экспрессии эндогенного PrP<sup>C</sup>. Оба эти пептида картированы нами в центральной склонной к агрегации области PrP<sup>C</sup>.

**Заключение.** Подход, используемый в настоящей работе, представляется полезным инструментом для идентификации специфических областей аминокислотной

последовательности, обладающих агрегационной активностью *in vivo* — «горячих точек» агрегации, у функционально развернутых и нативно глобулярных белков. Результаты согласуются с гипотезой, что короткие аминокислотные отрезки белков действуют как точки нуклеации для формирования упорядоченных фибриллярных структур. Полученные данные могут быть использованы для развития научно-обоснованных подходов к проведению терапии амилоидных болезней, поскольку выявленные «горячие точки» агрегации представляют собой потенциальные мишени для блокирования развития нейродегенеративных процессов, сопровождающихся отложением амилоида в нервной ткани.

#### Литература

1. Smith, A. Protein misfolding / A. Smith // *Nature*. – 2003. – Vol. 426. – P. 883-883.
2. Rochet, J.C. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations / J.C. Rochet, P.T.Jr. Lansbury // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 10. – P. 60-68.
3. Uversky, V.N. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded / V.N. Uversky // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2004. – Vol. 1698. – P. 131-153.
4. Dobson, C.M. Protein misfolding, evolution and disease / C.M. Dobson // *Trends Biochem. Sci.* – 1999. – Vol. 24. – P. 329-332.
5. A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins / R. Linding [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 342. – P. 345-353.
6. Kelly, J.W. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways / J.W. Kelly // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1998. – Vol. 8. – P. 101-106.
7. Short amino acid stretches can mediate amyloid formation in globular proteins: the Src homology 3 (SH3) case / S. Ventura [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – Vol. 101. – P. 258-7263.
8. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates / F. Chiti [et al.] // *Nature*. – 2003. – Vol. 424. – P. 805-808.
9. Santini, S. Pathway complexity of Alzheimer's beta-amyloid Abeta16-22 peptide assembly / S. Santini, G. Wei, N. Mousseau, P. Derreumaux // *Structure*. – 2004. – Vol. 12. – P. 1245-1255.
10. A comparative study of amyloid fibril formation by residues 15–19 of the human calcitonin hormone: a single beta-sheet model with a small hydrophobic core / N. Haspel [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 345. – P. 1213-1227.
11. Prediction of «hot spots» of aggregation in polypeptides [Электронный ресурс]. – 2005. – Режим доступа: <http://bioinf.uab.es/aggrescan/>. – Дата доступа: 11.07.2012.
12. AGGRESKAN: a server for the prediction and evaluation of «hot spots» of aggregation in polypeptides / S.O. Conchillo [et al.] // *BMC Bioinformatics*. – 2007. – Vol. 8. – P. 65-81.
13. Fink, A.L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid / A.L. Fink // *Fold. Des.* – 1998. – Vol. 3. – P. 9-23.
14. Selkoe, D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy / D.J. Selkoe // *Physiol. Rev.* – 2001. – Vol. 81. – P. 741-766.
15. Mapping abeta amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis / A.D. Williams [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2004. Vol. 335. – P. 833-842.
16. A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR / A.T. Petkova [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. Vol. 99. – P. 16742-16747.
17. Amyloid fibril formation by A beta 16–22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR / J.J. Balbach [et al.] // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39. – P. 13748-13759.
18. Jarrett, J.T. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease / J.T. Jarrett, E.P. Berger, P.T.Jr. Lansbury // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32. – P. 4693-4697.
19. Structural and dynamic features of Alzheimer's Abeta peptide in amyloid fibrils studied by site-directed spin labeling / M. Torok [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 40810-40815.
20. Prion protein biology / S.B. Prusiner [et al.] // *Cell*. – 1998. – Vol. 93. – P. 337-348.
21. NMR solution structure of the human prion protein / R. Zahn [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – Vol. 97. – P. 145-150.
22. Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation / K. Kaneko [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1997. – Vol. 94. – P. 10069-10074.
23. Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106–147 form amyloid-like fibrils *in vitro* / F. Tagliavini [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1993. – Vol. 90. – P. 9678-9682.
24. Prion peptide 106–126 modulates the aggregation of cellular prion protein and induces the synthesis of potentially neurotoxic transmembrane PrP / Y. Gu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 2275-2286.
25. Chabry J., Ratsimanohatra C., Sponne I. et al. *In vivo* and *in vitro* neurotoxicity of the human prion protein (PrP) fragment P118-135 independently of PrP expression / J. Chabry [et al.] // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol. 23. – P. 462-469.

Поступила 20.08.2012

## «HOT SPOTS» OF AGGREGATION IN AMYLOID PROTEINS IN NEURODEGENERATIVE DISEASES

**Kapitulets S.P., Nichiporuk O.I., Kapitulets N.N., Kravchenko L.M.**

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

Aggregation profiles for physiologically unfolded ( $\beta$ -amyloid peptide) and native globular (prion protein PrPC) polypeptides involved with the Alzheimer's disease pathogenesis and prion diseases, accordingly, have been calculated of. "Hot spots" of aggregation in protein amino acid sequences were identified in determining the ability of unfolded polypeptides to form amyloid. The results obtained were discussed with the experimental data available in the literature.

**Keywords:** neurodegenerative diseases,  $\beta$ -amyloid peptide, prion protein, "hot spots" of aggregation.

## КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ЭТИОТРОПНОЕ ЛЕЧЕНИЕ МЕНИНГИТА, ВЫЗВАННОГО $\beta$ -ГЕМОЛИТИЧЕСКИМ СТРЕПТОКОККОМ ГРУППЫ «В», У ДЕТЕЙ

**Кудин А.П., Маржало Е.Ю.**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В работе были проанализированы клинические и лабораторные особенности менингитов, вызванных *Streptococcus agalactiae*, у детей первых месяцев жизни. Заболевание начинается с беспокойства, повышения температуры и нарастающей вялости ребенка. Менингеальные симптомы в начале заболевания могут отсутствовать. В анализе крови часто отмечается лейкопения с нейтрофилезом и сдвигом влево. Уровень стрептококков группы «В» в начале заболевания обычно невысокий. Проведена оценка эффективности антибактериальной терапии у этой категории пациентов. Препаратами выбора для лечения менингита данной этиологии являются цефалоспорины III и IV поколения. В качестве резервных препаратов следует иметь ввиду карбопенемы, ванкомицин или фторхинолоны (по жизненным показаниям).

**Ключевые слова:** *Streptococcus agalactiae*, менингит, новорожденные, лечение.

**Введение.** *Streptococcus agalactiae* ( $\beta$ -гемолитический стрептококк группы «В» — СГВ) является одним из наиболее значимых возбудителей инвазивных бактериальных инфекций у новорожденных детей. Данный микроб обнаруживается на слизистых половых путей, уретры и прямой кишки у 10–40% здоровых людей [1–4]. Прямая кишка является естественным резервуаром для СГВ в организме человека [1]. Колонизация влагалища во время беременности возрастает с 10–15% до 25% [3, 5], что повышает риск развития инвазивной СГВ-болезни у новорожденных [2].

На долю СГВ приходится почти половина всех изолятов культур крови, выделяемых в течение первых дней жизни у новорожденных с сепсисом [2].

Инфицирование ребенка происходит, в основном, при прохождении через родовые пути, и именно в этом случае существует наиболее высокий риск развития инвазивной СГВ-болезни. Местом первичной колонизации микроба у новорожденного ребенка являются кожа, слизистые дыхательных путей, легкие. Несмотря на то, что вероятность передачи стрептококка от матери ребенку составляет около 50%, риск развития инвазивной СГВ-инфекции относительно невысок и составляет примерно 0,2% [2, 5, 6]. Однако тяжесть течения СГВ-болезни у новорожденных и относительно высокий риск развития неблагоприятных исходов делает эту проблему чрезвычайно актуальной.

В зависимости от сроков манифестации выделяют две формы СГВ-болезни:

1. С ранним началом (early onset disease) — в первые 7 дней жизни (примерно в 80% случаев сепсис развивается в первые 24–48 часов жизни).

2. С поздним началом (late onset disease) — со 2-й недели жизни до 3-х месяцев.

Ранняя форма СГВ-болезни встречается в 70–80% случаев и проявляется в виде сепсиса или пневмонии, значительно реже — в форме менингита. Летальность при этой форме инфекции в настоящее время составляет 4–6% (у доношенных новорожденных 2–3%, у недоношенных — 20–30%). На долю позднего варианта СГВ-болезни приходится 20–30% всех случаев инвазивной СГВ-инфекции, и он, как правило, манифестируется в виде гнойного менингита. Летальность при поздней форме СГВ-болезни доходит до 5–15% [1, 2, 4, 6].

В настоящее время в развитых странах заболеваемость инвазивной СГВ-инфекцией составляет 0,35–1,13 случаев на 1000 живых новорожденных [2, 4]. К факторам риска по развитию инвазивной СГВ-болезни относятся: высокий уровень обсемененности стрептококком слизистых половых путей, предыдущий ребенок перенес тяжелую СГВ-инфекцию, стрептококковая бактериурия во время беременности, преждевременные роды (до 37 недель), длительный безводный период (более 12 часов), повышение температуры тела у беременной незадолго до родов (более 37,5–38 °С), возраст беременной менее 20 лет, признаки хориоамнионита [2, 4].

**Цель исследования:** оценить клинико-лабораторные особенности и эффективность этиотропной терапии СГВ-менингитов у детей первых месяцев жизни.

**Материалы и методы.** В работе были проанализированы 17 историй болезни грудных детей (9 мальчиков и 8 девочек), находившихся на лечении в Детской инфекционной клинической больнице, 3-й городской детской клинической больнице и в РНПЦ «Мать и дитя» г. Минска с 2006 г. по 2011 г. с верифицированным СГВ-менингитом. Средний возраст детей на момент поступления в стационар составлял  $32,4 \pm 8,7$  дней (от 1 дня до 150 дней). Ранняя форма СГВ была зафиксирована только у 2/17 больных (11,8%). Остальные пациенты перенесли позднюю форму СГВ (88,2%). Манифестация заболевания у большинства из них происходила с 7-го по 28-й день жизни (у 10/17 детей или 58,8%), на 2–3-м месяце жизни — у 4/17 детей (23,5%) и в 1 случае (5,9%) СГВ-инфекция развилась у ребенка в пятимесячном возрасте. Заболевание протекало в форме гнойного менингита или менингоэнцефалита у 10 пациентов (58,8%), менингита, осложненного септициемией без септического шока — у 6 (35,3%) и осложненного септическим шоком — у 1 (5,9%). Пребывание в стационаре колебалось от 14 до 138 дней и в среднем составило  $53,5 \pm 7,9$  суток.

Обследование детей включало общеклинические методы (общий анализ крови (ОАК), общий анализ мочи, биохимический анализ крови), посевы на флору по стандартным методикам (крови, ликвора, мазков из зева, глаз и носа). У 16 детей СГВ был выделен из крови и/или цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), а у одного — из конъюнктивального мешка.

Оценка клинико-лабораторных показателей проводилась в сравнении с возрастными нормами [7].

Обработка полученных данных производилась на компьютере с использованием стандартного пакета программ статистического анализа Windows 2000 Microsoft Excel.

**Результаты и их обсуждение.** Заболевание в анализируемой группе детей начиналось с выраженного беспокойства ребенка, сопровождавшегося подъемом температуры и нарастающей вялостью. Максимальная температура наблюдалась у детей в первый день заболевания и составляла  $39,0 \pm 0,7$  °С, а средняя продолжительность лихорадки была около 2 недель (от 1 до 55 дней). Частота сердечных сокращений при поступлении в стационар составила  $159,0 \pm 21,1$  (от 136 до 209) ударов в минуту и превышала возрастные показатели у 76,5% детей. Одышка регистрировалась реже (у 35,3% больных). Беспокойство отмечалось у 70,6% пациентов (12/15), вялость — у 88,2% (15/17). Данная симптоматика, предшество-

вавшая типичной клинической картине менингита, позволяет заподозрить диагноз заболевания на ранней стадии.

Еще одним проявлением синдрома системного воспалительного ответа у пациентов с инвазивной СГВ-инфекцией является нарушение микроциркуляции, проявлявшееся мраморностью кожи в 41,2% случаев (7/17) и цианозом носогубного треугольника с акроцианозом у 47,1% пациентов (8 случаев из 17). Геморрагическая сыпь встречалась у 11,8% пациентов (2/17). У 8 из 17 детей (47,1%) отмечался судорожный синдром. Из менингеальных симптомов у детей положительный симптом Лессажа и выбухание большого родничка зарегистрированы в 58,8% случаев (10/17), т.е. менингеальные симптомы в начале заболевания не определялись почти у половины пациентов.

При прогрессировании заболевания появляется гипотония мышц — в 47,1% случаев (8/17), угасают рефлексы — в 52,9% случаев (9/17). Реже отмечались гиперестезии, тетрапарезы, нистагм и поражения сетчатки в виде ангиопатии.

Изменения лабораторных показателей в первые двое суток госпитализации (таблица) характеризовались снижением содержания общего белка (у 88,2% больных), альбумина (у 18,2%), повышением уровня С-реактивного белка (у 30,8%), АсАт (у 40,0%), АлАТ (у 11,8%), глюкозы (у 41,2%), креатинина (у 16,7%).

Таблица — Лабораторные показатели детей с СГВ-менингитом в 1–2 сут. госпитализации

Показатель	Содержание в крови	Пределы колебаний показателя	Число обследованных детей
Общий белок, г/л,	54,4±1,1	48,1–63,3	17
Альбумин, г/л,	38,0±1,5	26,5–44,0	11
Креатинин, мкм/л	64,7±13,0	27–167	12
Глюкоза, мм/л	6,1±0,4	3,4–10,9	17
АлАТ, ЕД/л	46,9±17,9	14,3–325	17
АсАТ, ЕД/л	53,0±6,9	25–122	15
СРБ, мг/л	25,3±9,0	0,1–97,9	13
Тромбоциты, *10 <sup>9</sup> /л	382,3±44,3	83–675	16
Лейкоциты, *10 <sup>9</sup> /л	8,4±1,5	2,4–22,6	16
Молодые нейтрофилы, %	15,0±3,5	1–47	16
Нейтрофилы, %	44,5±5,5	11–80	16
Лимфоциты, %	46,7±5,9	12–84	16
Моноциты, %	6,8±0,9	1–12	16
Эозинофилы, %	2,1±0,4	0–6	16
СОЭ, мм/ч	9,0±2,0	3–26	16
АЧТВ, сек	37,8±3,2	25,6–49,7	7
ПТИ, ед	0,8±0,0	0,7–0,9	5
МНО, ед	1,5±0,3	0,8–2,5	5
Фибриноген А, г/л	3,6±0,6	2,4–6,6	7

В ОАК обращают на себя внимание лейкопения (у 68,8% детей) сопровождающаяся нейтрофилезом (у 50,0%) и сдвигом лейкоцитограммы влево (у 75,0%), а также тромбоцитоз (у 37,5% пациентов) и повышение СОЭ (у 18,8%). Последние два показателя указывают на давность ССВО (не менее нескольких суток), что позволяет предположить позднее поступление ребенка в стационар вследствие, вероятно, незамеченного родителями более раннего начала заболевания. (Можно предположить, что первые симптомы заболевания в виде беспокойства, изменения поведения ребенка, некоторого снижения аппетита и т.д.

воспринимались родителями как особенности поведения ребенка в этом возрасте, и этим симптомам своевременно не было уделено должного внимания). Лейкопения, выявленная у большинства детей, также является одним из проявлений ССВО и прогностически более неблагоприятна, т.к. свидетельствует об истощении пула нейтрофилов.

Изменения в коагулограмме трудно оценивать из-за небольшого числа наблюдений, однако можно отметить повышение уровня АЧТВ у 3 из 7 обследованных детей, МНО, фибриногена А и положительный этаноловый тест у 2 из 5. Это позволяет констатировать отсутствие признаков ДВС-синдрома более, чем у половины больных, несмотря на генерализованный характер инфекции.

Максимальный уровень цитоза составил в среднем  $8285,8 \pm 2190,5$  клеток в 1 мкл (от 50 до 29867) с преобладанием нейтрофилов ( $80,9 \pm 5,6\%$ ). На санацию ЦСЖ потребовалось от 14 до 92 дней. Такая большая продолжительность АБ-терапии, по-видимому, связаны с сопутствующей патологией (недиагностированная смешанная инфекция, госпитальная суперинфекция, внутричерепные осложнения). У 68,8% пациентов цитоз превышал 1000 клеток в 1 мкл.

Изменения биохимических показателей ликвора были характерными для гнойного менингита. Содержание белка в ликворе было повышено и в среднем составило  $2,0 \pm 0,4$  г/л (от 0,58 до 6,6 г/л), при этом у 81,3% детей концентрация белка превышала 1,0 г/л, что свидетельствует о выраженном повышении проницаемости гематоэнцефалического барьера и/или о поражении вещества головного мозга (косвенный признак энцефалита).

У 61,5% пациентов был снижен абсолютный уровень глюкозы в ликворе (менее 2,5 мм/л) и составлял  $2,3 \pm 0,2$  мм/л, а соотношении концентрации глюкозы в крови и в ЦСЖ составило  $3,3 \pm 0,5$  (при норме 1,5–2). У 81,8% больных также отмечалось характерное для гнойных менингитов снижение уровня хлоридов до  $113,4 \pm 1,5$  мм/л.

Однозначно оценить эффективность этиотропной терапии у наших пациентов исследовании довольно сложно, т.к. верификация диагноза (выделение СГВ при бактериологическом исследовании) требует нескольких дней (в нашей работе от 4 до 6), а возраст детей требует агрессивной АБ-терапии (АБТ). Как правило, лечение таких детей начинали с комбинации двух АБ и в последующем корректировали этиотропную терапию в зависимости от показателей санации ликвора. К сожалению, у нас нет практики назначения стандартной АБТ, которая во многом сформулирована в работах М. Whitby (1986) и J. Levy, P. De Mol (1987) и которая, в последующем цитируется во многих источниках справочной литературы [8–10]. С учетом наиболее вероятной микрофлоры, вызывающей менингиты у новорожденных (СГВ, кишечная палочка, реже — листерии), и ее чувствительности к АБ, в качестве стартовой этиотропной терапии предлагается использовать комбинацию ампициллина (для воздействия на СГВ и листерию) и цефотаксима или аминогликозидов, мишенью для которых должны стать грамм-отрицательные энтеробактерии (в первую очередь, *E. coli*) в течение 2–3 недель. Использовать подобные рекомендации в наших условиях крайне затруднительно, т.к. в республике нет формы выпуска ампициллина (или пенициллина, которым также можно было бы пользоваться) для в/венного введения. Комбинированный препарат «амписульбин», содержащий ампициллин и сульбактам (ингибитор  $\beta$ -лактамаз), исходя из инструкции по применению не может быть назначен в достаточной для лечения менингита дозе по ампициллину. Клиническая эффективность цефотаксима в последние 5–10 лет заметно снизилась, а цефтриаксон нельзя применять у новорожденных из-за высокой вероятности развития холестаза и формирования желчных камней. По-видимому, этим во многом можно объяснить то, что АБТ у наших пациентов отличалась таким разнообразием. Возможно, выходом из этой ситуации может послужить стартовое применение карбопенемов, которые *in vitro* эффективны против всех основных

этиологических факторов гнойных менингитов у новорожденных, однако это требует отдельных исследований, как по эффективности такого подхода, так и его целесообразности

Для лечения применялись следующие препараты: Цефтриаксон 75–130 мг/кг/сут, Ванкомицин 30–60 мг/кг/сут; Цефепим 130 мг/кг/сут; Цефотаксим 80 мг/кг/сут; Цефоперазон/сульбактам (Стизон) 100–150 мг/кг/сут, Имипенем/циластатин (Тиенам) 40 мг/кг/сут, Меропенем 90–120 мг/кг/сут, Левофлоксацин (Таваник) 22 мг/кг/сут, Ципрофлоксацин 10 мг/кг/сут. Курс лечения эффективной этиотропной терапией составил от 12 до 27 дней, в среднем около 14 сут.

Признаком санации ликвора считали снижение цитоза менее 100 клеток в 1 мкл, содержание лимфоцитов при этом должно было составлять не менее 80%, а биохимические показатели должны были нормализоваться. (В одном случае отмена АБ-терапии при нормализации всех показателей, кроме повышенного уровня белка, привела к рецидиву менингита спустя 3 сут.).

Эффективными средствами этиотропной терапии мы считали те АБ, на фоне применения которых происходило выздоровление больного. Наиболее часто добиться эффекта удалось при использовании цефалоспоринов III поколения (ЦС-3) — у 11/16 больных (68,8%). Из них применялись цефтриаксон, цефотаксим, цефепим (ЦС 4-го поколения — у 1 ребенка) или цефоперазон/сульбактам. ЦС-3 были эффективны в виде монотерапии у 4/16 пациентов (25,0%) и в сочетании с другими АБ (карбопенемами, ванкомицином, фторхинолонами) — у 7/16 детей (43,8%). Из ЦС-3 наиболее эффективными оказались цефтриаксон (у 7 из 11 детей, получавших этот препарат — 63,6%) и цефоперазон/сульбактам — у 2 из 4 больных.

В остальных случаях санации ЦСЖ удалось добиться при использовании карбопенемов (монотерапия во всех случаях) у 3/11 пациентов (27,3%), комбинации ванкомицина и фторхинолонов — у 2 и в одном случае — при применении амикацина. Ванкомицин входил в схему эффективной АБ-терапии у 5/13 детей (38,5%), карбопенемены — у 3/11 больных (27,3%), амикацин — у 2/8 (25%), фторхинолоны — у 2/4 (50%).

Ожидаемо не был получен эффект от назначения амоксициллина/клавулановой кислоты ни в одном из 3 случаев его применения, т.к. оба эти препарата плохо проникают через ГЭБ даже при менингите [9], поэтому этот АБ не следует применять при нейроинфекциях.

**Заключение.** Таким образом, СГВ-менингит у новорожденных и детей первых месяцев жизни начинается с выраженного беспокойства, обычно с резким подъемом температуры и нарастающей вялостью ребенка. Нередко это сопровождается нарушением микроциркуляции, проявляющееся мраморностью кожи и цианозом носогубного треугольника с акроцианозом. Геморрагическая сыпь встречается редко (у 11,8% пациентов). Менингеальные симптомы в начале заболевания могут отсутствовать почти у половины пациентов, что затрудняет диагностику менингита и расширяет показания для диагностической люмбальной пункции (признаки ССВО без четкой органной патологии требуют среди прочего исключения нейроинфекций).

В первые 1–2 сут. госпитализации у пациентов отмечается лейкопения (у 68,8%) с нейтрофилезом (у 50,0%) и сдвигом лейкоцитограммы влево (у 75,0%). Повышением уровня С-реактивного белка регистрируется нечасто (у 30,8% детей). Несмотря на генерализованный характер инфекции, в начале заболевания отсутствуют признаки ДВС-синдрома более чем у половины больных.

Изменения показателей ликвора были характерными для гнойного менингита (высокий цитоза, повышение содержания белка, соотношения концентрации глюкозы в крови и ЦСЖ, а также снижение уровня глюкозы и хлоридов). При этом уровень белка у большинства детей превышал 1,0 г/л (что, вероятно, косвенно свидетельствует о поражении вещества головного мозга).

Препаратами выбора для лечения менингита данной этиологии являются цефалоспорины III и IV поколения. Однако эффективность монотерапии этими препаратами оказалась всего 25%, что говорит в пользу наличия у детей смешанной флоры или суперинфекции (недиагностированной, но характерной для этого возраста: кишечная палочка, листерии, стафилококк и др.). Возможно, поэтому у большинства детей эффекта удавалось добиться с помощью комбинированной терапии, включающей также карбопенемы, ванкомицин или фторхинолоны (по жизненным показаниям). Данная работа, на наш взгляд, также показывает острую необходимость систематизированного подхода к назначению стартовой этиотропной терапии гнойных менингитов у детей первых месяцев жизни. Это позволит более достоверно оценить ее эффективность и, при необходимости, разработать современные рекомендации по лечению детей с данной патологией.

#### Литература

1. Бочков, И.А. Эпидемиологические и экологические особенности инфекций, вызываемых стрептококками серогруппы В у беременных женщин и новорожденных детей / И.А. Бочков, Н.А. Семина, М.С. Шевчук // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2000. – № 2. – С. 56-59.
2. Berner, R. Infektionen durch Gruppe-B-Streptokokken in der Neonatalperiode / R. Berner // Monatsschr. Kinderheild. – 2003. – Bd. 151. – S. 373-383.
3. Preventing neonatal group B streptococcal infection. Intrapartum antibiotic prophylaxis in some high-risk situations // Prescrire Int. – 2011. – Vol. 20, № 114. – P. 72-77.
4. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: Revised guidelines from CDC, 2010 // Morb. Mortal. Wkly Rep. (MMWR). – 2010. – Vol. 59, (RR-10). – P. 1-36.
5. Маянский, А.Н. Стрептококки: микробиология и патология / А.Н. Маянский // Вопр. диагн. в педиат. – 2010. – № 1. – С. 9-19.
6. Инфекция *Streptococcus agalactiae*: современные возможности диагностики, профилактики и лечения / А.Л. Заплатников [и др.] // Вопр. практ. педиат. – 2011. – № 2. – С. 90-93.
7. Педиатрия / редкол.: Н.Н. Володин (гл. ред.) [и др.]; пер. с англ. – М.: Геотар Медицина, 1997. – 523 с.
8. Обзор практических рекомендаций по ведению пациентов с бактериальным менингитом американского общества инфекционных болезней / И.А. Карпов [и др.] // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2006. – № 3. – С. 217-242.
9. Антимикробная терапия: карман. справочник / Дж. Сэнфорд [и др.]; пер. с англ. – М.: Практика, 1996. – 168 с.
10. Feigin and Cherry's textbook of pediatric infectious diseases / ed. by R.D. Feigin [et al.]. – 6th ed. – 2009. – Vol. 2. – P. 439-472, 1239-1258, 1420-1426.

Поступила 19.07.2012

## CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTIC AND ANTIBACTERIAL TREATMENT OF MENINGITIS, CAUSED BY B-HAEMOLYTIC STREPTOCOCCUS GROUP «B» IN NEWBORNS

**Kudin A.P., Marzhalo E.J.**

*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

In the study clinical and laboratory features of the meningitis caused by *Streptococcus agalactiae* in newborns have been analyzed. The disease began with anxiety, fever, and increasing apathy of the child. Meningeal symptoms in early disease may be absent. In the analysis of blood it was frequently marked leukopenia with neutrophilia and shift to the left. *Streptococcus* group B level in early disease usually low. The estimation of antibacterial therapy efficiency in these patients was carried out. Drugs of a choice for meningitis treatment were cephalosporins of III and IV generations. As reserve preparations should be kept in mind carbapenems, vancomycin or fluorquinolons (under vital indications).

**Keywords:** *Streptococcus agalactiae*, meningitis, newborns, treatment.

# ПРОФИЛАКТИКА ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ОЖГОВОЙ ТРАВМОЙ В УСЛОВИЯХ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ОТДЕЛЕНИЙ БОЛЬНИЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

Ханенко О.Н.

*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск*

**Резюме.** Проведен обзор научной литературы по эпидемиологии и профилактике внутрибольничных инфекций у пациентов с ожогами с обобщением результатов отдельных собственных исследований по изучению особенностей эпидемического процесса при гнойно-септических инфекциях у детей с ожогами.

**Ключевые слова:** ожоговые стационары, пациенты с термической травмой, внутрибольничные инфекции, эпидемиология и профилактика гнойно-септических инфекций.

**Введение.** В настоящее время проблема термической травмы занимает одно из ведущих мест среди травм мирного времени [1–4]. В Республике Беларусь ежегодно обращается за медицинской помощью около 30000 пострадавших с ожогами, из которых на долю детей и подростков приходится около 20% [5, 6].

Хирургические отделения комбустиологического профиля больничных организаций здравоохранения традиционно считаются объектами риска по возникновению и распространению внутрибольничных инфекций, основные позиции в структуре которых принадлежат гнойно-септическим инфекциям, вызванным условно-патогенной микрофлорой [7–11].

Применение «полукрытого» метода лечения поверхностных ожогов в процессе оказания медицинской помощи в стационарных условиях, длительные сроки госпитализации при тяжелой термической травме, большое число инвазивных лечебно-диагностических манипуляций существенно увеличивают роль и эпидемиологическое значение искусственного (артифициального) механизма передачи возбудителей гнойно-септических инфекций [5, 12]. В экзогенном инфицировании пациентов с ожогами существенную роль играет контактный механизм передачи возбудителей гнойно-септических инфекций [13, 14].

Широкое применение антибактериальных препаратов в профилактике и лечении гнойно-септических инфекций у пациентов с ожогами осложнилось распространением в реанимационных и хирургических отделениях комбустиологического профиля штаммов микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью [8, 12, 15]. Помимо непосредственной угрозы для жизни пациента, особенно с обширными и глубокими ожогами, возбудители госпитальных инфекций обладают также выраженным эпидемическим потенциалом и при определенных условиях способны к широкому распространению [7, 12, 16].

**Цель исследования:** обоснование подходов по профилактике отдельных гнойно-септических инфекций у пациентов с ожогами при оказании им медицинской помощи в условиях специализированных отделений больничных организаций здравоохранения.

**Материалы и методы.** Проведен обзор данных научной литературы по эпидемиологии и профилактике внутрибольничных инфекций у пациентов с ожогами.

В отделении реанимации и детском ожоговом отделении Республиканского ожогового центра (РОЦ) методом «отпечатков» (бактериологические печатки фирмы HiMedia) отобрано 128 проб с поверхностей различных объектов внешней среды с целью изучения обсемененности их микроорганизмами. При идентификации микроорганизмов использовали микробиологический анализатор mini Api, VITEK 2 Compact. Изучена резистентность 165 штаммов микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lentus*), изолированных из ожоговых ран пациентов, к 7 антисептикам (бетрадин, 1% водный раствор йодоната, раствор йодиола,

0,05% раствор хлоргексидина, 0,01% раствор мирамистина, 0,02% раствор фурацилина и 1% раствор борной кислоты). Устойчивость штаммов микроорганизмов к 4 дезинфектантам (0,5% «Анасепт», 0,5% «Славин», 0,5% «Пероксин», 1% «Септанес») определяли качественным суспензионным методом в соответствии с инструкциями по их применению, руководствуясь бактерицидными режимами дезинфекции. Микробиологические исследования выполнены в лаборатории ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии» и лаборатории кафедры эпидемиологии и микробиологии ГУО «Белорусская медицинская академия последиplomного образования». При статистической обработке рассчитывались относительные показатели частоты и структуры изучаемых явлений (P) со статистической ошибкой (Sp).

**Результаты и их обсуждение.** В настоящее время единой концепции контроля над инфекцией у обожженных нет. Отдельные исследователи считают обычный микробиологический мониторинг в сочетании со стандартными правилами асептики достаточным для минимизации опасности госпитальных инфекций в ожоговых стационарах [12, 17, 18].

В комплексе мер профилактики и терапии местных гнойно-воспалительных заболеваний у лиц с термическими травмами ведущее значение отводится антибактериальным препаратам как системного, так и местного применения [9, 12, 19]. Вместе с тем, остаются мало изученными закономерности формирования и распространения вариантов бактерий, вегетирующих в ожоговых ранах, с приобретенной устойчивостью к антисептикам. Выбор препарата для терапевтической антисептики в комбустиологической практике в настоящее время проводится на основании показателей о природной (естественной) чувствительности к нему различных видов микроорганизмов, имеющих этиологическое значение в развитии нагноительных процессов ожоговых ран. Однако такой подход к использованию антисептиков у пациентов с нагноительными процессами в области ожоговой раны не всегда может обеспечить выбор наиболее активных препаратов для лечения. Эффективность терапевтической антисептики в значительной мере будет зависеть от степени антимикробной активности препаратов в отношении основных представителей микрофлоры, выделяемой из ожоговых ран на различных этапах течения раневого процесса.

Анализ резистентности 165 штаммов микроорганизмов, изолированных из ран детей с ожогами в РОЦ, показал, что все выделенные штаммы микроорганизмов оказались резистентными к раствору йодиола. Из 125 штаммов стафилококков резистентными к 1% раствору борной кислоты оказались 34,4%, к 0,01% раствору мирамистина — 16% изолятов. Установлено, что из 40 штаммов грамотрицательных бактерий резистентными к раствору мирамистина были 90%, к раствору 1% борной кислоты — 55%. В 96,4% случаев микроорганизмы были чувствительными к 0,05% раствору хлоргексидина. Все выделенные штаммы бактерий оказались чувствительными к раствору бетадина и 1% раствору йодоната. Установлено, что все выделенные штаммы микроорганизмов оказались резистентными к раствору йодиола.

Несмотря на то, что мировой опыт свидетельствует о невозможности полного предотвращения инфицированности обожженных даже при самой строгой изоляции (это связано с риском эндогенного инфицирования), использование современных систем изоляции пациентов с ожогами позволяет значительно уменьшить опасность внутрибольничных инфекций. Значительно уменьшает опасность госпитальной инфекции лечение пациентов с ожогами в абактериальной среде, в частности на флюидизирующих кроватях типа «КлиниТрон», а также четкое соблюдение подходов в области дезинфекции и стерилизации объектов внешней среды, антисептики рук медицинскими работниками [7, 12–14, 19].

Исследования, проведенные в РОЦ, показали, что из 48 штаммов микроорганизмов, выделенных с объектов внешней среды РОЦ, 13 (27,1±6,4%) были изолированы с чистых

постельных принадлежностей, 11 (22,9±6,1%) — с вентилей кранов умывальников палат ОИТР, перевязочной и предоперационной, 9 (18,8±5,6%) — с полотенец, 7 (14,6±5,1%) — с рук медицинских работников в перчатках (до манипуляции), 5 (10,4±4,4%) — с каталок для перевозки больных, 3 (6,3±3,5%) положительные находки отмечены с поверхности санитарно-гигиенической одежды медицинских работников. Среди выделенных штаммов микроорганизмов из объектов окружающей среды различных функциональных помещений РОЦ как в монокультуре, так и в ассоциации с другими микроорганизмами, преобладали стафилококки: *Staphylococcus saprophyticus* (36,5±6,1%), *Staphylococcus epidermidis* (28,6±5,7%) и *Staphylococcus aureus* (11,1±4,0%). Частота выделения других микроорганизмов (*Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*) составила от 3,2±2,2 до 9,5±3,7%.

При изучении устойчивости к дезинфектантам 36 штаммов стафилококков, выделенных с объектов внешней среды РОЦ, установлено, что 5 штаммов (13,9±5,8%) оказались резистентными к «Пероксину», 2 (5,6±3,8%) — к «Септанесу», один (2,8±2,7%) - к «Славину». Все резистентные к дезинфектантам стафилококки изолированы с мягкого инвентаря (полотенец, постельных принадлежностей, санитарно-гигиенической одежды медицинских работников).

Как показывает опыт работы различных комбустиологических центров, включая и РОЦ, контроль инфекции в ожоговом стационаре требует обязательного системного подхода, основанного на осведомленности о проблеме инфекции всего персонала [1, 5, 18, 20]. При этом мероприятия по контролю над инфекцией можно подразделить на: организационные; санитарно-противоэпидемические; диагностические; лечебно-профилактические.

Организационные мероприятия проводятся администрацией больничной организации здравоохранения, на базе которого располагается ожоговое отделение, и включают в себя: рациональное планирование строительства ожоговых центров; создание центрального стерилизационного отделения; обеспечение возможности проведения микробиологических иммунологических, цитологических и гистологических исследований; создание в стационаре комиссии по профилактике внутрибольничных инфекций, состоящей из компетентных лиц, представляющих все госпитальные службы, а также обязательно госпитального эпидемиолога.

Задачи профилактики внутрибольничных инфекций в ожоговых отделениях должны ставиться как основные уже при их проектировании и создании больничных организаций здравоохранения. При этом представляется рациональным разделение пациентов с термическими травмами в зависимости от степени инфицирования ожоговых ран. Особенно важна изоляция обожженных, поступивших в первые часы или сутки после травмы, у которых возможна ранняя хирургическая некрэктомия, от пациентов, поступающих в поздние сроки после травмы с выраженным нагноением ожоговых ран. Идеальным следует считать размещение больных с обширными ожогами в боксированных палатах, шлюзовую систему доступа к ним персонала и изолированную систему кондиционирования и обеззараживания воздуха [7, 12].

В конечном итоге средства, затрачиваемые на создание соответствующих условий содержания обожженных, приведут к значительной экономии средств, расходуемых на лечение инфекций ожоговых ран и инфекционных осложнений ожоговой болезни [5, 14].

**Выводы.** Таким образом, профилактика внутрибольничных инфекций у пациентов с ожоговой травмой при оказании им медицинской помощи в условиях больничных организаций здравоохранения должна носить комплексный характер и включать в себя организационные, санитарно-противоэпидемические, микробиологические, терапевтические, хирургические и другие аспекты оказания помощи пострадавшим от ожогов.

Применение дезинфицирующих средств и антисептиков в специализированных хирургических отделениях комбустиологического профиля должно осуществляться в соответствии с данными локального микробиологического мониторинга резистентности микроорганизмов к применяемым препаратам.

#### Литература

1. Актуальные вопросы комбустиологии, пластической хирургии и лечения ран: материалы науч.-практ. конф. – Донецк: «Донбасс», 2011. – 264 с.
2. Летальность при термических поражениях у детей: состояние, причины и пути ее снижения / Л.И. Будкевич [и др.] // Рос. вест. перинатологии и педиатрии. – 2004. – № 4. – С. 51-54.
3. Соколов, В.А. Зарубежная статистика ожогов / В.А. Соколов, Ю.Р. Скворцов // Скорая медицинская помощь. – 2011. – № 3. – С. 58-61.
4. Исследования глобального бремени болезней: обновл. информ., 2004 год [Электронный ресурс] // Всемирная организация здравоохранения. – Женева, 2008. – Режим доступа: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GBD\\_rehort\\_2004update\\_ful.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_rehort_2004update_ful.pdf). – Дата доступа: 21.11.2008.
5. Актуальные проблемы лечения термических поражений и их последствий: материалы респ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию Белорус. респ. ожогового центра на базе УЗ «ГК БСМП» / под ред. О.Н. Почепень. – Минск: ДокторДизайн, 2008. – 140 с.
6. Статистика ожоговой травмы в Республике Беларусь / Я.Я. Кошельков [и др.] // Сб. науч. тр. 2-го съезда комбустиологов России. – Москва, 2008. – С. 24-25.
7. Внутрибольничные инфекции: пер. с англ. / под ред. Р.П. Венцеля. – изд. 2-е., переработанное и дополненное. – М.: Медицина, 2004. – 840 с.
8. Крутиков, М.Г. Инфекция у обожженных: этиология, патогенез, диагностика, профилактика и лечение : автореф. дис. ... докт. мед. наук / М.Г. Крутиков – М., 2005. – 45 с.
9. Леонович, С.С. Клиническая и микробиологическая оценка методов лечения ожогов у детей : автореф. дис. ... канд. мед. наук / С.С. Леонович – Минск, 2000. – 22 с.
10. Лунева, И.О. Возможности микробиологического мониторинга в ожоговом стационаре / И.О. Лунева, Н.В. Островский // Проблемы лечения тяжелой термической травмы: материалы 8-й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Н. Новгород, 2004. – С. 87-88.
11. Моно- и ассоциированная микрофлора при раневой инфекции у больных с термической травмой / Д.Д. Меньшиков [и др.] // Журн. микробиол. – 2009. – № 6. – С. 3-7.
12. Алексеев, А.А. Ожоговая инфекция. Этиология, патогенез, диагностика, профилактика и лечение: монография / А.А. Алексеев, М.Г. Крутиков, В.П. Яковлев. – М.: Вузовская книга, 2010. – 416 с.
13. Марченко, А.Н. Особенности микробного пейзажа объектов больничной среды хирургических стационаров многопрофильной больницы / А.Н. Марченко, О.П. Маркова, Е.В. Сперанская // Дезинфекционное дело. – 2009. – № 3. – С. 49-54.
14. Организация системы профилактики септических осложнений у больных отделений реанимации и интенсивной терапии хирургического профиля / В.Г. Акимкин [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2008. – № 2. – С. 11-16.
15. Бобровников, А.Э. Клинико-лабораторное обоснование антибиотикопрофилактики послеоперационных инфекционных осложнений у обожженных: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.Э. Бобровников – М., 2000. – 32 с.
16. European Centre for Disease Prevention and Control: Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2008. [Electronic resource]. – Stockholm, 2008. – Mode of access: [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0812\\_SUR\\_Annual\\_EpidemiologicalReport\\_2008.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0812_SUR_Annual_EpidemiologicalReport_2008.pdf). – Date of access : 12.09.2009.
17. Особенности организации и работы отделения септической реанимации Центра термической травмы и пластической хирургии / А.В. Воронин [и др.] // Актуальные проблемы термической травмы: тез. докл. междунар. конф., посвящ. 70-летию НИИ скорой помощи им. Ю.Ю. Джанелидзе и 55-летию ожогового центра. – СПб., 2002. – С. 42-43.
18. Храпунова, И.А. К вопросу о создании системы санитарно-эпидемиологического надзора за внутрибольничными инфекциями медицинского персонала ожоговых центров / И.А. Храпунова, Ю.И. Тюриков, Л.С. Гладкова // Актуальные проблемы термической травмы: тез. докл. междунар. конф. посвящ. 70-летию НИИ скорой помощи им. Ю.Ю. Джанелидзе и 55-летию ожогового центра. – СПб., 2002. – С. 74-77.
19. Современные технологии в лечении ран и раневой инфекции: сб. науч. ст. конф. Гомель. мед. ун-та. – Гомель: ГогМУ, 2010. – 115 с.
20. Prevention of hospital-acquired infections in the Palermo Burns Centre / M.V. Torregrossa [et al.]. // Ann. Burns Fire Disasters. – 2000. – Vol. 13, № 3. – P. 143-148.

Поступила 20.08.2012

# PROPHYLAXIS OF PURULENT-SEPTIC INFEKTIONS IN PATIENTS WITH BURN INJURIES IN HOSPITAL SPECIALIZED DEPARTMENTS

Hanenko O.N.

*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus*

A review of scientific literature on the epidemiology and prevention of nosocomial infections in patients with burns as well as a generalization of the own research results on the characteristics of the epidemic process in septic infections in children with burns are presented in the paper.

**Keywords:** burn hospitals, patients with thermal injuries, nosocomial infections, epidemiology and prevention of septic infection.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К КАРБАПЕНЕМАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Ермакова Т.С., Горбунов В.А., Пыж А.Э., Титов Л.П.

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В статье представлены результаты исследований антибиотикорезистентности к карбапенемам штаммов грамотрицательных микроорганизмов из коллекции референс-центра мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов, функционирующего на базе ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Обобщены данные по мониторингу циркуляции этих возбудителей в организациях здравоохранения страны в 2010–2011 гг. Выявлено, что в этиологической структуре преобладали *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella spp.* Фенотипическими методами тестирования чувствительности бактерий к антимикробным препаратам, а так же с помощью специальной компьютерной программы был проведен расчет уровней резистентности для каждого антибиотика. С использованием метода двойных дисков с ЭДТА было исследовано 18 полирезистентных коллекционных изолятов на наличие у них металло- $\beta$ -лактамаз (МБЛ). Продукция МБЛ была выявлена у 3 изолятов.

**Ключевые слова:** карбапенемы, грамотрицательные бактерии, резистентность к антибиотикам, мониторинг.

**Введение.** Антибиотикорезистентность патогенных и условно патогенных микроорганизмов — глобальная проблема, для решения которой необходимы усилия как на международном, так и национальном уровнях. Развитие резистентности к антимикробным препаратам и нехватка достаточного количества новых антибиотиков повышает вероятность постепенного распространения неизлечимых инфекций с множественной лекарственной устойчивостью. Особое беспокойство вызывает то обстоятельство, что антибиотикорезистентность, как правило, полностью или почти необратима, несмотря на реализацию программ по борьбе с резистентностью и управлением адекватным назначением антибиотиков [1–4].

Для осуществления эффективного эпидемиологического надзора за распространением и циркуляцией полирезистентных штаммов на территории Республики Беларусь ежегодно начиная с 2003 г. на базе национального референс-центра мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов, функционирующего на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии при участии опорных баз, расположенных по всей территории страны, проводится исследование формирования резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых

микроорганизмов и депонирование культур микроорганизмов от пациентов. В референс-центре осуществляется углубленный анализ биологических свойств возбудителей, выделенных от пациентов в регионах, различных типов стационаров, нозологических форм заболеваний и локализации патологического процесса, осуществляется депонирование выделенных культур в национальную коллекцию микроорганизмов, патогенных для человека.

Карбапенемы (имипенем, меропенем, эртапенем, дорипенем) относятся к  $\beta$ -лактамным антибиотикам. По сравнению с пенициллинами и цефалоспоридами, они более устойчивы к гидролизующему действию бактериальных  $\beta$ -лактамаз, в т.ч. расширенного спектра действия, и обладают более широким диапазоном, низкой токсичностью, хорошими фармакокинетическими параметрами. Применяются при тяжелых инфекциях различной локализации, включая нозокомиальные, чаще как препараты резерва, но при угрожающих жизни инфекциях могут быть назначены в качестве первоочередной эмпирической терапии. Карбапенемы являются ингибиторами синтеза клеточной стенки, блокирующими транспептидазную активность пенициллинсвязывающих белков. Они стабильны к расщеплению большинством  $\beta$ -лактамаз, включая  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра. Однако в настоящее время, приобретенная устойчивость к антибиотикам данной группы становится все более распространенной среди грамотрицательных бактерий [5–7].

На основании различий в аминокислотной последовательности (первичной структуры ферментов),  $\beta$ -лактамазы разделяют на четыре молекулярных класса — А, В, С и D [3]. Ферменты классов А, С и D являются гидролазами серинового типа, ферменты класса В являются металлосодержащими гидролазами, в активном центре которых локализованы один или два атома цинка. Способностью гидролизовать карбапенемы обладают отдельные представители разных молекулярных классов  $\beta$ -лактамаз [5], однако наиболее распространенными и клинически важными в настоящее время являются сериновые карбапенемазы: *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase* (молекулярный класс А), металло- $\beta$ -лактамазы (молекулярный класс В) и отдельные ОХА-ферменты подгруппы ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51, ОХА-58 (молекулярный класс D).

Согласно рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) при выявлении резистентных к карбапенемам грамотрицательных бактерий (диаметр зоны подавления роста 16–21 мм) необходимы скрининговые исследования культур микроорганизмов от пациентов на выявление карбапенемаз.

Наиболее доступным и информативным методом выявления МБЛ является метод двойных дисков с ЭДТА или метод Ходжа [4]. Метод основан на выявлении синергизма между  $\beta$ -лактамами — цефтазидимом, имипенемом и меропенемом, которые являются субстратами для металлокарбапенемаз, и металлохелаторами — веществами, связывающими ионы цинка из активного центра микробного фермента, ингибируя их гидролитическую активность

**Цель исследования:** проведение фенотипических исследований по выявлению карбапенемаз в популяциях циркулирующих в организациях практического здравоохранения грамотрицательных бактерий.

**Материалы и методы.** Исследования проводили на штаммах из коллекции лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, полученных от организаций здравоохранения Республики Беларусь в период 2009–2012 гг. Было исследовано: 161 штамм *E. coli*, 138 штаммов *K. pneumoniae*, 185 штаммов *P. aeruginosa*.

Микробиологические исследования проводили в соответствии с инструкцией по применению «Микробиологические методы исследования биологического материала» [8].

Определение чувствительности выделенных чистых культур бактерий к антибиотикам осуществляли стандартными методами [9] либо с помощью автоматизированных микробиологических анализаторов согласно инструкции производителя.

Верификацию видовой принадлежности выделенных микроорганизмов, подтверждение спектра антибиотикочувствительности, МИК, Breakpoints проводили на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact (Biomerieux).

Выявление МБЛ проводили методом двойных дисков с ЭДТА [4]. Образование расширенной зоны подавления роста между диском с ЭДТА и хотя бы одним из дисков, содержащих  $\beta$ -лактамы антибиотики, расценивали как наличие продукции МБЛ у тестируемого штамма. Для повышения чувствительности метода применяли сочетание из трех дисков (имипенем, меропенем, цефтазидим) на одной чашке Петри, поскольку для некоторых штаммов возможен синергизм только с каким-либо одним из антибиотиков. Расстояние между дисками с антибиотиками и диском с ЭДТА составляло 15 мм. Вывод о присутствии МБЛ делали на основании разницы между величинами зон задержки роста культуры вокруг дисков.

С помощью компьютерной программы «Обсерва» (Biomerieux) был проведен расчет уровней резистентности (МИК) а также Breakpoints S/(I+R) для каждого антибиотика.

Результаты исследований обрабатывали статистически с помощью пакета прикладных программ «Статистика 6,0».

**Результаты и их обсуждение.** Анализ удельного веса основных таксономических групп бактерий в этиологической структуре гнойно-септических инфекций, проведенный в 2010 г. национальным референс-центром мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам показал, что 48% случаев составляют энтеробактерии, неферментирующие грамотрицательные бактерии — 22%, в т.ч. 14% — бактерии рода *Acinetobacter* и 8% — представители рода *Pseudomonas*. В структуре энтеробактерий преобладают клебсиеллы (48,5%) и кишечная палочка (25,5%). Инфекции, вызванные ацинетобактером, весьма актуальны в настоящее время в связи с трудностью их терапии. В видовой структуре этих бактерий ведущую роль играет *Acinetobacter baumannii* (97,6%). Другие виды ацинетобактерий, составляющие 2,4%, представлены *A. lwoffii*, *A. haemolyticus*, *A. junii* и *A. ursingii*. Из представителей неферментирующих грамотрицательных бактерий большую актуальность также имеют бактерии рода *Pseudomonas*. В видовой структуре псевдомонад — возбудителей различных нозоформ ГСИ преобладает синегнойная палочка — *P. aeruginosa* (96,5%). Другие виды псевдомонад выделяются значительно реже и составляют 3,5% от общего числа бактерии рода *Pseudomonas* [1].

Учитывая высокую клиническую значимость грамотрицательных микроорганизмов, был проведен анализ их резистентности к карбапенемам (имипенем, меропенем).

Результаты тестирования фенотипической антибиотикорезистентности бактерий, выделенных от больных в бактериологических лабораториях организаций здравоохранения в Республике Беларусь, представлены в таблице.

Таблица — Интерпретация результатов определения чувствительности штаммов грамотрицательных бактерий

Антибиотик	Количество штаммов	Breakpoints, S / (I+R)	Чувствительные, %	Умеренно-устойчивые, %	Устойчивые, %
<i>E. coli</i>					
Имипенем	39	$\leq 4 / \geq 8$	100	0	0
Меропенем	161	$\leq 4 / \geq 8$	99	0	1

<i>K. pneumoniae</i>					
Имипенем	92	≤4 / ≥8	95	0	5
Меропенем	138	≤4 / ≥8	93	0	7
<i>P. aeruginosa</i>					
Имипенем	138	≤4 / ≥8	37	5	58
Меропенем	185	≤4 / ≥8	34	1	65

Как следует из приведенных в таблице данных, чувствительными к имипенему и меропенему оказались все или почти все коллекционные штаммы *E. coli* (99–100%, соответственно), *K. pneumoniae* (93–95%, соответственно). В отношении *P. aeruginosa* карбапенемы характеризуются умеренной активностью. Устойчивыми и умеренно устойчивыми к имипенему были 63%, к меропенему – 66% штаммов, из которых резистентными являлись 58% и 65%, соответственно.

Анализ распределения грамотрицательных штаммов условно-патогенных бактерий по значениям МИК позволяет дифференцировать культуры по степени резистентности и прогнозировать скорость селекции устойчивых вариантов (рисунок).

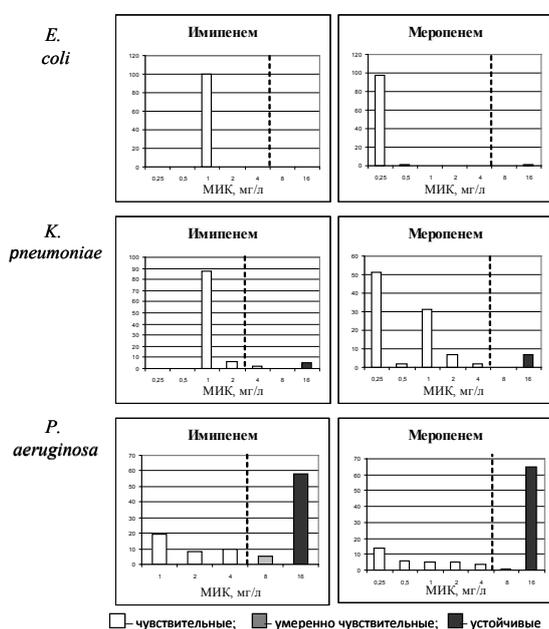


Рисунок — Анализ распределения грамотрицательных штаммов условно патогенных бактерий по значениям МИК АМП

Представленные данные наглядно демонстрируют что, карбапенемы сохраняют высокую активность в отношении большинства штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae*, при этом с учетом значения Breakpoints, запас активности этих препаратов достаточно велик. При анализе характера распределения штаммов *P. aeruginosa* по значениям МИК антибиотиков наблюдается значительный сдвиг в сторону высоких значений ингибирующих концентраций.

Методом двойных дисков с ЭДТА нами было исследовано 18 полирезистентных коллекционных штаммов на наличие у них МБЛ. Выбор штаммов основывался на резистентности отобранных культур к основным группам антибиотиков (детекция диско-диффузионным методом), верифицированных на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact (Biomérieux).

С помощью метода двойных дисков с ЭДТА продукция МБЛ была выявлена у 3 изолятов: *Klebsiella pneumoniae* 1253, *Acinetobacter baumannii* 1121, *Pseudomonas aeruginosa* 1104.

Представляет интерес проведение молекулярно-генетических исследований с целью подтверждения наличия генов МБЛ в исследованных коллекционных штаммах.

**Выводы.** Своевременное выявление распространения  $\beta$ -лактамаз у грамотрицательных бактерий имеет важное практическое и теоретическое значение, так как позволяет корректировать рекомендации по терапии бактериальных инфекций, разрабатывать экспрессные методы детекции резистентности к антибиотикам, дает важную информацию для создания новых лекарственных препаратов, преодолевающих резистентность.

#### Литература

1. Ермакова, Т.С. Видовая структура и антибиотикорезистентность возбудителей гнойно-септических инфекций / Т.С. Ермакова, В.А. Горбунов, Л.П. Титов // *Здравоохранение*. – 2011. – № 10. – С. 16-25.
2. Антибиотикорезистентность основных возбудителей постгриппозных пневмоний у взрослых в 2009-2011 гг. / Л.П. Титов [и др.] // *Здравоохранение*. – 2011. – № 11. – С. 4-10.
3. Woodford, N. Multiresistant gramnegative bacteria: the role of highrisk clones in the dissemination of antibiotic resistance / N. Woodford, J.F. Turton, D.M. Livermore // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2011. – Vol. 35. – P. 736 – 755.
4. Evaluation of double-disk potentiation and disk potentiation tests using dipicolinic acid for detection of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. / D. Yong [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50. – P. 3227-3232.
5. Шевченко, О.В. Метало- $\beta$ -лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий / О.В. Шевченко, М.В. Эйдельштейн, М.Н. Степанова // *Клинич. микробиол. антимикроб. химиотер.* – 2007. – Т. 9, № 3. – С. 211 – 218.
6. Карбапенемрезистентные штаммы синегнойной палочки – продуценты метало-бета-лактамаз: распространение в различных регионах Беларуси / Д.В. Тапальский [и др.] // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр.* – Минск, 2010. – Вып. 3. – С. 658-662.
7. Значение метало- $\beta$ -лактамаз в формировании и распространении устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам / Д.В. Тапальский [и др.] // *Достижения медицинской науки Беларуси: рец. науч.-практ. ежегодник*. – Минск: ГУ РНМБ, 2010. – Вып. 15. – С. 146-147.
8. Микробиологические методы исследования биологического материала: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохран. Респ. Беларусь 13.03.2010, рег. № 075-0210. – Минск: РЦГЭиОЗ, 2010. – 123 с.
9. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохран. Респ. Беларусь 01.12.2008, рег. № 226-1200. – Минск: РЦГЭиОЗ, 2009. – 83 с.

Поступила 26.09.2012

## DETECTION OF RESISTANCE TO CARBAPENEMS OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA CLINICAL ISOLATES BY PHENOTYPICAL METHODS

**Ermakova T.S., Gorbunov V.A., Pyz A.E., Titov L.P.**

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

The results obtained on studies of antibiotic resistance to carbapenems of gram-negative bacteria strains from the collection of the reference center for monitoring resistance to antibiotics, antiseptics and disinfectants of clinically significant microorganisms in the Republican Research & Practical Centre of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Belarus are presented in the paper. The data for monitoring the circulation of these pathogens in the country health care organizations for the period from 2010 to 2011 have been summarized. It was shown that *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp. prevailed in the etiological structure. Phenotypic methods of susceptibility testing of bacteria to antimicrobial agents and a special computer program calculated each antibiotic resistance levels. Using the method of double discs with EDTA 18 multiresistant isolates from the collection were examined for the metallo- $\beta$ -laktamases. Metallo- $\beta$ -laktamase product was found in three isolates.

**Keywords:** carbapenems, gram-negative bacteria, resistance to antibiotics, monitoring, .

# ВИДОВОЙ СОСТАВ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ МИКРОФЛОРЫ ОЖОГОВЫХ РАН У ДЕТЕЙ

Ханенко О.Н.<sup>1</sup>, Тонко О.В.<sup>1</sup>, Левшина Н.Н.<sup>2</sup>, Римжа М.И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования;

<sup>2</sup>Минский городской центр гигиены и эпидемиологии;

<sup>3</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

**Резюме.** Изучен видовой состав 838 штаммов микроорганизмов, изолированных из ожоговых ран детей, а также определена резистентность к антибиотикам наиболее часто обнаруживаемых видов бактерий.

**Ключевые слова:** ожоги, дети, микрофлора, антибиотики, резистентность.

**Введение.** Проблема гнойно-септических инфекций у пациентов с ожогами по-прежнему представляет актуальность во многих хирургических отделениях комбустиологического профиля [1, 2]. При этом наиболее частыми возбудителями в развитии нагноительных процессов в области ожоговых ран на современном этапе признаны стафилококки и неферментирующие грамотрицательные бактерии с высоким уровнем резистентности к антибиотикам различных групп [3]. Так, анализ микрофлоры, выделенной от пациентов отделений термической травмы Нижегородского НИИ травматологии и ортопедии, свидетельствует, что стафилококки являются основными возбудителями инфекционных осложнений со стороны кожи и мягких тканей у тяжелообожженных и составляют около 36% от общего числа микроорганизмов [4]. При этом за период наблюдения с 2002 по 2008 гг. отмечалось увеличение числа метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* в 2 раза, метициллинорезистентных коагулазонегативных стафилококков в 2,5 раза, со значительным повышением резистентности стафилококков к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, тетрациклинам и фторхинолонам. Наиболее активными антибиотиками против метициллинорезистентных стафилококков по результатам данного наблюдения оказались ванкомицин и линезолид, к которым на всем протяжении исследования не было выделено ни одного резистентного штамма стафилококка.

В число ведущих возбудителей гнойно-септических инфекций у пациентов с ожогами, помимо стафилококков, входят также неферментирующие грамотрицательные бактерии, главным образом *Acinetobacter baumannii* [3, 5]. По результатам исследования «РЕ-ЗОРТ», в российских отделениях реанимации и интенсивной терапии наибольшей активностью в отношении исследованных штаммов *A. baumannii* обладали цефоперазон/сульбактам, имипенем и меропенем, устойчивыми к которым были 2,2%, 2,2% и 5,5% штаммов, соответственно. Анализ резистентности «ожоговых» изолятов *A. baumannii* указывал почти на полную неэффективность препаратов цефалоспоринового ряда и некоторых аминогликозидов в лечении инфекций, вызванных этим возбудителем [5].

**Цель исследования:** изучить видовой состав микроорганизмов и их резистентность к антибиотикам у пациентов с термическими травмами по результатам ежедневного исследования микрофлоры ожоговых ран.

**Материалы и методы** исследования. Изучен видовой состав микроорганизмов, изолированных из ожоговых ран 638 пациентов в возрасте до 17 лет, находившихся на стационарном лечении в Белорусском республиканском ожоговом центре (РОЦ). Забор биологического материала из ран для микробиологического исследования осуществлялся медицинскими работниками РОЦ в процессе выполнения перевязок или хирургических операций. В динамике от момента получения термической травмы до момента эпителизации ожоговых ран проведено 1491 микробиологическое исследование. При идентификации микроорганизмов использовали микробиологический анализатор mini Api, VITEK 2 Compact. Устойчивость бактерий к антибиотикам определяли с помощью дискодиффузионного мето-

да и автоматического бактериологического анализатора VITEK 2 Compact. Микробиологические исследования выполнены в лаборатории ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии» и лаборатории кафедры эпидемиологии и микробиологии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования». При статистической обработке рассчитывались относительные показатели частоты и структуры изучаемых явлений (P) со статистической ошибкой (Sp).

**Результаты и их обсуждение.** Из 1491 микробиологического исследования ожоговых ран микроорганизмы выделены в 838 (56,2±1,3%). При ежедневном обследовании ран с первого по десятый день нахождения пациентов в стационаре, частота обнаружения микроорганизмов изменялась незначительно. Так, если в 1-е сутки из 152 исследований бактерии обнаружены в 105 (69,1±3,8%), то на 2-е сутки — в 59,9±3,6%, на 3-и — в 58,5±3,8%, на 4-е — в 58,9±4,5%, на 5-е — в 48,1±4,9%, на 6-е — в 51,1±5,2%, на 7-е — в 60,2±4,9%, на 8-е — в 46,6±5,3%, на 9-е — в 45,2±5,8%, на 10-е — в 46,4±6,7%. Практически на том же уровне осталась частота положительных находок бактерий и в более поздние сроки, составив на 11—20-е сутки 54,5±3,0%, на 21—30-е — 58,6±5,1%. В целом, при определении тренда частоты контаминации раны микроорганизмами установлено, что при среднем показателе 56,2% за анализируемый временной период ежедневное снижение отмечалось всего лишь на 0,54%. Следовательно, термическая рана вплоть до полной эпителизации остается заселенной гноеродной микрофлорой.

Из 838 штаммов микроорганизмов, изолированных из ожоговых ран детей, подавляющее большинство (562 штамма или 67,1±1,6%) составили бактерии рода *Staphylococcus*, среди которых преобладали *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* (30,2±1,6% и 29,5±1,6%, соответственно;  $p \geq 0,05$ ). На втором месте по частоте обнаружения находились неферментирующие грамотрицательные бактерии вида *Acinetobacter baumannii* (93 штамма или 11,1±1,0%). Роль других микроорганизмов в контаминации ожоговой раны была менее значимой (табл. 1).

Таблица 1 — Видовой состав микроорганизмов, изолированных из ожоговых ран детей

Вид микроорганизмов	Частота обнаружения	
	абс.	%, (P ± SP)
Грамположительные кокки:		
<i>Staphylococcus aureus</i>	253	30,2 ± 1,6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	247	29,5 ± 1,6
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	33	3,9 ± 0,7
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	15	1,8 ± 0,5
<i>Staphylococcus warneri</i>	7	0,8 ± 0,3
<i>Staphylococcus hominis</i>	4	0,5 ± 0,2
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2	0,2 ± 0,2
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	0,1 ± 0,1
<i>Streptococcus spp.</i>	35	4,2 ± 0,6
<i>Enterococcus spp.</i>	31	3,7 ± 0,7
Грамотрицательные палочки сем. Enterobacteriaceae:		
<i>Enterobacter spp.</i>	37	4,4 ± 0,7
<i>Klebsiella spp.</i>	11	1,3 ± 0,4
<i>Escherichia coli</i>	7	0,8 ± 0,3
<i>Proteus spp.</i>	6	0,7 ± 0,3
<i>Citrobacter freundii</i>	5	0,6 ± 0,2
<i>Serratia spp.</i>	3	0,4 ± 0,3

Неферментирующие грамотрицательные бактерии:		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	93	11,1 ± 1,0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	3	0,4 ± 0,3
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	2	0,2 ± 0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	2,4 ± 0,5
<i>Burkholderia cepacia</i>	9	1,1 ± 0,4
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5	0,6 ± 0,2
<i>Chryseomonas luteola</i>	1	0,1 ± 0,1
Грибы:		
<i>Candida spp.</i>	8	0,9 ± 0,3
<b>Всего:</b>	<b>838</b>	<b>100</b>

Проведенный ежедневный в течение 10 суток со дня возникновения термической травмы мониторинг видового состава бактерий показал, что ежедневно в раневом содержимом вегетировало от 9 до 18 видов микроорганизмов, в т.ч. в 1-е сутки — 13, на 2-е — 18, на 3-и — 14, на 4-е — 12, на 5-е — 11, на 6-е — 11, на 7-е — 17, на 8-е — 10, на 9-е — 10, на 10-е — 9. При этом в течение всего периода наблюдения в ране ежедневно обнаруживались *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus spp.* (табл. 2).

Таблица 2 — Обнаружение (отмечено знаком «+») в ране отдельных видов микроорганизмов по дням болезни

Вид микроорганизмов	Обнаружение микроорганизмов в ране на сутки после травмы											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11–20	21–30
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enerobacter spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Streptococcus spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>Klebsiella spp.</i>	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
<i>Staphylococcus warneri</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>Candida spp.</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Proteus spp.</i>	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Serratia spp.</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus hominis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus simulans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chryseomonas luteola</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

По результатам ежедневного мониторинга также установлено, что в этиологической структуре преобладали *S. aureus* и *S. epidermidis*, частота обнаружения которых была практически одинаковой (табл. 3).

Таблица 3 – Доля (%) *S. aureus* и *S. epidermidis*, изолированных из ожоговых ран по результатам ежедневного в течение 10 сут. микробиологического мониторинга

Сутки болезни	Общее количество штаммов бактерий	В т.ч. количество штаммов абс. и % (P ± SP)		P
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	
1-е	105	25 23,8 ± 4,2	38 36,2 ± 4,7	≥ 0,05
2-е	112	40 35,7 ± 4,5	32 23,8 ± 4,2	≥ 0,05
3-и	96	35 36,8 ± 4,9	31 32,3 ± 4,8	≥ 0,05
4-е	69	26 37,7 ± 5,8	19 27,5 ± 5,4	≥ 0,05
5-е	50	18 36,0 ± 6,8	9 18,0 ± 5,4	≤ 0,01
6-е	47	14 29,8 ± 6,7	15 31,9 ± 6,8	≥ 0,05
7-е	59	12 20,3 ± 5,2	12 20,3 ± 5,2	≥ 0,05
8-е	41	8 19,5 ± 6,2	12 29,3 ± 7,1	≥ 0,05
9-е	33	11 33,3 ± 8,2	8 24,2 ± 7,5	≥ 0,05
10-е	26	6 23,1 ± 8,3	11 42,3 ± 9,7	≥ 0,05

Следует отметить, что и в более поздние сроки (11–20 сутки) на долю *S. aureus* приходилось 28,0±3,7%, на долю *S. epidermidis* — 28,8±3,7% (p ≥ 0,05), а на 21–30 сутки — 31,5±6,3% и 33,3±6,2% соответственно (p ≥ 0,05).

По результатам определения резистентности *S. aureus* и *S. epidermidis* к антимикробным препаратам установлено, что с той или иной частотой оба вида бактерий были резистентны к 13 антибиотикам из 15 исследованных и лишь к двум препаратам (ванкомицин, линезолид) оказались чувствительны (табл. 4).

Таблица 4 — Число (абс. и%) штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*, резистентных к отдельным антибиотикам

Антибиотик	Количество штаммов (абс.)				% (P ± SP) резистентных штаммов		P
	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	
	изученных	резистентных	изученных	резистентных			
Пенициллин	243	223	240	223	91,8±1,8	92,9±1,7	≥ 0,05
Цефазолин	93	15	111	38	16,1±3,8	34,2±4,5	≤ 0,001
Цефотаксим	188	67	162	73	35,6±3,5	45,1±3,9	≥ 0,05
Оксациллин	240	77	242	114	32,1±3,0	47,1±3,2	≤ 0,001
Гентамицин	240	56	221	64	23,3±2,7	29,0±3,1	≥ 0,05
Эритромицин	216	71	213	123	32,9±3,2	57,7±3,4	≤ 0,001
Клиндамицин	202	30	173	20	14,9±2,5	11,6±2,4	≥ 0,05
Линкомицин	46	11	65	19	23,9±6,3	29,2±5,6	≥ 0,05
Левифлоксацин	187	18	205	8	9,6±2,2	3,9±1,4	≥ 0,05
Норфлоксацин	62	16	21	7	25,8±5,6	33,3±10,3	≥ 0,05
Ванкомицин	211	0	198	0	0,0	0,0	≥ 0,05
Линезолид	60	0	47	0	0,0	0,0	≥ 0,05
Тетрациклин	63	33	21	13	52,4±6,3	61,9±10,6	≥ 0,05
Рифампицин	102	17	36	1	16,7±3,7	2,8±2,7	≥ 0,05
Триметоприм/ сульфаметок- сазол	80	16	20	10	20,0±4,5	50,0±11,2	≤ 0,001

При сравнении доли резистентных штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* оказалось, что оба вида бактерий в равной степени были устойчивы к 9 препаратам (пенициллин, цефотаксим, гентамицин, клиндамицин, линкомицин, левофлоксацин, норфлоксацин, тетрациклин, рифампицин). В то же время, к цефазолину удельный вес резистентных *S. epidermidis* был достоверно выше в 2,1 раза, чем *S. aureus*, к оксациллину — в 1,5 раза, к эритромицину — 1,8 раза, к триметоприм/сульфаметоксазолу — в 2,5 раза.

Учитывая, что *S. aureus* и *S. epidermidis* при ежедневном бактериологическом обследовании ран обнаруживались постоянно, проведен сравнительный анализ доли резистентных микроорганизмов данных видов к пенициллину, оксациллину, гентамицину, эритромицину, по которым при ежедневных исследованиях получены репрезентативные статистические показатели (табл. 5).

Таблица 5 — Доля (%) резистентных к отдельным антибиотикам штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*, выделенных из ожоговых ран детей в отдельные сроки заболевания

Антибиотик	Вид стафилококков	Доля (%) резистентных бактерий, изолированных в отдельные сутки болезни		
		1–3 сутки	4–10 сутки	11–30 сутки
Пенициллин	<i>S. aureus</i>	87,4±3,4	91,4±2,9	100,0
	<i>S. epidermidis</i>	92,9±2,6	93,1±2,7	91,2±3,7
		$p \geq 0,05$	$p \geq 0,05$	$p \geq 0,05$
Оксациллин	<i>S. aureus</i>	27,1±4,5	24,5±4,4	50,9±6,6
	<i>S. epidermidis</i>	35,0±4,8	58,8±5,5	52,6±6,6
		$p \geq 0,05$	$p \leq 0,05$	$p \geq 0,05$
Гентамицин	<i>S. aureus</i>	14,6±3,6	21,4±4,1	37,5±6,5
	<i>S. epidermidis</i>	17,4±4,0	32,9±5,4	41,8±6,7
		$p \geq 0,05$	$p \geq 0,05$	$p \geq 0,05$
Эритромицин	<i>S. aureus</i>	28,9±5,0	28,7±4,9	47,8±7,4
	<i>S. epidermidis</i>	58,3±5,4	53,2±5,7	64,7±6,7
		$p \leq 0,05$	$p \leq 0,05$	$p \geq 0,05$

По результатам исследований установлено, что по спектру устойчивости к пенициллину и гентамицину *S. aureus* и *S. epidermidis* не отличались. Что касается оксациллина, то среди *S. epidermidis*, выделенных из ран на 4–10 сутки, доля резистентных бактерий была достоверно большей, чем среди *S. aureus*, а к эритромицину число устойчивых штаммов *S. epidermidis* превышало удельный вес резистентных *S. aureus* на 1–3 и 4–10 сутки.

Результаты определения резистентности к антибиотикам *A. baumannii*, изолированные из ожоговых ран детей в РОЦ, показали, что выделенные штаммы микроорганизмов с той или иной частотой были устойчивы к большинству препаратов, используемых в клинической практике. Так, среди штаммов *A. baumannii* больше всего резистентных оказалось к препаратам из группы β-лактамовых антибиотиков, в частности, к цефотаксиму (82,4±4,1%) и цефтазидиму (75,6±4,6%), почти половина — к пиперациллину (46,7±6,4%). Следует отметить, что в 75,0±6,0% случаев *A. baumannii* оказались устойчивыми к амоксициллину, содержащему в качестве ингибитора клавулановую кислоту. К ампициллину, в состав которого в качестве ингибитора β-лактамаз входит сульбактам, количество резистентных штаммов оказалось в 3,5 раза меньшим (21,3±6,0%;  $p \leq 0,001$ ). Кроме того, для указанных бактерий характерной была высокая резистентность к триметоприм/сульфаметоксазолу, гентамицину, ципрофлоксацину, норфлоксацину. К тетрациклину устойчивыми оказались все исследованные штаммы. Меньше всего резистентных бактерий (5,7%) было к имипенему, в то время как к меропенему резистентными оказались 17,5% штаммов *A. baumannii*.

### **Выводы:**

Частота обнаружения микроорганизмов в ожоговой ране детей составляет в среднем 56,2% с преобладанием *S. aureus*, *S. epidermidis* и, несколько реже — *A. baumannii*.

Выделенные бактерии с той или иной частотой были резистентны к изученным антибиотикам, при этом *S. Aureus* и *S. epidermidis* оказались чувствительными только к двум препаратам (ванкомицин, линезолид) из 15 исследованных, а для элиминации *A. baumannii* единственным эффективным средством является только имипенем с самым низким удельным весом резистентных штаммов (5,7%).

Установлено, что в динамике течения раневого процесса резистентность штаммов доминирующих штаммов стафилококков к отдельным антибиотикам была различной. Так среди *S. epidermidis*, по сравнению с *S. aureus*, наблюдалась большая доля резистентных штаммов к оксациллину к 4–10 суткам пребывания в стационаре, а к эритромицину уже к 1–3 суткам, что следует учитывать при назначении и коррекции антибактериального лечения.

### **Литература**

1. Актуальные вопросы комбустиологии, пластической хирургии и лечения ран: материалы науч.-практ. конф. – Донецк: «Донбасс», 2011. – 264 с.
2. Внутрибольничные инфекции: пер. с англ. / под ред. Р.П. Венцеля. – Изд. 2-е. – М.: Медицина, 2004. – 840 с.
3. Алексеев, А.А Ожоговая инфекция. Этиология, патогенез, диагностика, профилактика и лечение: монография / А.А. Алексеев, М.Г. Крутиков, В.П. Яковлев. – М.: Вузовская книга, 2010. – 416 с.
4. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus* spp., выделенных в ожоговом центре в 2002-2008 гг. / Е.В. Сабирова [и др.] // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 77-81.
5. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России / Г.К. Решедько [и др.] // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер.– 2008. – Т. 10, № 2. – С. 163-179.

Поступила 20.08.2012

## **SPECIES COMPOSITION AND RESISTANCE TO ANTIBIOTICS OF BURN WOUNDS MICROFLORA IN CHILDREN**

**Hanenko O.N.<sup>1</sup>, Tonko O.V.<sup>1</sup>, Levshina N.N.<sup>2</sup>, Rimzha M.I.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education;*

<sup>2</sup>*Minsk City Center for Hygiene and Epidemiology;*

<sup>3</sup>*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

The species composition of 838 microorganisms strains isolated from burn wounds of children have been investigated, and resistance to antibiotics of most frequently detected bacterial species have been determined.

**Keywords:** burns, children, microflora, antibiotic resistance.

## **КОМПЛЕКСНАЯ АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ И ДРУГИХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Шилин В.Е., Окулич В.К., Чередняк А.Н., Мацкевич Е.Л.**

*Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь*

**Резюме.** Работа выполнена в учреждении образования «Витебский государственный медицинский университет» на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории и кафедры клинической микробиологии в рамках задании «Разработать тест-системы для автоматической идентификации и определения чувствительности к антибактериальным препаратам наиболее значимых возбудителей хирургической инфекции». Предметом

исследования являлись методики, позволяющие проводить видовую идентификацию энтеробактерий и других грамотрицательных микроорганизмов по их биохимическим свойствам и определению чувствительности грамотрицательных микроорганизмов к антибиотикам.

**Ключевые слова:** тест-системы, грамотрицательные микроорганизмы, гнойно-септические инфекции, идентификация, антибиотики.

**Введение.** Грамотрицательные микроорганизмы имеют наибольшую значимость как ведущие возбудители острых кишечных инфекций (дизентерии, сальмонеллеза, брюшного тифа и паратифов, эшерихиозов, псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза), чумы, оппортунистических и госпитальных инфекций [1].

Несмотря на существенную этиологическую роль грамположительных бактерий, большую клиническую значимость в развитии гнойно-септических инфекций приобрели микроорганизмы, принадлежащие к семейству *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonas*. Среди энтеробактерий наиболее частыми возбудителями гнойно-септических инфекций являются *Enterobacter liquefaciens* (58,4%), *Klebsiella* (56,4%), *Enterobacter cloacae* (51,1%), *Enterobacter aerogenes* (45,5%), *Citrobacter* (35,6%), *Escherichia coli* (10,8%), *Serratia* (9,9%), *Erwinia* (9,9%), *Hafnia* (6,9%) и *Proteus* (1,9%) [2].

Таким образом, этиологическая структура возбудителей гнойно-септических инфекций, бактериальных кишечных инфекций достаточно разнообразна и включает возбудителей, обладающих резистентностью к ряду антибактериальных препаратов. В связи с этим важным является изучение этиологической структуры возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний и их осложнений, а также резистентности выделенной микрофлоры к антимикробным препаратам, что необходимо для разработки схем рациональной антибиотикотерапии, так как в дальнейшем это позволит оптимизировать результаты лечения больных и замедлить рост резистентности к антимикробным препаратам [2–4]. Это определяет актуальность разработки тест-систем и оборудования с программным обеспечением для идентификации грамотрицательных микроорганизмов и определения их чувствительности к антибиотикам.

**Цель исследования:** разработать комплексную автоматизированную систему идентификации и определения чувствительности к антибиотикам энтеробактерий и других грамотрицательных микроорганизмов.

**Материалы и методы.** В качестве материала для идентификации использовали хорошо изолированную колонию на чашке или чистую культуру в пробирке.

Идентификацию выделенных культур проводили на основании результатов исследования морфологических, культуральных и биохимических свойств. Для повышения достоверности результатов идентификации грамотрицательных микроорганизмов использовали коммерческие тест-системы фирмы «bioMérieux» (Франция) ID 32 E и rapid ID 32 E — для идентификации энтеробактерий. Учет осуществляли на автоматизированном биохимическом анализаторе АТВ Expression фирмы «bioMérieux» (Франция) [5]. Кроме того, идентификацию грамотрицательных микроорганизмов проводили при помощи разработанной нами тест-системы «ИД-ЭНТ».

Чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам оценивали с помощью стандартных методов: метод бумажных дисков (дискодиффузионный метод), метод серийных разведений в плотной питательной среде, метод серийного разведения антибиотика в жидкой питательной среде [6].

Для повышения достоверности результатов определения чувствительности грамотрицательных микроорганизмов к антибиотикам использовали тест-системы фирмы «bioMérieux» (Франция): АТВ PSE — для псевдомонад и rapid АТВ E — для энтеробактерий. Учет результатов производили в автоматическом режиме на биохимическом анализаторе АТВ Expression (Франция) [7]. Кроме того, чувствительность грамотрицательных ми-

кроорганизмов к антибиотикам оценивали с помощью разработанной нами тест-системы «АБ-ГРАМ (-)».

Для автоматизированного учета результатов идентификации нами создана программа «NewId». В качестве «ридера» использовали многоканальный фотометр Ф300 производства ОАО «Витязь». Измерение оптической плотности исследуемых проб проводили на семи длинах волн: 405, 450, 492, 540, 570, 620 и 690 нм. Далее, используя математический аппарат, проводили расчеты в цветовых координатных системах XYZ, RGB и Lab. При этом XYZ была базовой, RGB служила для вывода результатов на экран монитора, Lab — для анализа цвета проб.

Статистическую обработку полученных материалов производили на программированной персональной ЭВМ Pentium-III с помощью программ Microsoft Excel 2000, Statistica 6.0. Оценка статистической значимости показателей и различий рассматриваемых выборок производилась по критерию Стьюдента при уровне значимости не ниже  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Для определения видовой принадлежности грамотрицательных микроорганизмов нами разработана тест-система «ИД-ЭНТ». В качестве планшета для тест-системы использовали 96-луночный планшет для ИФА, основой которой является 96-луночный планшет для ИФА, содержащий 8 рядов по 12 лунок и позволяющий определять 4-х микроорганизмов.

В состав тест-системы было включено 24 теста для определения ферментативной активности микроорганизмов, которые можно разделить на следующие группы:

а) тесты, основанные на способности утилизировать углеводороды, включают D-маннит, D-мальтозу, адонитол, паллатинозу, D-глюкозу, D-сахарозу, L-арабинозу, D-арабит, D-трегалозу, L-рамнозу, инозит, D-целлобиозу, сорбит, ксилозу и дульцит.

б) хромогенные субстраты: 4-нитрофенил- $\beta$ D-галактопиранозид, 4-нитрофенил- $\alpha$ D-галактопиранозид, 5-бром-4-хлор-3-индолил-N-ацетил- $\beta$ D-глюкозаминид и 4-нитрофенил- $\alpha$ D-глюкопиранозид.

в) тест для определения уреазной активности.

г) тест для определения галактуронидазной способности.

д) тест на утилизацию L-арабита.

е) тест для определения способности гидролизовать малонат натрия.

ж) тест на выработку индола при ферментации L-триптофана.

На созданную тест-систему «ИД-ЭНТ» была разработана программа медицинских испытаний, которая утверждена 25.05.2011 МЗ Республики Беларусь, и проведены следующие медицинские испытания в соответствии с инструкцией по клиническим и медико-биологическим исследованиям изделий медицинского назначения и медицинской техники за №110-0903 от 30.09.2003г.; ISO 10993-1 «Biological evaluation of medical devices. Part 1. Evaluation and testing»: по параметру оценки качества и воспроизводимости в серии, по параметру диагностической специфичности. Медицинские испытания на оценку соответствия клиничко-аналитическим характеристикам были проведены на трех базах: ГУ «Витебский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», ГУ «Минский городской центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» и УЗ «9-ая городская клиническая больница» г. Минска.

Учет результатов идентификации возможен визуально или инструментально с помощью многоканального фотометра Ф300 и компьютера с программным обеспечением «NewId» (зарегистрирована в Национальном центре интеллектуальной собственности, регистрационный № 015 от 13.02.08) на основе многомерной статистики с применением кластерного анализа, разработанных совместно с производственным объединением «Витязь». Кластерный анализ позволяет на основе классификации многомерных наблюдений, каждое из которых описывается набором признаков, используя меру сходства или расстояние

между объектами учитывать все свойства бактерий одновременно. В качестве расстояния между объектами выбрано евклидово расстояние. В качестве многомерных наблюдений в программе используются данные из таблиц определителя бактерий Берджи, в которых каждый микробный вид — это отдельное наблюдение (кластер), а набор признаков (24 биологические характеристики микроорганизма) — числовые значения вероятности наличия соответствующего признака. Эти наблюдения образуют множество эталонных точек в 24-мерном пространстве. Объекты, которые по набору признаков «похожи» друг на друга, принадлежат к одному кластеру. Критерием схожести и различия кластеров является расстояние между точками в 24-мерном пространстве. Нами было идентифицировано 53 штамма с помощью разработанных нами тест-системы «ИД-ЭНТ» с программным обеспечением «NewId». Параллельно идентификация проводилась с помощью тест-систем производства «BioMerieux» с программным обеспечением на основе нумерического подхода. Полное совпадение результатов в двух программах с точностью до вида — 88%, а с точностью до рода и вида — 97%.

В результате проведенных медицинских испытаний установлено, тест-система «ИД-ЭНТ» соответствует заявленным требованиям как по параметрам оценки качества и воспроизводимости, так и диагностической специфичности по сравнению с референс-методом. Временные затраты на исследование являются преимуществом тест-системы при ее использовании в практике: идентификация занимает до 20 минут для 4 штаммов микроорганизмов, необходимое время инкубации от 18–24 часа, учет результатов 7–10 минут, что меньше, по сравнению с референс-методом.

На тест-систему «ИД-ЭНТ» ТУ ВУ 300002704.020–2011 выдано регистрационное удостоверение МЗ Республики Беларусь № ИМ-7.98583 от 02.02.2012. Государственная регистрация в БелГИСС № 035037 от 16.05.2012.

Учитывая этиологическую структуру возбудителей инфекционных заболеваний, для оценки чувствительности к антибиотикам нами разработана тест-система «АБ–ГРАМ(-)», основой которой является 96-луночный планшет для ИФА, содержащий 8 рядов по 12 лунок и позволяющий определять чувствительность 4-х микроорганизмов к 23 антибиотикам.

Набор антибиотиков в системах был разработан нами в результате проведенного исследования, которое позволило установить наиболее часто используемые препараты в Республиканском научно-практическом центре «Инфекция в хирургии» и ряде хирургических отделений лечебных учреждений Республики Беларусь: ампициллин, амоксициллин + клавуланат, цефоперазон, цефалексин, цефотаксим, цефепим, цефтазидим, имипенем, меропенем, азтреонам, цефтриаксон, азитромицин, гентамицин, нетилмицин, амикацин, моксифлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, диоксидин, ко-тримоксазол, ломефлоксацин [3].

После инкубации возможен визуальный или инструментальный учет. При визуальном учете при наличии роста в лунке, штамм является резистентным, а при отсутствии роста — чувствительным к определенному антибиотику. При отсутствии роста в контрольной лунке тест считается недействительным, и его необходимо повторить.

Инструментальный учет производился с помощью многоканального фотометра Ф300 на длине волны 620 нм и компьютера с программным обеспечением «Microbi», разработанных совместно с производственным объединением «Витязь».

На базах бактериологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии», ГУ «Витебский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», ГУ «Минский городской ЦГЭ и общественного здоровья», УЗ «Минская областная клиническая больница» нами были проведены испытания по параметру оценки качества и воспроизводимости в серии, по параметру диагностической специфичности по сравнению с методом бумажных дисков.

В результате проведенных медицинских испытаний установлено, что тест-система «АБ-ГРАМ(-)» соответствует своему назначению — определению чувствительности грамотрицательных бактерий к антибиотикам.

Временные затраты на исследование приемлемых для практического использования в бактериологических лабораториях: постановка чувствительности занимает до 17 мин для 4 штаммов микроорганизмов, необходимое время инкубации от 18 до 24 ч, учет результатов — до 6 мин, и не уступает методу бумажных дисков.

На тест-систему «АБ-ГРАМ(-)» ТУ ВУ 300002704.011–2009 выдано регистрационное удостоверение МЗ Республики Беларусь № ИМ-7.95758 от 15.09.2009. Государственная регистрация в БелГИСС № 029548 от 26.08.2010.

#### **Выводы:**

1. Разработана тест-система «ИД-ЭНТ» для идентификации энтеробактерий и других грамотрицательных микроорганизмов, включающая 24 теста на расщепление дегидрированных субстратов с добавленным индикатором и хромогенных субстратов, которые обеспечивают идентификацию энтеробактерий и других грамотрицательных микроорганизмов.

2. С целью определения чувствительности к антибиотикам грамотрицательных микроорганизмов разработана тест-система «АБ-ГРАМ(-)», которая включает 23 антибиотика, наиболее часто используемых в РНПЦ «Инфекция в хирургии» и ряде хирургических отделений лечебных учреждений Республики Беларусь, и при использовании программного обеспечения «Microbi» и спектрофотометра Ф300, может быть рекомендована в автоматическом режиме к широкому использованию в клинической практике бактериологических лабораторий для оценки резистентности бактерий.

3. Разработана и зарегистрирована в Национальном центре интеллектуальной собственности программа NewId (совместно с ОАО «Витязь»), которая позволяет создать автоматизированное рабочее место микробиолога, включающее в себя фотометр, адаптированный для анализа результатов по цвету пробы и персональный компьютер.

#### **Литература**

1. Руководство по инфекционным болезням // под ред. В.И. Покровского, К.М. Лобана. – М.: Медицина, 1996. – 464 с.
2. Федянин, С.Д. Этиология и антимикробная терапия хирургической инфекции / С.Д. Федянин, В.К. Окулич, Д.Г. Сосинович // Теоретические и практические вопросы медицины и фармации: материалы конф. студентов и молодых ученых. – Витебск, 2000. – С. 181-183.
3. Антибактериальная терапия в гнойной хирургии: руководство / Под ред. А.Н. Косинца. – Витебск: ВГМУ, 2002. – 600 с.
4. Конопелько, Е.А. Рациональные подходы к выбору антибиотиков с учетом минимальных подавляющих концентраций для лечения хирургических инфекций, вызываемых энтеробактериями / Е.А. Конопелько // Студенческая медицинская наука 21 века: материалы 6-й междунар. науч.-практ. конф. – Витебск, 2006. – С. 28-30.
5. Monnet, D. Evaluation of semi-automated 24 hour commercial system for identification of Enterobacteriaceae and other gram-negative bacteria / D. Monnet, D. Lafay // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1994. – Vol. 13. – P. 424-430.
6. Бойцов, А.Г. **Введение** в клиническую микробиологию / А.Г. Бойцов, В.П. Иванов, О.Н. Ластовка / СПбГМА им. И.И. Мечникова. – СПб., 1999. – 152 с.
7. Croize, J. Evaluation of a new miniaturized and automated system / J. Croize, M. Desmonceaux // Amer. Soc. Microbiol. 93rd Ann. Meet., May 16-20, Atlanta, GA: abstr. book. – P. 302.

Поступила 24.07.2012

## COMPLEX AUTOMATED SYSTEM FOR IDENTIFICATION AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY DETERMINATION OF ENTEROBACTERIA AND OTHER GRAM-NEGATIVE MICROORGANISMS

Shilin V.E., Okulich V.K., Charadniak A.N., Machevich E.L.

*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus*

Work was carried out in Vitebsk State Medical University on the basis of the Central Research Laboratory and the Department of Clinical Microbiology in the framework of task «To develop test systems for automatic identification and determination of sensitivity to antibacterial preparations of the most significant causative agents of a surgical infection». The subject of the research was the techniques allowing to spend specific identification of enterobacteria and other gram-negative microorganisms on their biochemical properties and determination of sensitivity of gram-negative microorganisms to antibiotics.

**Keywords:** test systems, gram-negative, microorganisms, pyoinflammatory diseases, identification, antibiotics.

## ПОЛУЧЕНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ НУКЛЕОКАПСИДНЫЙ БЕЛОК ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА В ПЕРМИССИВНОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК *E. COLI*

Счесленок Е.П., Семижон П.А., Школина Т.В., Фомина Е.Г.,  
Винокурова Н.В., Карпенко Г.А., Владыко А.С.

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Сконструирована на основе вектора рJC40 рекомбинантная плазмида, содержащая вставку нуклеотидной последовательности, соответствующей гену нуклеокапсидного белка вируса Западного Нила, выделенного в Республике Беларусь. Подтверждена специфичность вставки рестрикционным анализом и методом секвенирования. Экспрессирован рекомбинантный полипептид вируса в бактериальных клетках *E. coli*, штамм BL 21 (DE3).

**Ключевые слова:** Вирус Западного Нила, специфичность амплифицированного фрагмента ДНК, экспрессирующая плазмида, рекомбинантный белок.

**Введение.** Вирус Западного Нила (ЗН) — РНК-геномный вирус рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*, является возбудителем лихорадки Западного Нила (синонимы: западно-нильский энцефалит, энцефалит Западного Нила, *Encephalitis Nili occidentalis*) [1]. По антигенной структуре и биологическим свойствам вирус ЗН близок к вирусам японского энцефалита, лихорадки денге, желтой лихорадки, клещевого энцефалита. Лихорадка Западного Нила — острое зоонозное трансмиссивное вирусное заболевание, отличающееся значительным клиническим полиморфизмом и протекающее в виде нейроинфекционной, экзантематозной и гриппоподобной форм [2]. Резервуаром и источниками инфекции являются дикие и домашние птицы, грызуны, летучие мыши, комары, клещи; переносчиками заболевания — комары различных родов — *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* и др., а также аргасовые и иксодовые клещи [3–5]. В настоящее время вирус ЗН широко распространен в большинстве стран Африки, а также в странах европейского Средиземноморья, Ближнего Востока, Средней Азии, на Кавказе, Индийском субконтиненте, в Индонезии, Малайзии, Таиланде и других тропических государствах. Доказано существование природных очагов заболевания в южных регионах бывшего СССР — Армении, Туркмении, Таджикистане, Азербайджане, Казахстане, Молдавии, Астраханской, Одесской, Омской областях Российской Федерации и др. На территории Беларуси также выявлена циркуляция вируса ЗН, обнаружены антитела к

вирусу в сыворотках крови людей и животных, выявлен антиген вируса в комарах, мошках и клещах, изолированы штаммы вируса ЗН от птиц, кровососущих комаров и больных людей [6]. Впервые в республике вирус ЗН был выделен и идентифицирован Т.И. Самойловой (штамм 48-ЗН «Тремля») в 1985 г. из внутренних органов скворцов, добытых на весеннем пролете вдоль искусственных прудов рыбхоза «Тремля» Петриковского района, Гомельской области [7]. С 1990-х гг. и до настоящего времени, наиболее характерным проявлением ЗН-инфекции в Европе, на Ближнем Востоке и в Соединенных Штатах являлся энцефалит, что наводит на мысль о появлении более нейровирулентных штаммов [8]. Вспышки вызванных вирусом ЗН заболеваний, часто сопровождающихся нарушениями ЦНС и летальными исходами, могут возникать после длительных периодов затишья, что свидетельствует о важности непрерывного эпиднадзора за этим вирусом. Лабораторная диагностика остается одним из важных инструментов, направленных на решение задач по противоэпидемической защите, своевременному выявлению и лечению всех инфекционных заболеваний и, в частности, лихорадки Западного Нила. В настоящее время метод иммуноферментного анализа (ИФА) широко используется для диагностики Западно-Нильской инфекции. При разработке иммунодиагностических препаратов к патогенным вирусам большое значение придается использованию биотехнологических методов, позволяющих получать антигены искусственным путем, что исключает необходимость работы с контагиозным возбудителем, является экономически более выгодным и технологичным.

**Цель исследования:** конструирование рекомбинантой плазмиды, содержащей вставку нуклеотидной последовательности, соответствующей гену нуклеокапсидного белка (NP) вируса ЗН, и экспрессия NP-белка в пермиссивной линии клеток *E. coli*.

**Материалы и методы** исследования. В работе использовали вирус ЗН, штамм 48-ЗН «Тремля», полученный из специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Топологический анализ аминокислотной последовательности нуклеокапсидного белка вируса ЗН был проведен с использованием авторской компьютерной программы wxGeneVec. За основу в данной программе взяты шкалы гидрофобности и гидрофильности, предложенные Hopp and Woods (1981) и Kyte and Doolittle (1982), в критерии оценки входят такие параметры, как растворимость, заряд, удаленность от NC-остова, наличие спиралей, наличие сульфгидрильных остатков.

Выделение вирусной РНК. В качестве исходного материала для выделения РНК ЗН была использована вирусосодержащая культуральная жидкость. Выделение РНК осуществляли с помощью коммерческого набора реагентов NucleoSpin RNA (MACHERY-Nagel) согласно прилагаемой инструкции.

Олигонуклеотидные последовательности для амплификации фрагмента ДНК, кодирующего NP-белок вируса ЗН:

WN dir.: 5' — CGCGAAGCTTATGTCTAAGAAACCA- 3' (Hind III) — 97 по 111 н.о.

WN rev.: 5' — GCGCGGATCCTCTTTGTTTTGAGCT- 3' (BamH I) — 397 по 405

Постановка реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Постановку реакции обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов «Реверта-Л», производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Российская Федерация), согласно прилагаемой инструкции. Полученную комплементарную ДНК (кДНК) использовали для постановки ПЦР. Состав реакционной смеси: по 25 пмолей праймеров WN dir., WN rev., 5 мкл 10x Taq-буфера (Fermentas, Литва), 4 мкл 25mM MgCl<sub>2</sub>, 1 мкл дНТФ (10 mM каждого), 10 мкл ОТ-продукта (кДНК), 2,5 ед. Taq-полимеразы (Fermentas, Литва), деионизованной воды до конечного объема 50 мкл. Режим амплификации: 94 °C — 2 мин; 94 °C — 15 с, 55 °C — 45 с, 72 °C — 1 мин, количество циклов — 35.

Анализ фрагментов ДНК, синтезированных в ПЦР, проводили электрофорезом в 1,5% агарозном геле. Электрофорез вели при напряжении тока 10 в/см в трис-ацетатном буфере, рН 8,0, в течение 25–35 мин. Визуализацию ДНК осуществляли с помощью окрашивания геля бромистым этидием с последующим просмотром в УФ.

Лигирование фрагментов ДНК проводили в объеме 20 мкл при температуре +22 °С в течение часа. В качестве лигирующего фермента использовали T4 DNA Ligase (Fermentas, Литва) согласно прилагаемой инструкции.

Подготовку компетентной клеточной культуры, трансформацию клеток плазмидной ДНК проводили согласно методикам, описанным ранее [9].

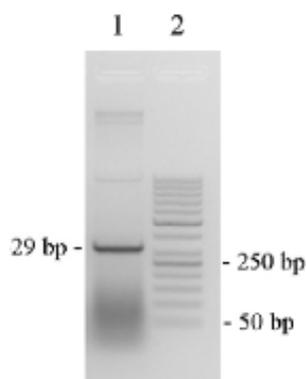
Электрофоретический анализ в полиакриламидном геле осуществляли по Laemmli [10].

Выделение рекомбинантной плазмидной ДНК осуществляли с использованием набора реагентов QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) согласно прилагаемой инструкции.

Рестрикцию рекомбинантной ДНК проводили при 37 °С в течение 2 час соответствующими ферментами рестрикции по 1 U каждого в конечном объеме 20 мкл. После инкубации ферменты рестрикции инактивировали в течение 15 мин при 65 °С.

Секвенирование фрагмента ДНК, кодирующего нуклеокапсидный белок ЗН в составе гибридной плазмиды, проводили с использованием пары праймеров SeqSense pJC40: 5'-AAGGAGATATACCATGGGC-3'- прямой и SeqAntisense pJC40: 5'-CCCAAGGGGTTATGCTAGT-3'- обратный и набора «GenomeLab DTS Quik Start Kit» (Beckman Coulter, США) согласно прилагаемой инструкции. Электрофорез и анализ продуктов реакции осуществляли на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе Beckman Coulter «SEQ 8000» (Beckman Coulter, США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы MEGA 4,0.

**Результаты и их обсуждение.** С целью конструирования рекомбинантной плазмиды были подобраны специфические праймеры для амплификации в ОТ-ПЦР на матрице РНК вируса ЗН фрагмента ДНК, представляющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полноразмерный NP-белок. В своем составе праймеры содержали сайты узнавания для специфических рестриктирующих эндонуклеаз Hind III (AAGCTT) и BamHI (GGATCC), необходимые для последующего клонирования фрагмента в полилинкер плазмидного вектора. Размер амплифицированного кДНК-фрагмента составлял 329 п.о. (309 п.о. — собственно фрагмент, кодирующий нуклеокапсидный белок вируса ЗН; праймеры ограничивают последовательность с 97 по 405 нуклеотидное основание). На рисунке 1 представлен электрофоретический анализ продуктов амплификации в 1,5% агарозном геле.

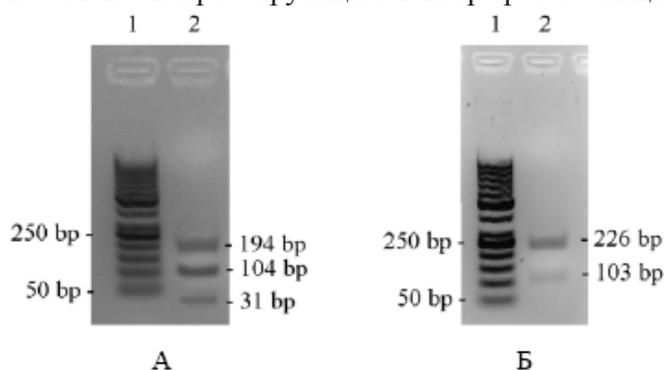


Дорожки: 1 — амплифицированный фрагмент; 2 — ДНК-маркер GeneRuler 50 bp DNA ladder

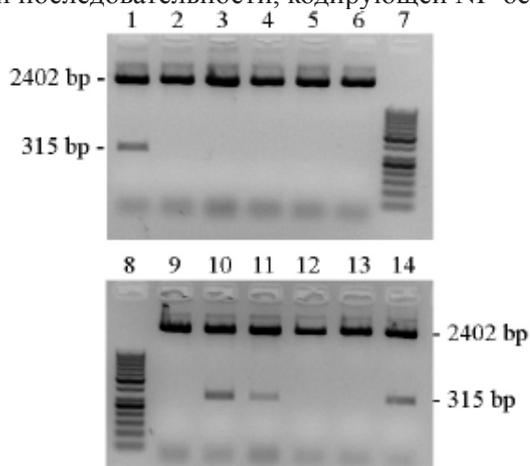
Рисунок 1 — Электрофоретический анализ продукта амплификации, соответствующего нуклеотидной последовательности кодирующей NP-белок вируса ЗН

Оценку специфичности полученного кДНК-фрагмента осуществляли методом рестрикционного анализа по уникальным сайтам узнавания для специфических рестриктаз (рисунок 2). Из рисунка видно, что в результате гидролиза рестриктазой Hinc II последовательность кДНК-фрагмента расщеплялась на два специфических участка ДНК размером 226 п.о. и 103 п.о. и рестриктазой Nae III — на три: 31 п.о., 104 п.о. и 194 п.о. Полученные данные согласуются с данными теоретических расчетов и обусловлены наличием сайтов узнавания для соответствующих рестриктирующих эндонуклеаз в полученной нами ДНК-последовательности.

Для создания гибридного плазмидного вектора, способного обеспечить экспрессию рекомбинантного полипептида, полученный ДНК-фрагмент и исходный вектор рЈС40 [11] были последовательно обработаны рестриктирующими эндонуклеазами Hind III и BamHI и лигированы. Полученной лигазной смесью были трансформированы компетентные клетки *E. coli*, штамм Dh5 $\alpha$ . Клетки выращивали на твердой селективной питательной среде, содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл. После инкубации в течение ночи при 37 °С отдельные колонии клеток рассеивали штрихом и выращивали при тех же условиях. Дальнейшее выделение рекомбинантной плазмидной ДНК и последующая ее обработка соответствующими рестриктазами позволили произвести селекцию клеточных клонов, несущих гибридную плазмиду (рисунок 3). Из рисунка видно, что из 12 проанализированных клонов четыре содержали рекомбинантную плазмидную ДНК. В результате проведенного рестрикционного картирования было подтверждено наличие в составе экспрессирующего вектора рЈС40 специфической вставки.



Дорожки: 1 (А,Б) — ДНК-маркер GeneRuler 50 bp DNA ladder, 2 А — фрагменты рестрикции после обработки рестриктазой Nae III; 2 Б — фрагменты рестрикции после обработки рестриктазой Hinc II  
Рисунок 2 — Оценка специфичности фрагмента ДНК, соответствующего нуклеотидной последовательности, кодирующей NP-белок вируса ЗН



Дорожки: 1–6, 9–14 — плазмидная ДНК, обработанная эндонуклеазами Hind III и BamHI; 7,8 — ДНК-маркер GeneRuler 50 bp DNA ladder

Рисунок 3 — Рестрикционный анализ рекомбинантных плазмидных ДНК

Оценку специфичности вставки проводили методом секвенирования в составе гибридной плазмиды. Компьютерный анализ последовательности осуществляли с помощью программы MEGA 4.0, для сравнения с имеющимися последовательностями в базе данных GenBank использовали интернет-программу BLAST. Данные анализа нуклеотидных последовательностей представлены на рисунке 4. Из рисунка видно, что последовательность κДНК-фрагмента, представляющего последовательность гена NP-белка вируса ЗН, на 99% соответствует нуклеотидной последовательности 10 референс-штаммов, представленных в базе данных.

Accession	Description	Max ident
AY532665.1	West Nile virus strain B956 polyprotein gene, complete genome	99%
DQ318019.1	West Nile virus strain ArD76104, complete genome	99%
M12294.2	West Nile virus RNA, complete genome	99%
JN858070.1	West Nile virus isolate Italy/2011/AN-2, complete genome	99%
HQ537483.1	West Nile virus isolate Nea Santa-Greece-2010, complete genome	99%
DQ116961.1	West Nile virus isolate goshawk-Hungary/04, complete genome	99%
EF429200.1	West Nile virus H442, complete genome	99%
EF429198.1	West Nile virus SA93/01, complete genome	99%
EF429197.1	West Nile virus SPU116/89, complete genome	99%
EU068667.1	West Nile virus isolate SPU116-89 polyprotein gene, complete	99%

Program: BLASTN 2.2.26+

```

gb|AY532665.1| West Nile virus strain B956 polyprotein gene, complete
genome
Length=11038
Score = 562 bits (304), Expect = 5e-157
Identities = 306/307 (99%), Gaps = 0/307 (0%)
Strand=Plus/Plus

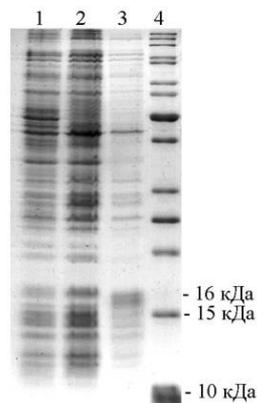
Query 1   ATGCTAAGAAACCAGGAGGCCCGGTAAAAACCGGGCTGTCAATATGCTAAAAACGGCGT 60
          |||
Sbjct 97   ATGCTAAGAAACCAGGAGGCCCGGTAAAAACCGGGCTGTCAATATGCTAAAAACGGCGT 156
Query 61   ATGCCCGCGGATTGCTCTTGATAGGACTAAAGAGGGCTATGCTGAGTCTGATTGACGGG 120
          |||
Sbjct 157  ATGCCCGCGGATTGCTCTTGATAGGACTAAAGAGGGCTATGCTGAGTCTGATTGACGGG 216
          |||
Query 121  AAGGGCCCAATACGTTTCGTGTGGCTCTTTGGCGTTTTTCAGATTCACTGCAATCGCT 180
          |||
Sbjct 217  AAGGGCCCAATACGTTTCGTGTGGCTCTTTGGCGTTTTTCAGATTCACTGCAATCGCT 276
Query 181  CCGACTCGTGGCTGCTGGACAGATGGAGAGCCGTCAACAACAACAACAGCGATGAAGCAT 240
          |||
Sbjct 277  CCGACTCGTGGCTGCTGGACAGATGGAGAGCCGTCAACAACAACAACAGCGATGAAGCAT 336
Query 241  CTCTTGAGTTTCAAGAAGAAGTCTGAACTCTGACCACTGCCATCAACCGCCGGAGCTCA 300
          |||
Sbjct 337  CTCTTGAGTTTCAAGAAGAAGTCTGAACTCTGACCACTGCCATCAACCGCCGGAGCTCA 396
Query 301  AAACAAA 307
          |||
Sbjct 397  AAACAAA 403

```

Рисунок 4 — Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена NP-белка вируса ЗН, встроенного в плазмидную ДНК экспрессирующего вектора рJC40

На последующих этапах исследования полученной гибридной плазмидой рJC40/NPWN были трансформированы перmissive компетентные клетки *E. coli*, штамм BL21(DE3). Для экспрессии рекомбинантного полипептида трансформанты выращивали на жидкой питательной среде, содержащей 0,2% глюкозы и 50 мкг/мл ампициллина, в момент достижения бактериальной культурой оптической плотности  $OD_{600}=0,3$  осуществляли индукцию биосинтеза рекомбинантного полипептида путем внесения в среду изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид (IPTG) до конечной

концентрации 0,4 мМ, после чего клетки инкубировали еще в течение 3,5 часов. Клетки осаждали центрифугированием и обрабатывали лизирующим буфером. Уровень экспрессии рекомбинантного полипептида оценивали электрофорезом в 15% полиакриламидном геле (рисунок 5). Из рисунка видно, что по сравнению с контрольным образцом, в качестве которого использовался лизат бактериальных клеток (дорожки 1, 2), в лизате клеток, содержащих рекомбинантную плазмиду рJC40/NPWN, наблюдается экспрессия полипептида с рассчитанной молекулярной массой 16 кДа (дорожка 3).



Дорожки: 1,2 — лизат бактериальных клеток *E. coli*, штамм BL21; 3 — лизат бактериальных клеток *E. coli*, штамм BL21, экспрессирующих рекомбинантный полипептид вируса ЗН; 4 — маркерные белки

Рисунок 5 — Анализ экспрессии рекомбинантной плазмиды рJC40/NPWN

**Заключение.** С использованием методов молекулярного клонирования получена рекомбинантная плаزمида рJC40/NPWN, экспрессирующая в бактериальных клетках *E. coli*, штамм BL 21 (DE3), нуклеокапсидный белок вируса Западного Нила, выделенного в Республике Беларусь. В дальнейшем будет проведен анализ антигенной активности полученного рекомбинантного полипептида и оценена возможность использования его в качестве антигена в диагностических тест-системах (ИФА, иммуноблоттинг, дот-иммуноанализ).

Авторы статьи выражают благодарность руководителю лаборатории диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций РНПЦ эпидемиологии и микробиологии д-ру мед. наук В.Ф. Еремину за оказание технической помощи при секвенировании последовательности гена, кодирующего NP-белок вируса Западного Нила.

#### Литература

1. Венгеров, Ю.А. Лихорадка Западного Нила / Ю.А. Венгеров, А.Е. Платонов // Леч. врач. – 2000. – № 10. – С. 56-60.
2. Львов, Д.К. Лихорадка Западного Нила / Д.К. Львов // Вопр. вирусол. – 2000. – № 2. – С. 4-9.
3. Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes / S. Baqar [et al.] // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1993. – Vol. 48, № 6. – P. 757-762.
4. Hubalek, Z. West Nile fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe / Z. Hubalek, J. Halouzka // Emerg. Infect. Dis. – 1999. – Vol. 5, № 5. – P. 643-650.
5. Savage, H.M. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996 with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes / H.M. Savage // Amer. J. Trop. Med. Hyg. – 1999. – Vol. 61. – P. 600-611.
6. Samoilo, T.I. Virologic and serologic investigations of West Nile virus circulation in Belarus / T.I. Samoilo, V.I. Votiakov, L.P. Titov // Cent. Eur. J. Publ. Health. – 2003. – Vol. 11, № 2. – P. 55-62.
7. Изоляция, антигенные свойства и биологическая характеристика вируса Западного Нила в Беларуси / Т.И. Самойлова [и др.] // Профилактика и лечение инфекционных и паразитарных заболеваний: материалы юбил. конф. БелНИИ-ЭМ. – Минск: Наука і тэхніка, 1995. – С. 116-121.
8. Johnson, R. West Nile virus encephalitis in the United States / R.T. Johnson, D.N. Irani // Curr. Neurol. Neurosci. Rep. – 2002. – Vol. 2, № 6. – P. 496-500.
9. Антигенные свойства рекомбинантного полипептида, содержащего повторы антигенной детерминанты нуклеокапсидного белка вируса гепатита С / П.А. Семижон [и др.] // Здравоохранение. – 2006. – № 11. – С. 35-37.
10. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.

Поступила 11.07.2012

## CONSTRUCTION OF GENE ENGINEERING PLASMID PRODUCING WEST NILE VIRUS NUCLEOCAPSID PROTEIN IN THE *E. COLI* PERMISSIVE CELL LINE

Scheslenok E.P., Semizhon P.A., Shkolina T.V., Fomina E.G.,  
Vinokurova N.V., Karpenko A.G., Vladyko A.S.

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

The research result obtained was recombinant plasmid with the insertion of gene encoding the nucleocapsid protein of West Nile virus. As an expressing vector pJC40 plasmid was used. As a matrix the virus strain 48-WN Tremlya isolated from birds in the Republic of Belarus was used. The specificity of the gene insertion was detected by the restriction analysis and sequencing methods. The virus recombinant polypeptide with a molecular weight of approximately 16 kDa was expressed in the *E. coli* BL 21 (DE3) cell line.

**Keywords:** West Nile virus, recombinant plasmid, nucleocapsid protein, expression, *E. coli*, cell line.

## БИОСОВМЕСТИМЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПОКРЫТИЯ С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Тапальский Д.В.<sup>1</sup>, Бойцова Н.Ю.<sup>1</sup>, Ярмоленко М.А.<sup>2</sup>, Рогачев А.А.<sup>2</sup>, Ситник А.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Гомельский государственный медицинский университет, Гомель;

<sup>2</sup>Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, Гомель;  
<sup>3</sup>ЗРНИЦ травматологии и ортопедии, Минск, Беларусь

**Резюме.** Синтезировано 14 типов комплексных покрытий на основе стабильных и биоразлагаемых полимеров и их смесей, нитрата серебра, хлорида серебра и ципрофлоксацина. Проведена оценка выраженности и продолжительности по времени бактерицидного эффекта в отношении тест-культур микроорганизмов. Выявлен пролонгированный антибактериальный эффект для большинства антибактериальных покрытий, наиболее длительный и выраженный для комплексных покрытий, содержащих ципрофлоксацин. С помощью масс-спектрометрического определения концентраций серебра в модельной среде показано, что скорость высвобождения наночастиц металла из полимерной матрицы увеличивается при использовании биодеструктурируемых полимерных материалов.

**Ключевые слова:** наночастицы, серебро, полимеры, антибактериальные покрытия.

**Введение.** Развивающаяся на поверхности имплантатов, используемых в травматологии и ортопедии (металл, полиэтилен, костный цемент), иммунная реакция на чужеродный материал, а также способность микроорганизмов к комплексной колонизации с образованием полисахаридного матрикса — биопленки, ингибирующей фагоцитоз и значительно снижающей эффективность антибиотиков, способствуют повышению риска развития инфекционных осложнений.

Другой особенностью оперативной травматологии и ортопедии с применением имплантатов является отсроченная манифестация инфекций области хирургического вмешательства, которые могут дебютировать спустя несколько месяцев и даже лет после операции. Так, глубокая инфекция в кости поддерживается за счет наличия деваскуляризованного кортикального слоя, окруженного бактериями. Существование инфицированных, нежизнеспособных тканей, в анаэробных условиях контактирующих с металлическим имплантатом, неэффективной реакции макроорганизма, а также

неадекватное лечение приводят к хронизации процесса, появлению различных осложнений, удлинению сроков лечения и нередко к повторным оперативным вмешательствам.

Одним из вариантов решения данных проблем является нанесение на ортопедические (травматологические) имплантаты специальных покрытий, обеспечивающих локальное длительное по времени высвобождение антибактериальных веществ в непосредственной близости от имплантата. Таким образом, имплантат становится биологической системой с программируемым высвобождением активных веществ. При этом техника установки имплантата не отличается от традиционной, и в то же время обеспечивается локальное высвобождение действующего вещества с достижением высоких концентраций в зоне потенциального очага воспаления или в зоне уже развившейся инфекции без возникновения системных реакций. Важным требованием является программируемая длительность и активность высвобождения активного вещества, которые должны препятствовать возникновению устойчивых штаммов бактерий.

**Цель исследования:** определить оптимальные технические параметры нанокomпозиционных покрытий и изучить кинетические характеристики вымывания антибактериальных компонентов из них.

**Материалы и методы.** Методом электронно-лучевого осаждения из активной газовой фазы сформированы композиционные покрытия, содержащие наночастицы серебра, изучены их структура и морфология. Ранее было показано, что подобные нанокomпозиционные слои представляют собой полимерную матрицу с распределенными внутри нее частицами серебра со средним размером около 20 нм. Покрытия были нанесены на отрезки стерильной марли размером 150x150 мм и на титановые пластины размером 50x50 мм, толщиной 1 мм, материал — титан ВТ1-0. Состав антибактериальных покрытий приведен в табл. 1.

Таблица 1 — Состав полимерных композиционных антибактериальных покрытий

Обозначение	Состав покрытия
AgNO <sub>3</sub> – ПУ	нанокomпозиционное покрытие на основе нитрата серебра и полиуретана, с массовым соотношением компонент в исходной смеси 1:1
AgNO <sub>3</sub> – ПА-6	нанокomпозиционное покрытие на основе нитрата серебра и полиамида-6 (1:1)
AgNO <sub>3</sub> – ПЭ	нанокomпозиционное покрытие на основе нитрата серебра и полиэтилена (1:1)
AgNO <sub>3</sub> – ПТФЭ	нанокomпозиционное покрытие на основе нитрата серебра и политетрафторэтилена (1:1)
AgNO <sub>3</sub> – ПЛ1	нанокomпозиционное покрытие на основе нитрата серебра и полилактида (1:1)
AgNO <sub>3</sub> – ПЛ3	нанокomпозиционное покрытие на основе нитрата серебра и полилактида (1:3)
Ag <sub>2</sub> O – ПЛ	нанокomпозиционное покрытие на основе оксида серебра и полилактида (1:3)
ЦФ – ПЛ	нанокomпозиционное покрытие на основе ципрофлоксацина и полилактида (1:9)
ЦФ – ПУ	нанокomпозиционное покрытие на основе ципрофлоксацина и полиуретана (1:9)
ЦФ – ПММА	нанокomпозиционное покрытие на основе ципрофлоксацина и полиметилметакрилата (1:9)
AgCl – ПУ	нанокomпозиционное покрытие на основе хлорида серебра и полиуретана (1:3)
AgCl – ПЛ	нанокomпозиционное покрытие на основе хлорида серебра и полилактида (1:3)
AgCl – ПУ – ПЛ	нанокomпозиционное покрытие на основе хлорида серебра, полиуретана и полилактида (2:3:3)
ЦФ – AgCl – ПУ – ПЛ	нанокomпозиционное покрытие на основе ципрофлоксацина, хлорида серебра, полиуретана и полилактида (1:2:3:3)

Оценка поверхностной бактерицидной активности проведена в соответствии с Японским промышленным стандартом JIS Z 2801: 2000. Для определения поверхностной бактерицидной активности готовили серии образцов, каждая серия включала по 3 образца (титановые пластины 50x50 мм с тонкопленочным антибактериальным покрытием одинакового состава либо без него).

Подготовка образцов. Контрольные образцы (титановые пластины 50x50 мм) и опытные образцы (титановые пластины 50x50 мм с нанесенными антибактериальными покрытиями) стерилизовали в воздушном стерилизаторе 160°C — 60 мин.

Подготовка тест-культуры. Из суточной культуры *E. coli* ATCC 25922, выращенной на плотной питательной среде, готовили суспензию в стерильном иском растворе хлорида натрия (ИХН), оптическая плотность 0,5 МакФарланд (контроль денситометром), концентрация микробных клеток  $1,5 \cdot 10^8$  мл<sup>-1</sup>. Готовили рабочее разведение *E. coli* ATCC 25922 в разведенном 1/500 питательном бульоне с концентрацией  $2,5 \cdot 10^5$  клеток / мл по схеме:

- 100 мл стерильной дистиллированной воды;
- 200 мкл питательного бульона (Nutrient Broth, M002, HiMedia, Индия);
- 170 мкл суспензии *E. coli* ATCC 25922 с оптической плотностью 0,5 МакФарланд.

Инокуляция образцов. Стерильным пинцетом переносили контрольные и опытные образцы в предварительно маркированные полистироловые чашки Петри.

Наносили на образцы (в центр каждой пластины) 400 мкл рабочего разведения тест-культуры *E. coli* ATCC 25922

Стерильным пинцетом накладывали поверх суспензии стерильную полиэтиленовую пленку (40x40 мм)

Инкубация. Закрытые чашки осторожно переносили во влажную камеру и инкубировали в термостате при 35 °С 24 ч.

Количественный учет результатов. В маркированные стеклянные флаконы с 50 мл стерильного ИХН переносили полиэтиленовую пленку и весь объем суспензии с поверхности образца, флаконы инкубировали 15–20 мин на шейкере для равномерного распределения микроорганизмов в объеме.

С помощью стерильной пипетки и шпателя делали высев 100 мкл содержимого флаконов на чашки с агаром Мюллер–Хинтона (Mueller Hinton Agar, M173, HiMedia, Индия).

Посевы инкубировали в термостате при 35 °С 24 ч.

Подсчитывали количество колоний, выросших на чашках.

Схема исследования представлена на рисунке 1.

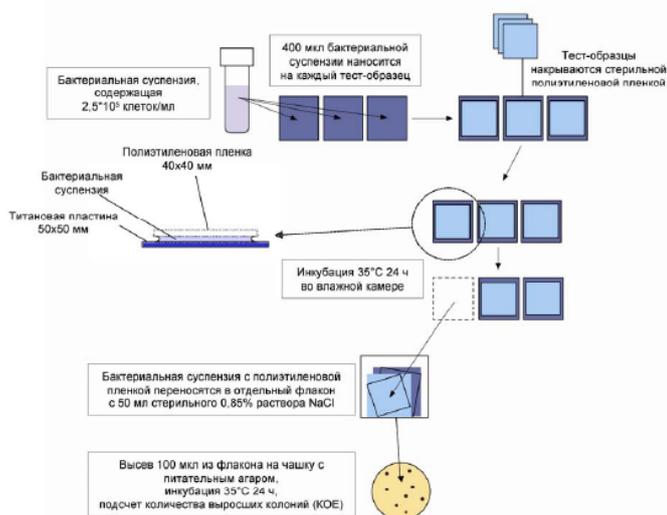


Рисунок 1 — Оценка поверхностной бактерицидной активности, JIS Z 2801: 2000, схема исследования.

Рассчитывали среднее количество живых микробных клеток для каждой серии образцов по формуле:

$$N = \frac{(C_1 + C_2 + C_3)DV}{3} \quad (1)$$

где  $N$  — среднее количество микробных клеток для серии образца,  $C_1$ – $C_3$  — количество колоний на чашке для каждого из образцов в серии,  $D$  — фактор разведения,  $V$  — объем ИХН, использованный для отмывки.

Рассчитывали уровень антимикробной активности для серии опытных образцов по формуле:

$$R = \log(N_K / N_T) \quad (2)$$

где  $R$  — уровень антимикробной активности,  $N_K$  — среднее количество микробных клеток для серии контрольных образцов,  $N_T$  — среднее количество микробных клеток для серии опытных образцов.

Для определения устойчивости покрытий к механическим воздействиям проведена отмывка титановых пластин с нанесенными покрытиями в присутствии абразива. В качестве абразива использовали наполнитель для галтовки ОТЕС Н0/050 (ОТЕС, Германия), материал абразива — ореховая скорлупа с размером гранул 2,4–4,0 мм. В стеклянный флакон помещали образец с покрытием, вносили 15–20 г абразива (высота слоя абразива в флаконе 5–7 мм) и добавляли 100 мл дистиллированной воды. Инкубацию проводили при температуре 37°C с непрерывным встряхиванием на шейкере. Поверхностную бактерицидную активность отмытых в присутствии абразива образцов оценивали через сутки (24 ч), 7 суток (168 ч) и 14 суток (336 ч) от начала инкубации, в соответствии с JIS Z 2801: 2000.

Для оценки кинетических параметров вымывания наночастиц серебра из покрытий различного состава вносили марлевые образцы массой 500 мг с нанесенным на них покрытиями во флаконы со 100 мл модельной среды. В качестве модельной среды использовалась деионизованная вода (MilliPore Simplicity, Франция, 18,2 МΩ/см). Инкубировали флаконы с образцами на шейкере при непрерывном встряхивании в течение 72 ч, в заданные интервалы времени (0,5 – 1 – 2 – 5 – 10 – 24 – 72 ч) отбирали по 1 мл модельной среды из флаконов и переносили в полистироловые пробирки с 9 мл деионизованной воды (разведение 1:10) для последующего масспектрометрического определения концентрации серебра.

Для уточнения кинетических параметров вымывания наночастиц из покрытий на основе биоразлагаемого полимера (полилактид) вносили марлевые образцы массой 500 мг с нанесенным на них покрытиями во флаконы со 100 мл модельной среды. В качестве модельной среды использовалась деионизованная вода. Инкубировали флаконы с образцами на шейкере при непрерывном встряхивании в течении 240 ч, в заданные интервалы времени (2 – 19 – 45 – 95 – 140 – 190 – 240 ч) отбирали по 1 мл модельной среды из флаконов и переносили в полистироловые пробирки с 9 мл деионизованной воды (разведение 1:10) для последующего масспектрометрического определения концентрации серебра.

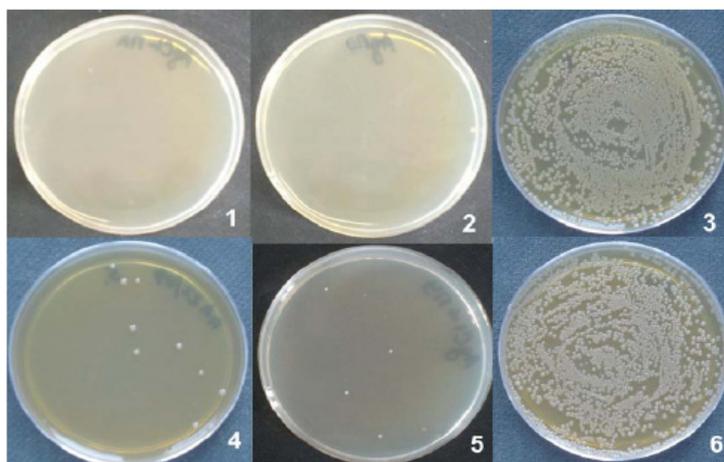
Определение содержания серебра в отмывочных растворах проводилось методом плазменной масс-спектрометрии на приборе ELAN 9000 (PerkinElmer США). Для приготовления градуировочных растворов использовали многоэлементный стандартный раствор 9300233 ICP-MS3 Multi-element Calibration Standard 3, (Perkin Elmer, США), содержащий 10 мкг/мл Ag. Градуировочные растворы с концентрациями Ag 10 мкг/л и 100 мкг/л готовили разбавлением головного раствора деионизованной водой (MilliPore Simplicity, Франция, 18,2 МΩ/см). Для измерения фонового сигнала использовали деионизованную воду.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты определения поверхностной бактерицидной активности покрытий, нанесенных на титановые пластины, приведены в табл. 2.

Таблица 2 — Поверхностная бактерицидная активность нанокomпозиционных покрытий (JIS Z 2801: 2000)

№ п/п	Покрытие	Уровень антимикробной активности	
		R (log редукции)	% редукции
1.	AgNO <sub>3</sub> – ПУ	>2,6	>99,8%
2.	AgNO <sub>3</sub> – ПА-6	>2,6	>99,8%
3.	AgNO <sub>3</sub> – ПЭ	>2,6	>99,8%
4.	AgNO <sub>3</sub> – ПТФЭ	>2,6	>99,8%
5.	AgNO <sub>3</sub> – ПЛ1	>2,6	>99,8%
6.	AgNO <sub>3</sub> – ПЛ3	>2,6	>99,8%
7.	Ag <sub>2</sub> O – ПЛ	0,04	<3%
8.	ЦФ – ПЛ	>2,6	>99,8%
9.	ЦФ – ПУ	>2,6	>99,8%
10.	ЦФ – ПММА	>2,6	>99,8%
11.	AgCl – ПУ	1,86	98,6%
12.	AgCl – ПЛ	>2,6	>99,8%
13.	AgCl – ПУ – ПЛ	2,12	99,3%
14.	ЦФ – AgCl – ПУ – ПЛ	>2,6	>99,8%

При определении поверхностной бактерицидной активности по JIS Z 2801: 2000 для большинства нанокomпозиционных покрытий в высевах на агаре Мюллер–Хинтона отсутствовал рост тест-культуры. Для покрытий AgCl–ПУ и AgCl–ПУ–ПЛ получен рост единичных (не более 1–8 на одной чашке) колоний, для покрытия Ag<sub>2</sub>O–ПЛ в высевах наблюдался массивный рост (270–400 КОЕ) тест-культуры *E.coli* ATCC 25922. В высевах, сделанных при исследовании контрольных образцов (титановые пластины без покрытия), получен рост 350-400 КОЕ на каждой чашке (рисунок 2).



1 — покрытие AgCl–ПЛ; 2 — покрытие AgNO<sub>3</sub>–ПЭ; 3 — покрытие Ag<sub>2</sub>O–ПЛ; 4 — покрытие AgCl–ПУ–ПЛ; 5 — покрытие AgCl–ПУ; 6 — контрольный образец, титановая пластина без антибактериального покрытия.

Рисунок 2 — Результаты определения поверхностной бактерицидной активности покрытий, нанесенных на титановые пластины (высев на МХА)

Результаты масспектрометрического определения концентраций серебра в модельной среде представлены на рисунке 3.

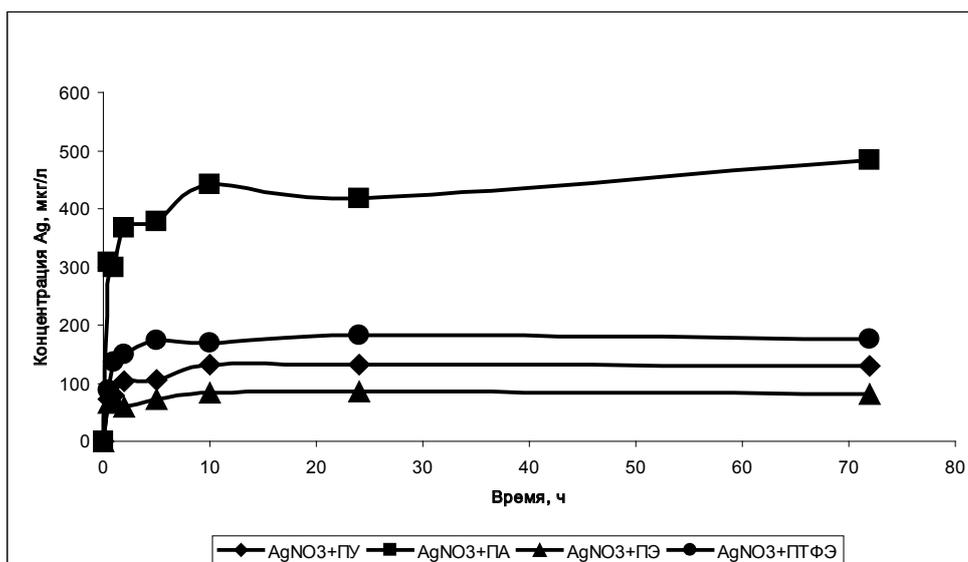


Рисунок 3 — Кинетические зависимости вымывания серебра из марлевых образцов

Показано, что скорость вымывания серебра из композиционного слоя на основе полиамида максимальна, что вполне прогнозируемо. Основным недостатком полиамида как конструкционного полимера является его высокое влагопоглощение. Молекулы воды способны интенсивно взаимодействовать с амидными группами. Следствие подобного взаимодействия — деструкция макромолекул полимера. Полиуретан более стоек к гидролизу в сравнении с полиамидом, что и определяет значительно более низкое значение скорости высвобождения антибактериального металла.

Композиционные покрытия на основе политетрафторэтилена и полиэтилена характеризуются низкими скоростями высвобождения металла при отмывке. Скорость высвобождения антибактериального металла определяется ее гидрофобными и гидрофильными свойствами. Гидрофобность полимера является одним, но не основным, препятствием быстрому проникновению воды в покрытие, следствием которого является его деструкция.

Повысить скорость высвобождения антибактериального металла из полимерной матрицы можно при использовании водорастворимых или биодеструктурируемых полимерных материалов, в частности полилактида (рисунок 4). Полилактид в воде интенсивно набухает, что сказывается на его физико-механических характеристиках и быстром высвобождении металлсодержащего соединения. Интересен факт увеличения скорости высвобождения серебросодержащего соединения при введении полилактида в другой полимер (формирование композиционной полимерной матрицы на основе нескольких полимеров), в частности полиуретан.

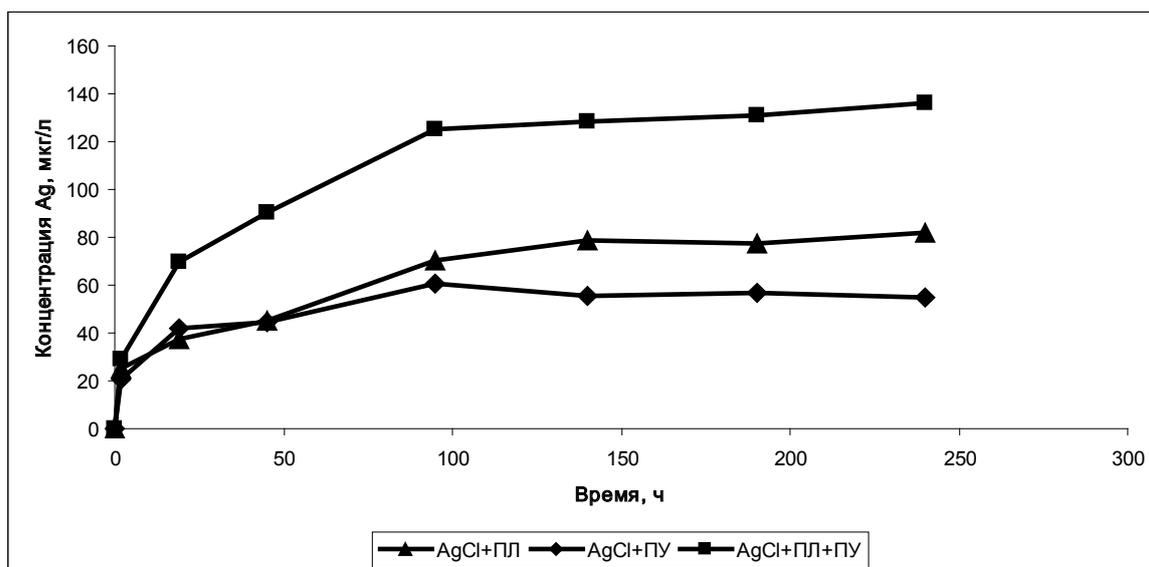


Рисунок 4 — Кинетические зависимости вымывания серебра из комбинированных покрытий

Ранее было отмечено, что полиуретановая матрица под действием воды медленно деформируется. При введении полилактида выделение серебросодержащего соединения будет следствием гидролиза макромолекул полиуретана и набухания полилактида, разрушающей сплошность композиционной полимерной матрицы. Сказанное подтверждается результатами проведенных исследований.

При выполнении 24-часовой отмытки покрытий в присутствии абразива выявлено сохранение поверхностной бактерицидной активности (не менее 95% от исходного уровня) для покрытий AgNO<sub>3</sub> – ПУ, AgNO<sub>3</sub> – ПЛ1, ЦФ – ПЛ, ЦФ – ПУ, ЦФ – ПММА, AgCl – ПУ, AgCl – ПЛ, AgCl – ПУ – ПЛ, ЦФ – AgCl – ПУ – ПЛ (таблица 3). Все покрытия, содержащие ципрофлоксацин (ЦФ – ПЛ, ЦФ – ПУ, ЦФ – ПММА, ЦФ – AgCl – ПУ – ПЛ), сохраняли поверхностную бактерицидную активность не менее 95% от исходного уровня через 7 и 14 суток отмытки. Для двухкомпонентных покрытий AgNO<sub>3</sub> – ПУ, AgNO<sub>3</sub> – ПЭ, AgNO<sub>3</sub> – ПТФЭ, AgNO<sub>3</sub> – ПЛ1, AgNO<sub>3</sub> – ПЛ3, выявлено устранение поверхностной бактерицидной активности до уровня менее 10% от исходной уже через 7 суток отмытки. При определении поверхностной бактерицидной активности для этих покрытий, отмытых в течение 14 суток, интенсивность роста тест-культуры с поверхности покрытий и с поверхности необработанных контрольных образцов не отличалась (полное устранение поверхностной бактерицидной активности).

Таблица 3 — Устойчивость покрытий к механическим воздействиям (отмытка в присутствии абразива)

№ п/п	Покрытие	Поверхностная бактерицидная активность нанокomпозиционных покрытий по JIS Z 2801: 2000, в % к исходному уровню		
		Отмытка 24 часа	Отмытка 7 суток	Отмытка 14 суток
1.	AgNO <sub>3</sub> – ПУ	>95%	<10%	не определялась
2.	AgNO <sub>3</sub> – ПА-6	<10%	не определялась	не определялась
3.	AgNO <sub>3</sub> – ПЭ	67%	<10%	не определялась
4.	AgNO <sub>3</sub> – ПТФЭ	80%	<10%	не определялась
5.	AgNO <sub>3</sub> – ПЛ1	>95%	<10%	не определялась
6.	AgNO <sub>3</sub> – ПЛ3	60%	<10%	не определялась
7.	Ag <sub>2</sub> O – ПЛ	не определялась	не определялась	не определялась

8.	ЦФ – ПЛ	>95%	>95%	>95%
9.	ЦФ – ПУ	>95%	>95%	>95%
10.	ЦФ – ПММА	>95%	>95%	>95%
11.	AgCl – ПУ	>95%	<10%	<10%
12.	AgCl – ПЛ	>95%	<10%	не определялась
13.	AgCl – ПУ – ПЛ	>95%	<10%	не определялась
14.	ЦФ – AgCl – ПУ – ПЛ	>95%	>95%	>95%

Таким образом, максимальная устойчивость к механическим воздействиям обнаружена у двухкомпонентных покрытий, содержащих ципрофлоксацин, и четырехкомпонентного покрытия ЦФ – AgCl – ПУ – ПЛ.

**Заключение.** В результате проведенного этапа исследования определены составы композиционных наноструктурных покрытий, обладающие длительным бактерицидным эффектом и оптимальными кинетическими характеристиками высвобождения антибактериальных факторов.

На скорость высвобождения серебра из сформированных полимерных композиционных слоев оказывает влияние стойкость полимерной матрицы к действию водной среды. Деструкция полимера (гидролиз) сопровождается ростом концентрации серебра в анализируемой водной пробе. Использование биодеструктурируемых полимерных материалов, в частности полилактида, позволяет повысить скорость высвобождения наночастиц металла из полимерной матрицы.

Поступила 13.09.2012

## BIOCOMPATIBLE COMPOSITE ANTIBACTERIAL COATINGS WITH PROLONGED RELEASE OF SILVER NANOPARTICLES

Tapalsky D.V.<sup>1</sup>, Boitsova N.Yu.<sup>1</sup>, Yarmolenko M.A.<sup>2</sup>, Rogachev A.A.<sup>2</sup>, Sitnik A.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Gomel State Medical University, Gomel;

<sup>2</sup>F. Skoryna Gomel State University, Gomel;

<sup>3</sup>Republican Research & Practical Center for Traumatology & Orthopedics, Minsk, Belarus

Fourteen types of complex coatings consisting from stable and biodegradable polymers and their mixtures, silver nitrate, silver chloride and ciprofloxacin were synthesized. The evaluation of expression and duration of bactericidal effect concerning test cultures of microorganisms was performed. The prolonged antibacterial effect for the majority of antibacterial coatings, the most long-term and expressed for the complex coatings containing ciprofloxacin, was revealed. By means of mass spectrometer definition of concentrations of silver in model medium it was shown that the rate of release of metal nanoparticles from the polymer matrix increases with the use of biodegradable polymers.

**Keywords:** nanoparticles, silver, polymers, antibacterial coatings.

## РОЛЬ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ В ЭЛИМИНАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Отрашевская Е.В., Лыско К.А.

ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России, Москва, Россия

Многолетнее применение антибиотиков для лечения различных заболеваний привело к возникновению множественной лекарственной устойчивости бактериальных штаммов.

Кроме того, количество новых препаратов антибиотиков неуклонно сокращается: в период с 70-х по 90-е гг. прошлого века не было открыто ни одного нового класса антибиотиков и лишь в 2000-х гг. появились препараты класса циклических липопептидов и оксазолидинонов. Экономический ущерб, наносимый возникновением антибиотикорезистентных форм бактерий, исчисляется десятками и сотнями миллионов долларов. Например, в странах ЕС он составляет как минимум 1,5 млрд. евро в год. В качестве одного из вариантов решения сложившейся проблемы можно предложить применение биологических антисептиков прямого противобактериального действия — бактериофагов (фагов), открытых почти столетие назад.

Бактериофаги представляют собой вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Антибактериальный эффект препаратов бактериофагов обусловлен внедрением генома фага в бактериальную клетку с последующим его размножением и лизисом инфицированной клетки. Вышедшие во внешнюю среду в результате лизиса бактериофаги повторно инфицируют и лизируют другие бактериальные клетки, действуя до полного уничтожения патогенных бактерий в очаге воспаления.

На филиалах ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России в городах Уфа, Пермь и Нижний Новгород бактериофаги производятся с 40-х гг. прошлого века. В России и странах СНГ препараты бактериофагов применяют для профилактики и лечения: инфекционных поражений желудочно-кишечного тракта (дизентерия, брюшной тиф, сальмонеллез, дисбактериоз и др.); гнойно-воспалительных заболеваний глаз, ушей, носа, ротовой полости, горла, легких (отит, ангина, фарингит, стоматит, пародонтит, конъюнктивит, гайморит, фронтит, пневмония и пр.); хирургических инфекций (обработка послеоперационных и гноящихся ран, гнойные поражения кожи, перитонит и др.); ожоговых ран; урогенитальных инфекций (цистит, пиелонефрит, вульвит и пр.) и целого ряда других заболеваний.

Традиционной формой выпуска бактериофагов является жидкий препарат (кроме таблетированных форм кишечных фагов), поэтому фаги используют для приема через рот, в виде клизм, аппликаций, орошений, введения в полости ран, вагины, матки, носа, а также путем введения в дренированные полости — брюшную, плевральную, мочевого пузыря, почечной лоханки.

Препараты бактериофагов используются в клинической практике наряду с антибиотиками. Особо следует отметить тот факт, что зачастую фаговые препараты превосходят другие антибактериальные препараты по активности в отношении антибиотикорезистентных возбудителей. Бактериофаги не вызывают побочных токсических и аллергических реакций и не имеют противопоказаний, поэтому они применяются при лечении ряда заболеваний беременных женщин в сочетании с другими лечебными препаратами. Вследствие безвредности и ареактогенности возможно их применение в педиатрической практике, в т.ч. и у новорожденных детей. Использование препаратов бактериофагов стимулирует активизацию факторов специфического и неспецифического иммунитета. Поэтому фаготерапия особенно эффективна при лечении хронических воспалительных заболеваний на фоне иммунодепрессивных состояний. Бактериофаги не препятствуют реализации лечебного действия других препаратов (антибиотики, пробиотики, синбиотики) и не чувствительны к их воздействию. Препараты бактериофагов могут назначаться как для лечения дисбактериоза и расстройств пищеварительной системы, так и для предотвращения колонизации слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта условно-патогенными бактериями.

Фаготерапия эффективна в 77–93% случаев в элиминации бактерий родов *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, вызывающих широкий спектр внутригоспитальных инфекций, хотя лечение данных заболеваний затруднено

высокой частотой (50–95%) антибиотикорезистентности, проявлением токсических и многочисленных аллергических реакций, а также осложнениями в виде явлений дисбактериоза.

На сегодняшний день на предприятии намечен целый ряд приоритетных направлений разработки и производства лечебно-профилактических бактериофагов. Созданы и внедряются новые препараты: против серраций и энтеробактерий. Ведутся работы по созданию фагового препарата против *Helicobacter pylori*, *Acinetobacter baumannii*. Готовятся к серийному производству различные препараты бактериофагов в таблетках и суппозиториях. Планируется выпуск препаратов в виде мазей, гелей, линиментов и активных пленок с бактериофагами.

Резюмируя, хотелось бы выделить основные преимущества бактериофагов перед антибиотиками:

- бактериофаги высоко специфичны при лечении инфекций, не подавляют нормальную микрофлору и не нарушают естественный баланс внутренней среды организма, т.е. фаготерапия является этиотропной, специфической;

- бактериофаги не имеют противопоказаний к применению: их можно назначать беременным, кормящим матерям и детям любого возраста, включая недоношенных;

- бактериофаги не вызывают развития резистентности микроорганизмов;

- бактериофаги оказывают стимулирующее влияние на гуморальное и клеточное звенья иммунитета;

- бактериофаги не обладают токсическим, аллергическим и тератогенным эффектами;

- бактериофаги эффективны в монотерапии, но также могут применяться в комбинации с другими препаратами, в т.ч. с антибиотиками и пробиотиками.

Таким образом, целый ряд преимуществ бактериофагов перед антибиотиками позволяет заявить фаготерапию как одно из перспективных направлений для современного здравоохранения.

**Ключевые слова:** антибактериальные препараты, антибиотики, множественная лекарственная устойчивость бактериальных штаммов, бактериофаги, бактериальные инфекции, фаготерапия.

Поступила 27.08.2012

## **BACTERIOPHAGE PREPARATION IN ELIMINATION OF BACTERIAL INFECTIONS**

**Otrashevskaya E.V., Lysko K.A.**

*Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines,  
Ministry of Health and Social Department of the Russian Federation, Moscow, Russia*

The main features characterizing a current state of medicoprohylactic bacteriophage manufacturing and application are described. The preparations development trends are outlined. The main fields of bacteriophage based products application and the actual examples of phage usage in clinical practice and in antiepidemic actions in general are represent. The basic advantages of phages compared to antibiotics are also given.

**Keywords:** antibacterial preparations, antibiotics, multi drug resistant strains, bacteriophages, bacterial infections, phagothrapy.

МИКРО-РНК: НОВЫЙ КЛАСС РЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ ИММУННОГО  
ОТВЕТА И ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Титов Л.П.

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В статье проанализированы данные литературы о роли нового класса биомолекул — микро-РНК в механизмах регуляции иммунной системы организма в ответ на внедрение, локальную репродукцию, системное распространение и элиминацию инфекционных агентов. Имеющиеся к настоящему времени научные факты и знания, а также методы выявления и оценки микро-РНК в нормальных физиологических состояниях и при иммунных и инфекционных заболеваниях открывают новые перспективы развития фундаментальных и прикладных научных исследований.

**Ключевые слова:** микро-РНК, иммунный ответ, инфекционный процесс

В последние два десятилетия расширены и углублены знания о ряде новых механизмов неспецифической резистентности, гуморального и клеточного иммунного ответа организма (toll-рецепторы, цитокины, регуляторные субпопуляции Т-клеток) на внедрение, локальную репродукцию, системное распространение и элиминацию инфекционных агентов [1, 2]. Вместе с тем, становится все очевиднее, что организм человека сложнее, чем представлялось ранее, обладает множеством уровней и механизмов регуляции функционирования иммунной системы, которые существенно влияют на исход инфицирования индивидуума, клиническое течение заболевания, иммунный ответ, ответ на профилактические и лечебные вакцины или клиническую эффективность лекарственных препаратов [3, 4].

Один из таких классов регуляторных биомолекул представляют малые, или микро-РНК (миРНК; англ. — microRNA, miRNA) — молекулы с широким спектром биологических функций [5]. Первая миРНК описана в 1993 г., а термин микро-РНК был предложен в 2001 г. [6, 7]. Микро-РНК кодируются генами, эволюционно производными мобильных элементов класса MITE (англ. — miniature inverted-repeat transposable elements), т.е. возникли из отдельных копий транспозонов [8, 9]. К настоящему времени путем клонирования, секвенирования и биоинформатического предсказания у различных организмов выявлены и описаны тысячи миРНК и их генов. Большинство генов миРНК (61%) расположено в областях интронов белоккодирующих генов. Кроме того, их локализация выявлена и в области экзонов или межгенных областях [10, 11]. Микро-РНК транскрибируются с соответствующих генов РНК-полимеразой II (pol II), а некоторые — pol III [12, 13]. Разработана номенклатура и осуществляется регистрация вновь открываемых молекул. Зрелые микро-РНК обозначаются сочетанием букв (приставкой) — mir с добавлением уникального идентификационного номера, например mir15, mir17, mir148 и т.д. [11]. Гены, кодирующие miRNA, обозначаются приставкой трех заглавных букв — MIR и номером, идентичным таковому mirRNA. База данных миРНК (miRBase) поддерживается Институтом Сангера (Sanger Institute) в Хинкстоне (Великобритания), который разработал и их номенклатуру (miRBase) (<http://microrna.sanger.ac.uk/>).

Микро-РНК — новый и малоизученный класс регуляторных молекул. Хотя они были идентифицированы около 20 лет назад, но только сейчас исследователи приблизились к пониманию функции этих молекул при физиологических состояниях и патологии. Накопленные данные свидетельствуют, что хотя они и невелики по размерам, но их функциональная роль огромна. Быстрыми темпами поступает информация о широком

участии миРНК в росте, развитии и дифференциации клеток, их ассоциации с широким спектром патологических процессов, включая инфекционные, кардиоваскулярные, онкологические, аутоиммунные и аллергические [9, 10, 14-16]. У человека выявлено более 700 различных миРНК, интенсивно идет процесс открытия новых молекул, верификация их функциональной значимости, оценка возможностей клинического применения.

Основными мишенями и, естественно, опосредуемым ими механизмом являются молекулы информационной РНК (иРНК). Микро-РНК обладают рядом свойств: а) они являются некодирующими одноцепочечными молекулами РНК длиной 19-25 нуклеотидов; б) связываются с комплементарным участком на 3'-конце и РНК-мишени; в) связывание миРНК с иРНК-мишенью приводит к расщеплению последней или к репрессии ее продуктивной трансляции; г) одна и та же миРНК может регулировать функцию нескольких иРНК; д) разные миРНК могут регулировать функцию иРНК одного типа; е) способны регулировать функцию примерно 25% генов; ж) негативная регуляция (снижение/выключение) экспрессии генов — основной механизм их функционирования; з) способствуют возникновению транзиций, оказывают эффект на нейрональные связи, адипогенез, метаболизм, гематопоез, онкогенез и иммунный ответ [8, 12, 13].

Первичным транскриптом генов миРНК является при-миРНК (pri-miRNA), который разрушается РНК-азой III (эндонуклеазой Drosha) в ядре с высвобождением интермедиата длиной 60–70 нуклеотидов, известного как пре-миРНК (рисунок 1) [2].

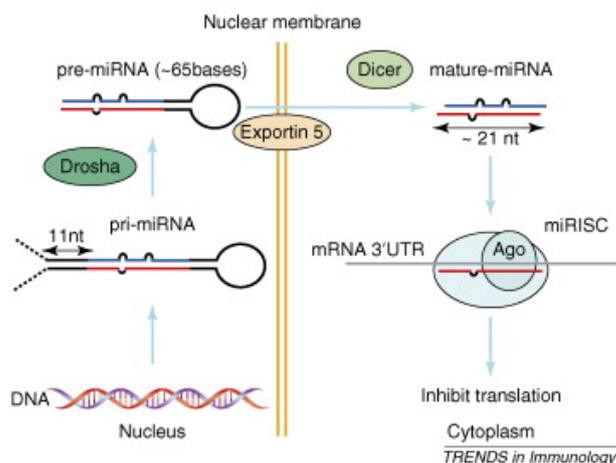


Рисунок 1 — Схема формирования пре-миРНК и зрелой миРНК в ядре и цитоплазме [2]

На первом этапе в ядре с генов микроРНК транскрибируются первичные микроРНК (pri-miRNA) с 5' и 3' поли(А) концами посредством Pol II и Pol III и процессируются в 70-нуклеотидные pre-miRNA. Этот процессинг выполняется микропроцессорным комплексом, включающим нуклеазу Drosha и белок Pasha, который обвит двунитевой РНК. Затем пре-миРНК экспортируется в цитоплазму. Транслокация пре-ми-РНК в цитоплазму является зависимым от Ran-GTP процессом. В цитоплазме молекулы пре-миРНК превращаются в зрелые микроРНК путем расщепления молекул другой РНКазы-подобной эндонуклеазой III, названной Dicer. При этом образуется две комплементарные молекулы РНК, но только одна из них интегрируется с комплексом RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Данный комплекс ответственен за выключение гена, наблюдаемое во время экспрессии микро-РНК или РНК-интерференции. Его каталитическим компонентом является белок argonaute обладающий эндонуклеазной активностью. Эндонуклеаза Dicer разрезает петлю пре-миРНК с образованием двуцепочечной молекулы РНК (дуплекса), который состоит из молекулы зрелой миРНК и ее антисмысловой цепи. После интеграции

с RISC-комплексом основания миРНК комплементарно спариваются с иРНК. Следствием спаривания миРНК: иРНК является угнетение экспрессии белка путем подавления трансляции. Обычно микро-РНК удаляет 3'-поли(А) и 5'-головку у молекулы мРНК-мишени, после чего ее оставшаяся часть разрушается клеточными ферментами. В последнее время появились работы, указывающие, что миРНК, возможно, способны усиливать экспрессию белков [6, 8, 12, 13, 16].

Микро-РНК имеют уникальные профили экспрессии в клетках, относящихся к компонентам естественного и приобретенного иммунитета, играют важную роль в развитии, регуляции и функциональности иммунокомпетентных клеток и органов. Иммунокомпетентные клетки — Т- и В-лимфоциты, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, естественные киллеры чрезвычайно важны для контроля различных бактериальных, грибковых и вирусных инфекций, равно как и инвазии простейшими. Следовательно, миРНК неспецифически контролируют ответные реакции клеток иммунной системы, изменяя функциональное состояние структурных и регуляторных генов популяций и субпопуляций специализированных генов. Так, инактивация ключевого фермента биогенеза миРНК *Dicer* в Т- и В-лимфоцитах мышей приводила к блокированию образования миРНК и нарушало развитие лимфоцитов [2, 17]. Делеция функции *Dicer* у незрелых тимоцитов приводила к десятикратному снижению общего числа зрелых CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов периферической крови и одиночно позитивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> тимоцитов, возможно из-за ускоренной гибели клеток. Дефицит миРНК у В-лимфоцитов также нарушает развитие и ответные реакции В-лимфоцитов. Определенные типы миРНК выявляются в центральных и периферических органах иммунной системы, что, возможно, указывает на их связь с протеканием иммунофизиологических процессов в этих органах и иммунокомпетентных клетках (табл.).

Таблица — Микро-РНК и иммунная система

Тип миРНК	Функция	Факторы транскрипции	Мишени
miR-15a	хроническая лейкемия, снижение экспрессии		bcl-2
miR-16	деградация мРНК ФНО		TNF
miR-17-5p	ингибирование созревания моноцитов		
miR17-92	угнетение развития Т- и В-клеток		Bim, PTEN
miR-29	угнетение Th1, Th2, Th17, стимулирование CD8 <sup>+</sup>	NF-kB	
miR-146a	экспрессия в макрофагах	NF-kB	IRAK1
miR-150	супрессия В-лимфоцитов		
miR-155	переключение классов Ig (IgG1), цитокины Th1, Th2	AP-1	PU.1, c-Maf
miR-181a	В-клетки, развитие CD4 <sup>+</sup>		SHP-2, DUSHP
miR-196	интерферон β, репликация ВГС		
miR-223	регуляция функции нейтрофилов	PU.1, C/EBP	Mef2c, IGFR

Понимание патогенеза инфекционных заболеваний и разработка новых подходов к диагностике, лечению и профилактике невозможно без установления реальных механизмов взаимодействия инфекционных агентов (вирусов, бактерий, простейших, грибов) или продуктов их жизнедеятельности (малые РНК, регуляторные белки) с комплексом

биомолекул, клеток и органов хозяина: в какой последовательности, с какой интенсивностью и какими функциями они индуцируют образование миРНК [15, 18, 19].

Внутриклеточные агенты с этой точки зрения более удобные модели для выявления и оценки динамики экспрессии миРНК в процессе развития заболевания и иммунного ответа. Например, при лепре изменяется уровень экспрессии miR-13, miR-21 и miR-29. Молекула miR-29 контролирует экспрессию  $\gamma$ -интерферона и других интерферонов разными типами иммунокомпетентных клеток. На рисунок 2 [2] представлены механизмы индукции и активации В- и Т-лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов в ответ на разнообразные стимулы, обозначены сигнальные пути, находящиеся под регуляторным контролем определенных типов миРНК. Как видно из представленных схем, в регуляции В-, Т-лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов участвуют разные типы миРНК, биогенез которых ассоциирован с определенными поверхностными рецепторными молекулами, а реализация регуляторного потенциала тесно связана с проводящими сигнальными путями и ядерными транскрипционными факторами [20-22].

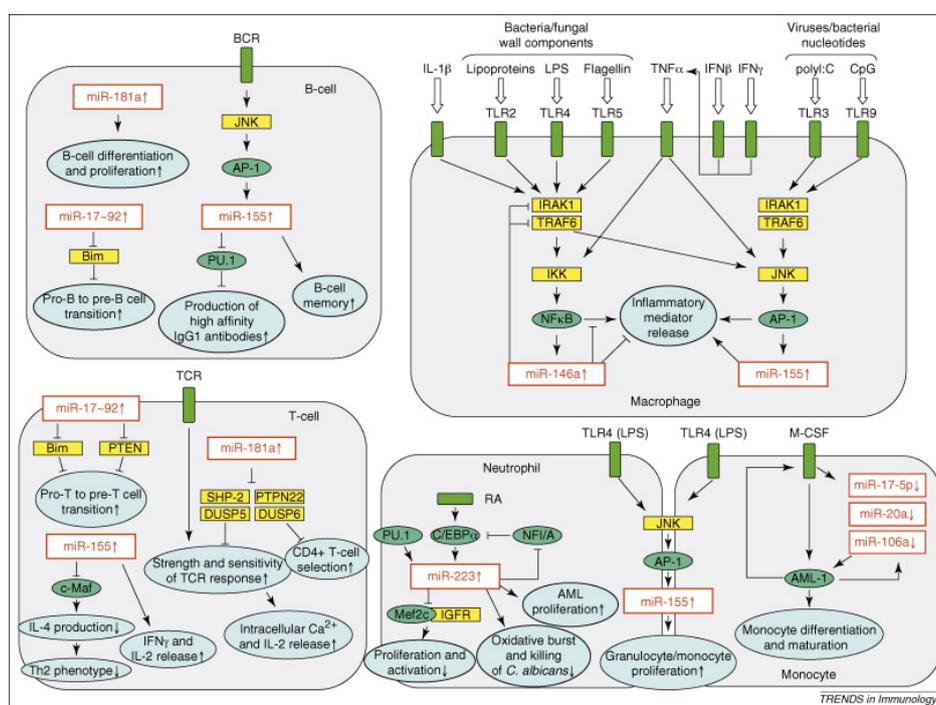


Рисунок 2 — Схема участия микро-РНК на разных этапах процессов активации В- и Т-лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов [2].

Как известно, для вирусов и бактерий с внутриклеточной локализацией характерен клеточный и органнй тропизм. Рецепторопосредованное проникновение в клетки и последующая реализация стратегии генома паразита осуществляется при взаимодействии структурных и регуляторных биомолекул последнего с основными биологическими процессами клетки с целью создания привилегированных условий, обеспечивающих выживание и последующее распространение. Например, миРНК-122 является членом семейства малых, некодирующих молекул РНК, образуется в печени пациентов с ВГС-инфекцией [23]. Она оказывает позитивное влияние на жизненный цикл вируса в гепатоцитах путем связывания с 5' не кодирующей областью вирусспецифической РНК. Ингибиторы miR-122 специфически блокируют (выключают) функцию этой молекулы без какого-либо негативного эффекта на физиологию печени. Вирусные инфекции, обусловленные энтеровирусом 71 типа и коксакивирусом 16 типа, характеризуются разным

спектром миРНК. Наиболее значимые из них — mir-148a, mir-143, mir-324-3p, mir-140-5p и mir-362-3p [20, 21, 24]. Молекулы клеточных миРНК, индуцированные внедрившимися микробами, как правило, обеспечивают их репродукцию путем угнетения активности генов, кодирующих антимикробные белки [14, 19, 23, 25]. Вместе с тем, многие бактерии и вирусы внутриклеточно продуцируют собственные микро-РНК, которые также обладают регуляторным эффектом и интерферируют с биологическими системами клеток, влияя на экспрессию определенных групп генов. Герпес-вирусы кодируют около 150 миРНК, полиомавирусы — 4, аденовирусы — 2 [20, 23, 24].

Таким образом, имеющиеся к настоящему времени научные факты и знания, а также методы выявления и оценки микро-РНК в нормальных физиологических состояниях и при иммунных и инфекционных заболеваниях открывают новую и перспективную задачу для фундаментальных и прикладных научных исследований.

#### Литература

1. Титов, Л.П. Противовирусный иммунитет: молекулярно-клеточные механизмы, закономерности развития и иммунопатология / Л.П. Титов, И.А. Карпов // *Мед. журн.* – 2007. – № 1. – С. 4-14.
2. Lindsay, M.A. MicroRNAs and the immune response / M.A. Lindsay // *Trends Immunol.* – 2008. – Vol. 29. – P. 343-351.
3. Титов, Л.П. Вирусы и эукариотические клетки: стадии взаимодействия, стратегии экспрессии геномов, репродукция и исходы инфекции / Л.П. Титов // *Мед. журн.* – 2008. – № 1. – С. 10-16.
4. Титов, Л.П. Геномико-протеомические основы эволюции и молекулярной эпидемиологии вирусов / Л.П. Титов, В.И. Вотяков // *Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук.* – 2011. – № 1. – С. 109-124.
5. MicroRNAs - micro in size but macro in function / S.K. Singh [et al.] // *FEBS J.* – 2008. – Vol. 276. – P. 4929-4944.
6. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* / R.C. Lee [et al.] // *Cell.* – 1993. – Vol. 75. – P. 843-854.
7. Ruvkun, G. Molecular biology: glimpses of tiny RNA world / G. Ruvkun // *Science.* – 2001. – Vol. 294. – P. 4051-4060.
8. Principles of MicroRNA-Target Recognition [Electronic resource] / J. Brennecke [et al.] // *PLoS Biology.* – 2005. – Vol. 3, N 3. – e85. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1043860/>. – Date of access: 24.09.2012.
9. Calin, G.A. MicroRNA signatures in human cancers / G.A. Calin, C.M. Croce // *Nature Rev.* – 2006. – Vol. 6. – P. 857-862.
10. MicroRBAs in systemic rheumatic diseases / A. Cerebelli [et al.] // *Arthr. Res. Ther.* – 2011. – Vol. 13, N 4. – P. 229-239.
11. MirBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature [Electronic resource] / S. Griffiths-Jones [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – Vol. 34. – Database issue: D140-D144. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1347474/>. – Date of access: 24.09.2012.
12. He, L. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation / L. He, G.J. Hannon // *Nature.* – 2004. – Vol. 5. – P. 522-528.
13. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II / Y. Lee [et al.] // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 23. – P. 3016-3027.
14. Identification of a common lupus disease-associated microRNA expression pattern in three different murine models of lupus [Electronic resource] / R. Dai [et al.] // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5, N 12. – e14302. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3000827/>. – Date of access: 24.09.2012.
15. Ha, T.Y. MicroRNAs in human diseases: from lung, liver and kidney diseases to infectious diseases, sickle cell disease and endometrium disease / T.Y. Ha // *Immune Network.* – 2011. – Vol. 11, N 6. – P. 309-323.
16. Micro-RNAs: control and loss of control in human physiology and disease / M. Li [et al.] // *World J. Surg.* – 2009. – Vol. 33, N 4. – P. 667-684.
17. Xiao, C. MicroRNA control in the immune system: basic principles / C. Xiao, K. Rajewsky // *Cell.* – 2009. – Vol. 136, N 1. – P. 26-36.
18. An analysis of human microRNA and disease association [Electronic resource] / M. Lu [et al.] // *PLoS One.* – 2008. – Vol. 3, N 10. – e3420. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2559869/>. – Date of access: 24.09.2012.
19. Singh, J. Role of non-coding miRNA in infectious diseases [Electronic resource] / J. Singh // *Roundtable Review.* – Mode of access: <http://obreview.com/2012/role-of-non-coding-mirna-in-infectious-diseases/>. – Date of access: 24.09.2012.
20. Cullen, B.R. Five questions about viruses and microRNAs [Electronic resource] / B.R. Cullen // *PLoS Pathogens.* – 2010. – Vol. 6, N 2. – e1000787. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2829071/>. – Date of access: 24.09.2012.
21. MicroRNAs in HIV-1 infection: an integration of viral and cellular interaction at the genomic level [Electronic resource] / N.H. Tan Gana [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2012. – Vol. 3. – 306. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3426883/>. – Date of access: 24.09.2012.
22. Relationships of PBMC microRNA expression, plasma viral load, and CD4+Tcell count in HIV-1-infected elite suppressors and viremic patients / K.W. Witwer [et al.] // *Retrovirology.* – 2012. – Vol. 9. – P. 5-18.
23. Jopling, C.L. Targeting microRNA-122 to treat hepatitis C virus infection / C.L. Jopling // *Viruses.* – 2010. – Vol. 2. – P. 1382-1393.
24. Serum MicroRNA expression profile distinguishes Enterovirus 71 and Coxsackivirus 16 infections in patients with

hand-foot-and-mouth disease [Electronic resource] / L. Cui [et al.] // PLoS One. – 2011. Vol. 6, N 11. – e27071. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3210764/>. – Date of access: 24.09.2012.

25. Small RNAs of pathogenic bacteria: not small enough to overlooked for therapeutics / V.R. Kyer [et al.] // Mol. Cell. Pharm. – 2012. – Vol. 4, N 1. – P.17-30.

Поступила 26.09.2012

## MICRO-RNAS: A NEW CLASS OF REGULATORY MOLECULES OF IMMUNE RESPONSE AND INFECTIOUS PROCESSES

Titov L.P.

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

The paper presents a review of the literature on the role of the current understanding of regulatory biomolecules miRNAs in the regulation mechanisms of the immune system in response to the invasion, local reproduction, systemic dissemination, and elimination of infectious agents. The currently available scientific evidence and knowledge, as well as methods to miRNAs measure in normal physiological conditions and in immune and infectious diseases, open up a new perspective to fundamental and applied research problem.

**Keywords:** microRNA, immune response, infection.

## ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ К КРАСНУХЕ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2011 Г.

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

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Целью данной работы явилось изучение уровня популяционного иммунитета к краснухе в различных возрастных и территориальных группах населения. Исследование 756 сывороток крови, собранных в семи различных регионах страны, показало, что 709 (93,8%) из них являлись серопозитивными. Пороговый уровень иммунитета (82–87%) был достигнут во всех регионах. Анализ популяционного иммунитета в различных возрастных группах населения показал, что самый низкий уровень иммунитета наблюдался среди лиц 12–24 мес., 24–29 лет. Для повышения уровня иммунной прослойки среди детей 12–24 мес. необходимо повысить своевременность охвата плановой вакцинацией вакциной корь-паротит-краснуха. Наличие восприимчивых лиц среди женщин 24–29 и 30–39 лет несет опасность инфицирования вирусом краснухи во время беременности и рождения ребенка с синдромом врожденной краснухи. Целесообразно обеспечить вакцинацию против краснухи серонегативных женщин детородного возраста.

**Ключевые слова:** краснуха, популяционный иммунитет.

**Введение.** Европейским региональным бюро ВОЗ поставлена цель элиминировать корь и краснуху в регионе к 2015 г. [1]. В целом в регионе заболеваемость краснухой постепенно снижается, однако регистрация случаев краснухи до настоящего времени все еще ведется не во всех странах. В 2009 г. в 19 странах региона было зарегистрировано 856 лабораторно подтвержденных случаев краснухи [1]. В 2010–2011 гг. вспышки краснухи были зарегистрированы во многих странах региона (Австрия, Босния и Герцеговина, Италия, Киргизстан, Мальта, Польша, Российская Федерация, Украина).

В Республике Беларусь вакцинация против краснухи в возрасте 12 мес. вакциной корь-паротит-краснуха проводится с 1996 г., ревакцинация в возрасте 6 лет — с 2000 г. Внедрение плановой иммунизации позволило снизить заболеваемость краснухой среди детей младшего возраста, однако у взрослых заболеваемость все еще оставалась высокой [2]. В период 2001–2005 гг. в стране ежегодно регистрировалось 4000–7000 случаев краснухи.

По данным возрастного распределения заболеваемости краснухой наиболее поражаемой возрастной группой были лица 1986-1994 гг. рождения (дети, рожденные в 1995 г. и позднее, к этому времени уже получили по крайней мере одну дозу вакцины КПК).

Дальнейшее снижение заболеваемости краснухой было достигнуто благодаря проведенной с ноября 2005 по май 2006 гг. кампании дополнительной иммунизации, в рамках которой моновакциной против краснухи было привито 1022247 человек в возрасте 11-19 лет. Кроме того, в течение 2007 г. было привито 37417 лиц женского пола 1985 года рождения, в 2008 г. — 81541 лиц женского пола 1982-1984 годов рождения. Проведение плановой иммунизации детей вакциной КПК в сочетании с дополнительными мероприятиями по иммунизации против краснухи подростков и взрослых лиц с использованием моновалентной вакцины кардинальным образом отразилось на эпидемическом процессе данной инфекции. Начиная с июля 2006 г. на территории страны выявлялись единичные случаи краснухой (2007 г. — 7, 2008 г. — 2, 2009 г. — 2, 2010 г. — 0). В 2011 г. в Республике Беларусь было выявлено 20 пациентов с краснухой, из которых 8 являлись иностранными гражданами (7 — граждане Вьетнама, 1 — Китая).

**Цель исследования:** изучение уровня популяционного иммунитета к краснухе в различных возрастных и территориальных группах населения.

**Материалы и методы.** Для оценки популяционного иммунитета к краснухе были исследованы сыворотки крови 756 человек в возрасте 1-60 лет из всех 7 регионов страны, собранные методом случайной выборки. Забор сывороток крови был осуществлен в мае-июне 2011 г. в соответствии с приказом МЗ РБ № 501 от 14.05.2011.

Антитела класса IgG к вирусу краснухи определяли с использованием иммуноферментной тест-системы производства Диапроф (Украина). Концентрацию антител рассчитывали МЕ/мл. Пороговой концентрацией считали 10 МЕ/мл. Выявление антител в концентрации 10-15 МЕ/мл рассматривали как свидетельство условной защищенности, более 15 мМЕ/мл — как свидетельство защищенности от краснухи [3, 4].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистического пакета компьютерной программы Microsoft Excel WindowsXP.

**Результаты и их обсуждение.** Проведенные исследования IgG антител к вирусу краснухи показали, что антитела в условно-защитной и защитной концентрации имели 709 из 756 (93,8±0,9%) обследованных (табл. 1). Условный уровень защиты (10-15 МЕ/мл) был отмечен у 2 (0,3%), у 707 (93,5%) антитела присутствовали в защитной концентрации (более 15 МЕ/мл).

Таблица 1 — Популяционный иммунитет к краснухе в различных возрастных группах населения Республики Беларусь, 2011 г.

Возраст, лет	Число обследованных	Число серопозитивных	% серопозитивных	Из них с концентрацией IgG-антител, МЕ/мл (%)		Среднегрупповая концентрация антител, мМЕ/мл
				10-15	> 15	
1-5	171	143	83,6±2,8	0	143	151,0
6-10	99	98	99,0±1,0	0	98	160,0
11-14	80	80	100,0±1,2	0	80	144,0
15-19	92	89	96,7±1,9	0	89	163,0
20-29	101	90	89,1±3,1	0	90	155,0
30-39	97	93	95,9±2,0	1	92	158,0
40-49	63	63	100,0±1,5	1	62	157,0
50-60	53	53	100,0±1,8	0	53	157,0
Всего	756	709	93,8±0,9	2	707	155,0

В возрастной группе 1–5 лет уровень иммунитета к краснухе был недостаточно высоким (83,6±2,8%). Анализ вакцинального статуса обследованных данной возрастной группы показал, что среди вошедшего в эту группу 61 ребенка в возрасте 12–24 мес. только 50 (82,0%) были привиты вакциной КПК и 18 из них были вакцинированы в интервале нескольких дней до забора материала для исследования, и соответственно еще не успели ответить выработкой иммунитета. Наличие среди обследованных большого числа не привитых детей и детей, привитых непосредственно перед обследованием, и обусловило низкий уровень серопозитивности.

Среди детей в возрасте 2–5 лет антитела к краснухе были выявлены в 95,5% случаев. В возрастных группах 6–10, 11–14, 15–19 лет уровень серопозитивных к краснухе составил 99,0±1,2 100±1,2 и 96,7±1,9% соответственно. Лица в возрасте 30–39 лет, а также 40 лет и старше были иммунны против краснухи в 95,9±2% и 100±1,6% случаев соответственно.

Особого внимания заслуживает группа лиц 20–29 лет, где уровень популяционного иммунитета к краснухе составил 89,1%. Поскольку от проведения в 2006 г. кампании дополнительных мероприятий по иммунизации против краснухи лиц в возрасте 11–19 лет прошло 5 лет, к настоящему времени население в возрасте до 24 лет получило по крайней мере одну дозу вакцины против краснухи, среди лиц более старшего возраста иммунитет в основном формировался за счет встречи с диким вирусом краснухи. Среди 101 обследованного в возрасте 20–29 лет 42 были в возрасте до 24 лет (20–23 года), 59 — старше 24 лет (24–29 лет). У всех обследованных возрастной группы 20–23 года были выявлены антитела к краснухе. Среди 59 обследованных 24–29 лет серопозитивными к краснухе были 48 (81,4±5,1%).

Территориальный анализ уровня иммунитета к краснухе среди лиц 1–60 лет показал следующее. Наиболее высокий уровень серопозитивных отмечался в Витебской области (97,1±1,6%), наименьший — в Минской области (89,3±3,1%) (табл. 2). Различия в уровне популяционного иммунитета к краснухе в этих двух областях достоверны ( $p < 0,05$ ). Без учета лиц 12–24 месяцев (т.е. возрастная группа 2–60 лет) во всех областях страны популяционный иммунитет к краснухе приблизился к 95% уровню либо достиг этого уровня (Минская область 94,7%, г. Минск — 94,8%, Гомельская область — 95%, Гродненская — 96,1%, Брестская — 97,9%, Могилевская — 98,1%, Витебская — 99,0%).

Таблица 2 — Популяционный иммунитет к краснухе в областях Республики Беларусь, 2011 г.

Регион	Число обследованных	Число серопозитивные	% серопозитивных	Из них с концентрацией IgG-антител, мМЕ/мл (%)		Среднегрупповая концентрация антител, мМЕ/мл
				10-15	> 15	
Брестская	105	101	96,2±1,9	0	101	174,0
Витебская	105	102	97,1±1,6	0	102	161,0
Гомельская	109	99	90,8±2,8	1	98	158,0
Гродненская	112	106	94,6±2,1	0	106	145,0
Минская	103	92	89,3±3,1	0	92	148,0
Могилевская	119	115	96,6±1,7	1	114	154,0
г. Минск	103	94	91,3±2,8	0	94	147,0
Всего	756	709	93,8±0,9	2	707	155,0

Практически во всех регионах страны, за исключением Могилевской области, наиболее низкий уровень иммунной прослойки к краснухе был выявлен среди лиц 24–29 лет

(Минская обл. — 60,0%, г. Минск — 72,7%, Гродненская — 75,0%, Брестская обл. — 83,3%, Витебская обл. — 83,3%, Гомельская — 87,5%). В возрастной группе 30–39 лет доля серопозитивных не достигала 95% в Могилевской (92,9%), Минской (92,7%), Брестской (90,9%) и Гомельской (93,3%) областях.

В соответствии с расчетными данными, пороговым уровнем иммунитета в отношении краснухи, достаточным для предотвращения широкого распространения вируса, является 82–87% иммунных [5]. Полученные данные свидетельствуют о том, что необходимый уровень иммунитета в стране достигнут. Доля серопозитивных среди лиц в возрасте 1–60 лет составила 93,8±0,9%, 2–60 лет 96,5±0,7%. Низкий процент серопозитивных (83,6±2,8%) выявлен в возрастной группе 1–5 лет, что связано с наличием в этой группе большой доли непривитых детей возраста 12–24 мес. Для повышения уровня иммунной прослойки среди детей этого возраста необходимо повысить своевременность охвата плановой вакцинацией вакциной корь-паротит-краснуха.

Более низкая в сравнении с другими возрастными группами прослойка серопозитивных к краснухе отмечается среди лиц 24–29 лет (81,4±5,1%) и 30–39 лет (95,9±2,0%). Наличие восприимчивых к краснухе женщин среди лиц этого возраста несет опасность инфицирования во время беременности и рождения ребенка с синдромом врожденной краснухи. Целесообразно обеспечить вакцинацию против краснухи серонегативных женщин детородного возраста.

#### Литература

1. Renewed commitment to elimination of measles and rubella and prevention of congenital rubella syndrome by 2015 and Sustained support for polio-free status in the WHO European Region: Resolution of World Health Organization [Electronic resource] // 16th session of Regional Committee for Europe. Moscow, Russia, 13-16 Sept. 2010. – Mode of access: [http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0016/122236/RC60\\_eRes12.pdf](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0016/122236/RC60_eRes12.pdf). – Date of access: 20.08.2012.
2. Лабораторная диагностика и мониторинг циркуляции возбудителя в системе эпидемиологического надзора за краснухой в Республике Беларусь / Е.О. Самойлович [и др.] // Журн. микробиол. – 2010. – № 1. – С. 55-60.
3. Level of rubella antibody among vaccinated and unvaccinated Portuguese mothers and their newborns / G. Concalves [et al.] // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24, N 49-50. – P. 7142-7147.
4. Skendzel, L.P. Rubella immunity. Defining the level of protective antibody / L.P. Skendzel // *Am. J. Clin. Patjol.* – 1996. – Vol. 106, № 2. – P. 170-174.
5. Мэй, Р. Инфекционные болезни человека. Динамика и контроль: пер. с англ. / Р. Мэй, Р. Андерсон. – М.: Мир, «Научный мир», 2004. – 784 с.

Поступила 23.08.2012

## HERD IMMUNITY TO RUBELLA IN THE REPUBLIC OF BELARUS, 2011

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

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

The aim of the investigation was to study the level of herd immunity in different age and territorial group of population. The investigation of 756 sera samples collected in all seven regions of Belarus for specific rubella virus IgG antibodies showed that 709 (93,8%) of them was seropositive. The threshold level of immunity (82-87%) was reached in all regions. The analysis of herd immunity in different age groups revealed that the lowest level of immunity has children 12–24 months and adults 24–29 years old. To enhance the immunity level among the children of this age need it is recommended to improve the timeliness of the vaccination with measles-mumps-rubella vaccine. The presence of rubella-susceptible women among 24–29 and 30–39 age groups is at risk of infection during pregnancy and the birth of a child with congenital rubella syndrome. It is advisable to provide vaccinations against rubella seronegative women of childbearing age.

**Keywords:** rubella, herd immunity.

## ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА И ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКИМ ПАРОТИТОМ

Шиманович В.П.<sup>1</sup>, Самойлович Е.О.<sup>2</sup>, Семейко Г.В.<sup>2</sup>, Свирчевская Е.Ю.<sup>2</sup>, Ермолович М.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья;

<sup>2</sup>РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

**Резюме.** Использование в Республике Беларусь вакцины против кори, паротита и краснухи (с 1996 г. одной дозы, с 2000 г. двух доз) позволило сформировать достаточно высокий уровень популяционного иммунитета у детей. Среди детей в возрасте 2–16 лет уровень серопозитивных составил  $88,55\% \pm 1,7\%$ , что обеспечило низкий уровень заболеваемости эпидемическим паротитом (эпидпаротитом) в этой возрастной группе —  $0,82 \pm 0,24$  на 100 тысяч населения. Среди лиц в возрасте 17–31 год, которые в соответствии с принятой ранее в стране схемой иммунизации могли получить лишь одну дозу моновакцины против эпидпаротита, регистрируется самый высокий уровень заболеваемости, что соответствует низкому уровню популяционного иммунитета —  $78,36 \pm 3,1\%$ . В возрастной группе 32 года и старше низкий уровень заболеваемости эпидпаротитом обусловлен высоким уровнем постинфекционного иммунитета —  $90,1 \pm 2,2\%$ . Низкий уровень популяционного иммунитета у детей 12–24 месяца года связан с наличием среди обследованных большого числа не привитых детей и детей, привитых непосредственно перед обследованием, и поэтому не успевших ответить выработкой иммунитета.

**Ключевые слова:** эпидемический паротит, популяционный иммунитет, вакцинация, заболеваемость

**Введение.** Эпидемический паротит (эпидпаротит) — острое инфекционное заболевание, вызываемое вирусом паротита, принадлежащим семейству *Paramyxoviridae*. Типичная клиническая картина воспаления околоушных желез (паротит) отмечается в 30–40% случаев, около 50% случаев протекают без специфических симптомов или с симптомами острой респираторной инфекции, около 30% случаев инфекции могут протекать бессимптомно. Для этой инфекции характерны такие серьезные осложнения как орхит, менингит, энцефалит, оофорит и панкреатит и др. [1].

Основным средством профилактики эпидпаротита является вакцинация. В Республике Беларусь иммунизация против эпидпаротита введена с 1980 г. среди детей в возрасте 15–18 месяцев с использованием моновакцины. В период проведения однократной вакцинации с моновакциной (1980–1995 гг.) охват профилактическими прививками не достигал 90% и варьировал от 4,77% в 1981 г. до 89,29% в 1995 г. При переходе на использование трехкомпонентной вакцины (вакцина КПК) при сохранении однодозовой схемы иммунизации (1996–1999 гг.) произошло увеличение уровня охвата вакцинацией, который превысил 95% и к 1999 г. достиг 98,13%. На протяжении последующих лет (с 2000 г. по настоящее время) при переходе на двукратную вакцинацию охват двумя дозами вакцины КПК был выше 97%, за исключением 2000 г., когда охват второй дозой составил около 70%.

По данным литературы, эффективность используемых в мире вакцин против эпидпаротита оценивается от 54 до 99% в зависимости от входящих в состав вакцин штаммов вируса паротита [2]. Как показывают результаты исследований по оценке эффективности вакцин, проведенных в Великобритании, 90% охват двумя дозами вакцины КПК обеспечивает эффективность около 87% [3]. На основании расчетных данных, критический (пороговый) уровень популяционного иммунитета, достаточный для предотвращения распространения вируса паротита, должен составлять не менее 85–90% [4].

Использование двухдозовой вакцинации с использованием вакцины КПК позволило существенно снизить заболеваемость эпидпаротитом. Отдельным странам (Финляндия)

практически удалось элиминировать эту инфекцию [5]. Однако ряд исследований показали, что эффективность вакцинации двумя дозами вакцины КПК оказалась не такой высокой, как ожидалось, и в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками регистрируются вспышки эпидпаротита [6–8].

Внедрение вакцинации существенным образом снизило заболеваемость эпидемическим паротитом в Республике Беларусь: с 269,5 на 100000 населения в довакцинальный период (1954–1979 гг.) до 0,92 на 100 000 в 2010 г. [9]. До середины декабря 2010 г. диагностика эпидпаротита была основана на клинических и эпидемиологических данных. Чтобы дифференцировать случаи эпидпаротита от других неспецифических поражений слюнных желез на основании решения Министерства здравоохранения с середины декабря 2010 г. подозрительные на эпидпаротит случаи подлежат лабораторному обследованию. Критериями лабораторного подтверждения являлись выявление IgM антител к вирусу паротита в сыворотке крови, определение РНК вируса паротита в клинических образцах (носоглоточный смыв (НГС) или моча) методом ПЦР, а также изоляция вируса паротита в культуре клеток Vero из клинических образцов с последующей идентификацией методом ПЦР. Полученный положительный результат по крайней мере в одном из методов исследования считался лабораторным подтверждением диагноза эпидпаротит.

Цель исследования: определить влияние уровня популяционного иммунитета на заболеваемость эпидпаротитом среди различных возрастных групп населения в Республике Беларусь, в том числе у лиц, привитых с использованием различных схем вакцинации, для принятия решения о дальнейшей тактике иммунизации против эпидпаротита в стране.

**Материалы и методы.** Больные, подозрительные на эпидпаротит, были выявлены врачами поликлиник и больниц во всех 7 регионах страны среди лиц, обратившихся за медицинской помощью. С середины декабря 2010 г. до июля 2012 г. было выявлено 354 подозрительных больных, клинические образцы (сыворотка крови, моча и/или НГС) от них были направлены на исследование в Национальную лабораторию по кори и краснухе (ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»), аккредитованную ЕРБ ВОЗ. От 147 пациентов была собрана и направлена на исследование только сыворотка крови, от 192 — сыворотка крови, моча и/или НГС, от 15 — только моча и/или НГС.

Выявление IgM антител к вирусу паротита было проведено с использованием иммуноферментной тест-системы Serion ELISA classic Mumps IgM с абсорбентом ревматоидного фактора (Virion\Serion, Германия).

Изоляция вируса паротита была выполнена путем инокуляции образцов НГС и мочи в клетки Vero и инкубированием их при температуре 37 °С в течение 7 дней. Выделение вирусной РНК из НГС, мочи и культуральной жидкости проводили, используя набор QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) или набор 5 MagMAX — 96 Viral Isolation Kit (Ambion, США) с помощью автоматизированной станции для выделения нуклеиновых кислот MagMAX Express (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя.

Для оценки популяционного иммунитета исследованы сыворотки крови 756 человек в возрасте 1-60 лет из всех 7 регионов страны, собранные методом случайной выборки. Забор сывороток крови был осуществлен в мае-июне 2011 г. в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 501 от 14.05.2011 г.

Антитела класса IgG к вирусу паротита определяли с использованием иммуноферментной тест-системы производства Virion/Serion, Германия. Концентрацию антител рассчитывали в международных единицах на мл (МЕ/мл). Пороговой концентрацией считали 70 мМЕ/мл. Выявление антител в концентрации 70-100 мМЕ/мл рассматривали как свидетельство условной защищенности, выявление антител в концентрации более 100 мМЕ/мл — как свидетельство защищенности от эпидпаротита.

Статистический анализ проводили с использованием компьютерной программы STATISTICA 8.0 и EXEL.

**Результаты и их обсуждение.** С середины декабря 2010 г. до июля 2012 г. диагноз эпидпаротита лабораторно подтвержден у 90 (25,4%) из 354 обследованных подозрительных на эпидпаротит больных, из них в 2011 г. зарегистрировано 57 случаев, в январе-июне 2012 г. — 33 случая. Для 65 случаев лабораторное подтверждение было основано на определении специфических IgM, в 10 случаях — на выделении вируса или выявлении РНК вируса в НГС или моче, 15 случаев были подтверждены и серологическим, и вирусологическим методами. Вирус был изолирован в культуре клеток от 8 больных эпидпаротитом.

Лабораторно подтвержденные случаи эпидпаротита были зарегистрированы среди лиц в возрасте 1-39 лет во всех регионах страны, в том числе в Брестской области — 11 случаев, в Витебской области — 4 случая, в Гомельской области — 10 случаев, в Гродненской области — 10 случаев, в г. Минске — 30 случаев, в Минской области — 5 случаев, в Могилевской области — 20 случаев.

Для оценки влияния популяционного иммунитета населения на заболеваемость эпидпаротитом были выделены следующие возрастные группы населения: 1 год, 2-16 лет, 17-31 год, 32 года и старше. Целесообразность выделения именно этих возрастных групп была обусловлена использованием различных схем иммунизации против эпидпаротита. В соответствии с Национальным календарем профилактических прививок дети в возрасте 1 год получают первую дозу вакцины КПК. Дети возрастной когорты 2-16 лет должны были получить одну (до 6 лет) или две (старше 6 лет) дозы вакцины КПК, лица в возрасте 17–31 год — одну дозу моновалентной вакцины Российского производства. Лица 32 лет и старше не были вакцинированы, и сформировавшийся у них иммунитет мог быть обусловлен только встречей с диким вирусом паротита.

Анализ данных заболеваемости эпидпаротитом показал, что в 2011 г. среди детей в возрасте 1 год зарегистрировано 7 случаев (7/57, 12,28%) эпидпаротита. Все случаи заболевания развились в течение 13-27 дней после вакцинации вакциной КПК и были расценены как вакциноассоциированные. Анализ данных популяционного иммунитета показал, что доля иммунных детей в данной возрастной группе составила  $55,74 \pm 6,4\%$ . Низкий уровень популяционного иммунитета в этой возрастной группе связан с наличием среди обследованных большого числа не привитых детей и детей, привитых непосредственно перед обследованием, и поэтому не успевших ответить выработкой иммунитета. Показатель заболеваемости эпидпаротитом среди детей в возрасте 1 год был обусловлен именно вакциноассоциированными случаями и в 2011 г. составил  $6,65 \pm 2,51$  на 100 тысяч населения. За 6 месяцев 2012 г. было зарегистрировано 5 случаев (5/33; 15,15%) вакциноассоциированного эпидпаротита среди детей в возрасте 1 год, показатель заболеваемости составил  $4,68 \pm 2,09$  на 100 тысяч населения.

Таблица — Уровень популяционного иммунитета и заболеваемость эпидпаротитом в разных возрастных групп населения Республики Беларусь, 2011 г. — 6 месяцев 2012 г.

Возраст, лет	Уровень популяционного иммунитета в 2011 г.	Заболеваемость эпидпаротитом в 2011 г.		Заболеваемость эпидпаротитом за 6 мес. 2012 г.	
		число случаев / удельный вес, %	на 100 тыс. насел.	число случаев / удельный вес, %	на 100 тыс. насел.
1 год	55,74±6,4	7/12,28	6,65	5/15,15	4,68
2-16 лет	88,55±1,7	12/21,05	0,82	6/18,18	0,41
17-31год	78,36±3,1	34/59,65	1,56	19/57,58	0,88
32 года и больше	90,10±2,2	4/7,02	0,08	3/9,09	0,06

В возрастной группе 2-16 лет уровень серопозитивных лиц являлся достаточно высоким независимо от применяемых вакцин (вакцина против кори, паротита, краснухи, Serum Institute of India; вакцина Тримовакс, Авертис Пастер, Франция, вакцина Приорикс, ГлаксоСмитКляйн, Бельгия) и составил  $88,55\% \pm 1,7\%$ , что обеспечило низкий уровень заболеваемости —  $0,82 \pm 0,24$  на 100 тыс. населения. В 2011 г. среди детей этого возраста зарегистрировано 12 случаев эпидпаротита: 2 из них являлись вакциноассоциированными (у детей в 6 лет после введения второй дозы вакцины). За 6 месяцев 2012 г. среди детей 2-16 лет заболеваемость продолжала регистрироваться на низком уровне (6 случаев), показатель составил  $0,41 \pm 0,17$  на 100 тыс. населения. Среди 6 случаев эпидпаротита в этой возрастной группе один являлся вакциноассоциированным.

Согласно возрастному распределению, большинство заболевших в 2011 г. относились к возрастной группе 17-31 лет ( $34/57$ ;  $59,65\%$ ), что обеспечило высокий показатель заболеваемости —  $1,56 \pm 0,27$  на 100 тыс. населения и соответствовало низкому уровню популяционного иммунитета в данной возрастной группе ( $78,36 \pm 3,1\%$ ). За 6 месяцев 2012 г. среди всех заболевших эпидпаротитом также преобладали лица в возрасте 17-31 год, их удельный вес составил  $57,78\%$  ( $19/33$ ). В соответствии с проводимой тактикой иммунизации лица в возрасте 17-31 год могли получить всего лишь одну дозу моновалентной вакцины.

Анализ постинфекционного популяционного иммунитета у лиц в возрасте 32 года и старше показал, что уровень иммунных лиц в этой возрастной группе был наиболее высокий по сравнению с другими группами и составил  $90,1 \pm 2,2\%$ , показатель заболеваемости оказался наиболее низким и составил  $0,08 \pm 0,04$  на 100 тысяч населения. Доля иммунных лиц увеличивалась с возрастом и составила  $85,54 \pm 3,9\%$  в возрасте 32-40 лет,  $93,55 \pm 3,1\%$  — в возрасте 41-50 лет,  $93,62 \pm 3,6\%$  — в возрасте 50 лет и старше. Случаи эпидпаротита в 2011 г. регистрировались только среди лиц в возрасте 31-39 лет (4 случая), среди лиц 40 лет и старше случаев инфекции выявлено не было. Высокий уровень популяционного иммунитета среди лиц в возрасте 32 года и старше обеспечил также и низкий уровень заболеваемости эпидпаротитом в течение 6 месяцев 2012 г. —  $0,06$  на 100 тысяч населения (3 случая заболевания).

Заключение. Таким образом, полученные данные показывают, что в возрастных группах населения 12-24 месяца и 17-31 год популяционный иммунитет не достиг порогового уровня (85-90%). Именно в этих возрастных группах населения заболеваемость эпидпаротитом была наиболее высокой, хотя определенный риск заболеть эпидпаротитом существует в любом возрасте. Если увеличение уровня популяционного иммунитета у детей 12-24 месяцев может быть достигнуто за счет своевременной вакцинации вакциной КПК в возрасте 12 месяцев, то повысить популяционный иммунитет в возрастной группе 17-31 год можно только за счет дополнительных мероприятий по иммунизации.

#### Литература

1. Plotkin, S.A. Mumps vaccine / S.A. Plotkin, S.A. Rubin // Vaccines: 5th ed. – Philadelphia: Elsevier, 2008. – P. 435-465.
2. Increased mumps incidence in the Netherlands: Review on the possible role of vaccine strain and genotype [Electronic resource] / P. Kaaijk [et al.] // Eurosurveillance. – 2008. – Vol. 13, N 4-6. – Mode of access : <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18843>. – Data of access : 20.08.2102.
3. Hviid, A. Mumps / A. Hviid, S. Rubin, K. Muhlemann // Lancet. – 2008. – Vol. 371. – P. 932-944.
4. Мэй, Р. Инфекционные болезни человека. Динамика и контроль: пер. с англ. / Р. Мэй, Р. Андерсон. – М.: Мир, «Научный мир», 2004. – 784 с.
5. Mumps and rubella eliminated from Finland / H. Peltola [et al.] // J. Am. Med. Assoc. – 2000. – Vol. 284, N 20. – P. 2643-2647.
6. An outbreak of mumps in the metropolitan area of Walsall, UK / R.N. Pugh [et al.] // Int. J. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 6, N 4. – P. 283-287.
7. Vaccine effectiveness estimates, 2004-2005 mumps outbreak, England / C. Cohen [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 13, N 1. – P. 12-17.
8. Mumps outbreak at a summer camp – New York, 2005 / Centers for Disease Control, Prevention // MMWR Morb. Mortal. Weekly Rep. – 2006. – Vol. 55, N 7. – P. 175-177.
9. Шиманович, В.П. Влияние иммунизации на заболеваемость эпидемическим паротитом / В.П. Шиманович, Е.О. Самойлович // Здоровоохранение. – 2011. – № 12. – С. 47-50.

## AGE FEATURES OF POPULATION IMMUNITY AND THE INCIDENCE OF MUMPS

Shimanovich V.P.<sup>1</sup>, Samoilovich E.O.<sup>2</sup>, Semeiko G.V.<sup>2</sup>, Svirchevskaya E.J.<sup>2</sup>, Yermalovich M.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health;

<sup>2</sup>Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

Using from 1996 the vaccine against measles, mumps and rubella (MMR) allowed to form a high level (88,55%) of herd immunity against mumps among persons 2-16 years old that resulted in 2011-2012 in a low incidence rate of mumps in this age group — 0,82 per 100 000 population. Among persons 17-31 years old who could only get one dose of monovalent mumps vaccine the herd immunity was only 78,36% and the highest incidence of mumps was recorded. In unvaccinated adults 32 years old and older the lowest incidence of mumps was reported that was in accordance with as high level of postinfection immunity as 90,1% found in this cohort.

**Keywords:** mumps, herd immunity, vaccination, incidence

## ХАРАКТЕРИСТИКА АТТЕНУИРОВАННОГО ЖИВОГО ВАКЦИННОГО ШТАММА ВИРУСА ПАРОТИТА «ЛЕНИНГРАД-3»: НЕЙРОВИРУЛЕНТНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ

Отрашевская Е.В., Букин Е.К., Рубин С., Игнатъев Г.М.

ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России, Москва, Россия

Проведена оценка уровня нейровирулентности штамма вируса паротита (ВП) «Ленинград-3» («Л-3») из разных лотов посевных и готовых форм вакцины (ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ) и сравнение его с нейровирулентностью «диких» штаммов ВП разных генотипов («Dragoon» — генотип «С», номер GenBank AY681495, «London-1» — генотип D, «PetroNov» — генотип «Н», номер GenBank AY669145, «88-1961» — генотип Н), в том числе изолированных на территории России, с использованием теста на сосунках крыс, одобренного ВОЗ. Индекс нейровирулентности (ИН) вакцинного штамма ВП «Ленинград-3» (<4.0) был значительно ниже ИН «диких» штаммов ВП (6.1-15.2), использовавшихся для сравнения. ИН вакцинного штамма «Л-3» соответствовал уровню (0-5) ранее определенному для аттенуированных вакцинных штаммов ВП. Данные, полученные при исследовании вакцинного штамма ВП «Л-3», позволяют охарактеризовать его как стабильно низко нейровирулентный (рисунок 1 и 2).

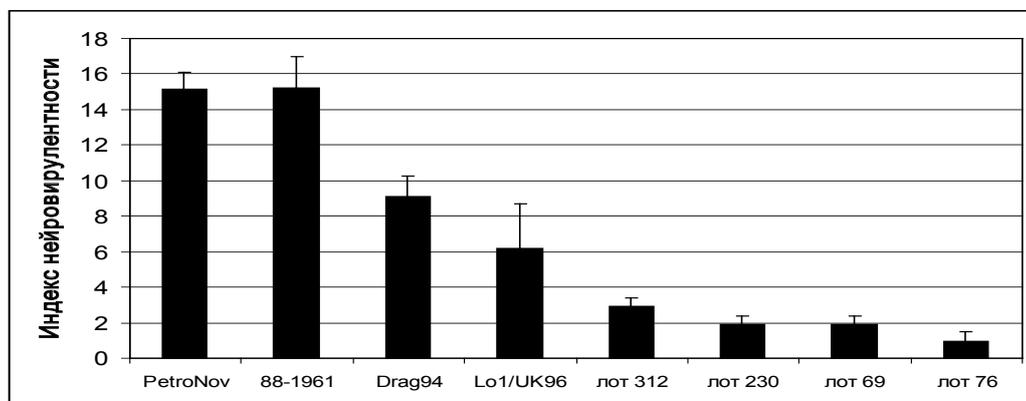


Рисунок 1 — Индексы нейровирулентности вакцинного штамма «Ленинград-3» в посевных и готовых формах вакцины, а также «диких» штаммов ВП разных генотипов в тесте на сосунках крыс (10 животных в каждой группе)

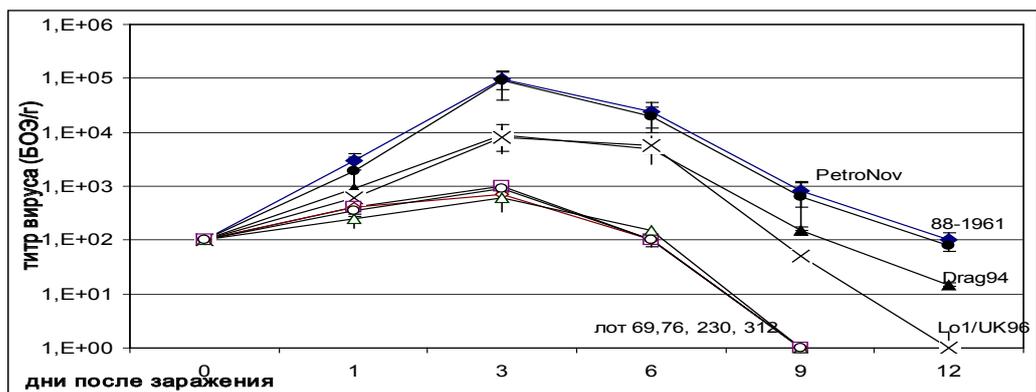


Рисунок 2 — Титр ВП в мозгах сосунков крыс (10 животных в каждой группе) в динамике после интрацеребрального заражения разными штаммами ВП, в том числе штаммом «Ленинград-3» из посевных и готовых формах вакцины

Были изучен спектр и кинетика гуморального специфического иммунитета у 60 здоровых добровольцев, привитых паротитной вакциной, содержащей штамм ВП «Л-3». Уровень специфических IgG измеряли в ИФА и в реакции нейтрализации (РН). Реакцию нейтрализации проводили с вакцинными штаммами ВП: «Л-3», «Enders» (генотип А) и «Urabe» (генотип В), а также с «дикими» штаммами ВП: «Dragoon» (генотип «С», номер GenBank AY681495), «London-1» (генотип D), любезно предоставленным доктором S. Rubin (FDA, США), и «PetroNov» (генотип «Н», номер GenBank AY669145). Максимум функциональной активности гуморального иммунитета был зарегистрирован в среднем на 18 месяце после вакцинации. В течение трех лет после вакцинации, начиная с шестого месяца, специфические IgG нейтрализовали все 6 штаммов ВП с разной степенью активности в зависимости от генотипа. Нейтрализующие титры (НТ) к штамму Л-3 были в 1.3-1.7 раза выше титров к гетерологичным штаммам ВП на всем периоде наблюдения. Несмотря на тенденцию к снижению уровня специфических IgG, у всех добровольцев в течение 3 лет после вакцинации титры IgG в ИФА сохранились на уровне  $> 2.5$  -lg, НТ к штамму Л-3  $\geq 3$  -log<sub>2</sub>, а титры к 5 гетерологичным штаммам ВП  $\geq 2$  -log<sub>2</sub> (рисунок 3).

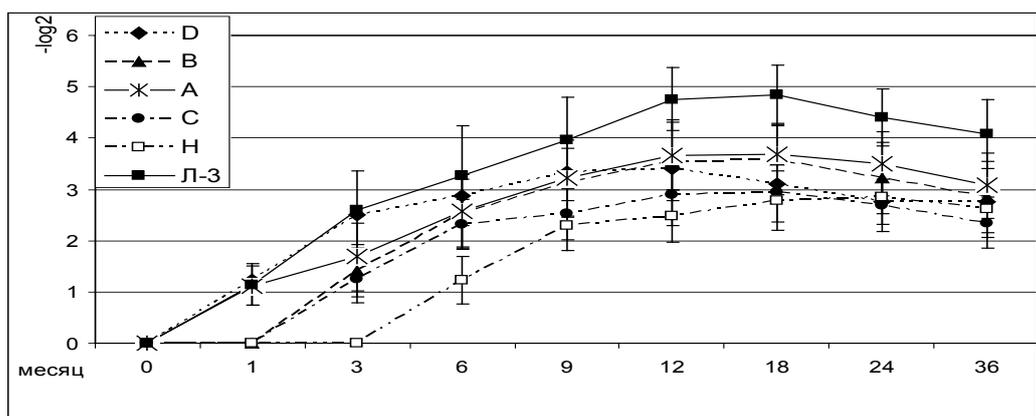


Рисунок 3 — Спектр и динамика нейтрализующей активности специфических IgG к разным генотипам ВП у 60 добровольцев, привитых однократно паротитной вакциной, содержащей штамм ВП «Ленинград-3»

**Ключевые слова:** штамм вируса паротита, вакцина «Ленинград-3», нейровирулентность, иммуногенность.

Поступила 12.09.2102

## CHARACTERIZATION OF LENINGRAD-3 ATTENUATED LIVE MUMPS VACCINE STRAIN: NEUROVIRULENCE AND IMMUNOGENICITY

Otrashevskaja E.V., Bukin E.K., Rubin S., Ignatyev G.M.

*Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines,  
Ministry of Health and Social Department of the Russian Federation, Moscow, Russia*

The neurovirulence and replication potential of several mumps virus strains, including “Leningrad-3” (L-3) mumps vaccine virus (FSUE SIC “Microgen”, Russia) from the seed lots and two final product lots, and the wild type mumps virus (MuV) strains isolated in Russia («Dragoon» — genotype «C», GenBank AY681495, «London-1» — genotype D, «PetroNov» — genotype «H», GenBank AY669145, «88-1961» — genotype H), was assessed in rat test, approved by WHO. The mean neurovirulence scores of the “L-3” virus (<4.0) was significantly lower than those of wild type MuV strains (ranging from 6.1 to 15.2) and was in accordance with scores for other attenuated mumps vaccine strains (usually ranging from 0 to 5) determined by S. Rubin (2005). In general, the relative ability of the viruses to replicate in rat brain tracked with their neurovirulence scores. These results indicate a low neurovirulence potential of the “L-3” mumps vaccine virus for humans.

The persistence of antibodies against mumps induced by the mumps vaccine contained «L-3» virus strain and the kinetics of antibody neutralizing activity level and spectrum after the one vaccine dose were studied in the same cohort of healthy young adults for 3 years. Antibodies were measured by enzyme immunoassay and by plaque reduction neutralization (PRN) assay using the L-3 vaccine MuV and five more heterologous MuV strains of genotypes A, B, C, D and H as the targets in 3-year follow-up serum samples (n= 60) of once-vaccinated volunteers. PRN assay was performed with the vaccine MuVs «Л-3», «Enders» (genotype A) and «Urabe» (genotype B), as well as with the wild MuVs «Dragoon» (genotype «C», GenBank AY681495), «London-1» (genotype D), presented by Dr/ S. Rubin (FDA, USA), и «Petronov» (genotype «H», GenBank AY669145). Maximal functional activity of antibodies was registered in general on month 18 after vaccination. Antibody induced by immunization with the L-3 mumps vaccine strain neutralized five heterologous MuV strains starting from month 6 after vaccination at all time points tested thereafter. Neutralizing activity of the specific IgG was 1.3-1.7-fold lower against the heterologous MuVs (depending on genotype) than those against the vaccine strain. It was a waning immunity tendency over time; however, neutralizing titers against L-3 and five other MuV genotypes have been kept  $\geq 3$  -log<sub>2</sub> and  $\geq 2$  -log<sub>2</sub>, correspondingly, within the 3-year study period.

**Keywords:** mumps vaccine virus “Leningrad-3”, neurovirulence, immunogenicity.

## ОРГАНИЗАЦИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫМИ РЕАКЦИЯМИ И ПРОФИЛАКТИКА ПОСТИНЪЕКЦИОННЫХ АБСЦЕССОВ

Шмелева Н.Д.

*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск*

**Резюме.** Проведено наблюдение за местными побочными реакциями после введения АКДС вакцины 205 детям в возрасте 94±5,6 дня. У 53 (25,8±3,1%) регистрировались местные побочные реакции диаметром 2,0±1,7 см. Проанализировано 42 случая постинъекционных абсцессов после введения вакцин за период с 1990 по 2011 гг. и установлено, что первые симптомы осложнений возникали на 1-2-е сут. после инъекции вакцины, имели диаметр 3,6±2,7 см, не купировались спустя 48 ч. и потребовали хирургического вмешательства.

В 6 (40±12,6%) лабораторно исследованных случаях постинъекционных абсцессов выделены патогенные и условно-патогенные микроорганизмы.

**Ключевые слова:** эпидемиологический надзор, постинъекционный абсцесс, побочная реакция, вакцина, профилактическая прививка.

**Введение.** Организация мониторинга поствакцинальных реакций и осложнений является важным направлением эпидемиологического надзора за условиями безопасного проведения профилактических прививок. К поствакцинальным осложнениям относят заболевания, которые возникают вследствие введения вакцин и взаимосвязаны с процедурой проведения профилактической прививки [1, 2].

Постинъекционные абсцессы — нозологическая форма, которую в настоящее время относят к внутрибольничным инфекциям, связанным с нарушением стерильности во время инъекции [3]. При проведении профилактических прививок этот вид осложнения может быть вызван не только нарушением правил асептики, но и условий хранения или транспортировки вакцины, или возникает при неправильном ее использовании [4, 5]. Поэтому постинъекционные абсцессы после профилактических прививок следует первоначально относить к поствакцинальным осложнениям до выяснения причин, повлекших развитие заболевания.

Среди таких причин, выделяют недостаточную стерильность непосредственно при введении вакцины, замораживание адсорбированных вакцин, нарушение техники введения вакцины, а также процедурные ошибки [3, 6, 7]. Постинъекционный абсцесс может быть ассоциирован с недостаточной экспозицией антисептика, которая составляет 1-2 мин., в результате чего не обеспечиваются условия стерильности во время введения вакцины [5]. Асептический абсцесс (без микробной контаминации) возникает при введении адсорбированных вакцин, подвергавшихся замораживанию [7]. Такие случаи осложнений могут возникать при нарушении условий транспортировки вакцин в зимнее время: либо при их хранении в бытовом холодильнике на полке, соседствующей с морозильной камерой, либо при помещении вскрытой многодозной ампулы с вакциной в ячейку замороженного и не кондиционированного хладоэлемента [5]. Поверхностное подкожное введение адсорбированных вакцин также может сопровождаться образованием асептических абсцессов [4]. Еще одной из причин абсцессов после профилактических прививок является нарушение обязательной процедуры встряхивания многодозного флакона перед изъятием дозы вакцины [1, 5].

**Цель исследования:** разработка критериев выявления постинъекционных абсцессов в период медицинского наблюдения и оценка их эпидемиологической значимости.

**Материалы и методы.** Проведено наблюдение за побочными реакциями на введение АКДС вакцины у 205 детей в возрасте 94±5,6 дней. Профилактические прививки осуществлялись в соответствии с Национальным календарем по схеме 3-4-5 месяцев с интервалом 30±6,5 дней адсорбированной цельноклеточной коклюшно-дифтерийно-столбнячной (АКДС) вакциной.

Для анализа поствакцинальных рассмотрены 42 случая постинъекционных абсцессов на введение вакцин Национального календаря профилактических прививок, зарегистрированных у пациентов период в 1990-2011 гг. по данным внеочередных донесений и актов исследования осложнений в ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья».

Информация за побочными реакциями после вакцинации АКДС вносились в дневники наблюдения после каждой введенной дозы вакцины на протяжении 30 дней. Нами оценивались болезненность в месте введения вакцины, диаметр гиперемии и уплотнения в миллиметрах, а также сроки их появления и исчезновения.

Постинъекционные абсцессы сгруппированы по датам проведения профилактических прививок, срокам возникновения и выявления, диаметру инфильтрата и причинам развития.

Далее был проведен анализ полученных материалов и сопоставление сроков появления первых признаков абсцесса с информацией о медицинском наблюдении за побочными реакциями.

Взятые для исследования данные были статистически обработаны при помощи приложения Статистика 6.0. Достоверность результатов анализа относительных величин оценивалась при помощи критерия Стьюдента при уровне статистической значимости  $p < 0,05$  [8].

**Результаты и их обсуждение.** При проведении наблюдения за побочными реакциями у детей было установлено, что местные реакции, сопровождавшиеся гиперемией, уплотнением и болезненностью отмечалась с частотой  $25,8 \pm 3,1\%$  (у 53 детей). В 52 случаях регистрируемые местные реакции исчезли спустя двое суток после появления, удельный вес составил  $98,1 \pm 1,8\%$  и в 1 случае — через три дня после появления, что сопоставимо с информацией о побочных реакциях инструкции по применению вакцины АКДС [1]. По данным других исследователей побочные реакции в месте введения вакцины АКДС могут достигать до  $50,0\%$  [6]. Большая часть таких местных появлений связана с процедурой инъекции вакцины и представляет собой реакцию на укол в виде гиперемии до 2 мм в диаметре [9]. Гиперемия в месте введения вакцины диаметром от 3 до 55 мм, в среднем  $2,0 \pm 1,7$  см (исключая случаи реакции на укол диаметром  $\geq 2$  мм), наблюдалась у 30 ( $14,6 \pm 2,4\%$ ) привитых детей на первую дозу вакцины, после второй дозы — у 32 ( $15,6 \pm 2,5\%$ ) и после третьей — у 48 ( $23,4 \pm 2,9\%$ ) (табл.).

Таблица — Диапазон местных побочных реакций на введение вакцины АКДС после проведения первичной вакцинации

Симптомы побочной реакции	Доза вакцины АКДС					
	V1		V2		V3	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Гиперемия всего	30	$14,6 \pm 2,5$	32	$15,6 \pm 2,5$	48	$23,4 \pm 3,0$
в т.ч.: 3-20 мм	29	$14,1 \pm 2,4$	31	$15,1 \pm 2,5$	46	$22,4 \pm 2,9$
>20 мм	1	$0,5 \pm 0,5$	1	$0,5 \pm 0,5$	2	$1,0 \pm 0,7$
Уплотнение всего:	28	$13,7 \pm 2,4$	28	$13,7 \pm 2,4$	30	$14,6 \pm 2,5$
в т.ч.: >20 мм	27	$13,2 \pm 2,4$	25	$12,2 \pm 2,3$	27	$13,2 \pm 2,4$
20 мм и >	1	$0,5 \pm 0,5$	3	$1,46 \pm 0,8$	3	$1,46 \pm 0,8$
Болезненность	27	$13,2 \pm 2,4$	16	$7,8 \pm 1,9$	19	$9,27 \pm 2,0$

Уплотнение в месте введения вакцины после первой дозы возникало у 28 ( $13,6 \pm 2,3\%$ ) получивших АКДС вакцину, после второй дозы с такой же частотой и после третьей дозы — у 30 ( $14,6 \pm 2,4\%$ ) человек. Проведение вакцинации сопровождалось болезненностью после первого введения вакцины в 27 случаях ( $13,2 \pm 2,4\%$ ); второго — в 16 ( $7,8 \pm 1,9\%$ ), третьего — в 19 ( $9,27 \pm 2,0\%$ ).

Но при этом вне зависимости от степени выраженности проявлений большая часть и частота регистрации местных реакций в виде покраснения и инфильтрата находилась в пределах диапазона, предусмотренного инструкцией по применению вакцины АКДС [10]. Однако истинная значимость регистрации свыше 20 мм не выходила за рамки критериев (не более 2%), установленных для этих побочных реакций, и заключается в дифференцировании ожидаемых реакций с явлениями постинъекционного абсцесса.

Данные симптомы должны регистрироваться в ходе медицинского наблюдения за пациентами с целью активного выявления состояний подозрительных на поствакцинальные осложнения. Важен не столько сам факт появления таких реакций, сколько благополучное разрешение возникших симптомов в сроки, проведения медицинского наблюдения, о чем свидетельствуют результаты анализа зарегистрированных постинъекционных абсцессов. Во всех случаях постинъекционный абсцесс начинался как местная реакция в виде гиперемии диаметром от 10 до 50 мм, в среднем  $3,6 \pm 2,7$  см, инфильтрата или уплотнения, сопровождавшихся болезненностью. Появление инфильтратов наблюдалось на 1-2-е сут. после профилактической прививки, в те же сроки когда появляются побочные реакции. В 9 ( $21,5 \pm 6,4\%$ ) случаях местные симптомы абсцесса сопровождались повышением температуры до  $37,5-39,0$  °С. Во всех случаях постинъекционных абсцессов проявления местной реакции не исчезали в течение 2-х сут. и носили постоянный характер и нарастающую динамику вплоть до момента выявления. Диагноз постинъекционный абсцесс был установлен в ранние сроки (до 14 дней от момента проведения прививки) в 29 ( $69,1 \pm 7,2\%$ ) случаях, в остальных обращении за медицинской помощью происходило в более поздние сроки — от 17 дней до 6 мес. (согласно данным актов расследования осложнений).

Эпидемическая значимость постинъекционных абсцессов после профилактических прививок определяется частотой их регистрации и долей данного вида осложнений среди общего количества поствакцинальных осложнений. Всего за период с 1990 по 2010 гг. было зарегистрировано 39 случаев постинъекционных абсцессов на введение вакцин Национального календаря профилактических прививок; их доля составила 9,1% от всех случаев поствакцинальных осложнений за 2003-2010 гг.

Постинъекционный абсцесс может возникнуть после введения любой вакцины, поскольку причины появления этого вида осложнения могут быть связаны как с особенностями состава самой вакцины, так и с нарушением правил асептики [5]. Тем не менее, риск появления постинъекционного абсцесса выше при введении адсорбированных вакцин, поскольку состав этой группы иммунобиологических лекарственных средств содержит в себе адьювант — компонент, который при неправильном использовании или хранении вакцины сам по себе может стать причиной абсцесса даже при соблюдении условий асептики [7]. Все 39 проанализированных случаев постинъекционных абсцессов (100%) регистрировались после введения адсорбированных вакцин. Структура постинъекционных абсцессов, возникших после введения разных видов вакцин, выглядит следующим образом: 38 случаев ( $90,3 \pm 4,9\%$ ) возникло после введения коклюшно-дифтерийно-столбнячных комплексных вакцин, 3 ( $7,1 \pm 3,5\%$ ) — после дифтерийно-столбнячных анатоксинов и 1 случай — после введения вакцины Акт-Хиб. По отношению к числу детей, получивших профилактические прививки данными видами вакцин, частота возникновения постинъекционного абсцесса составила от 0,001% в 2007 г. до 0,014% в 2006 г. (рис).

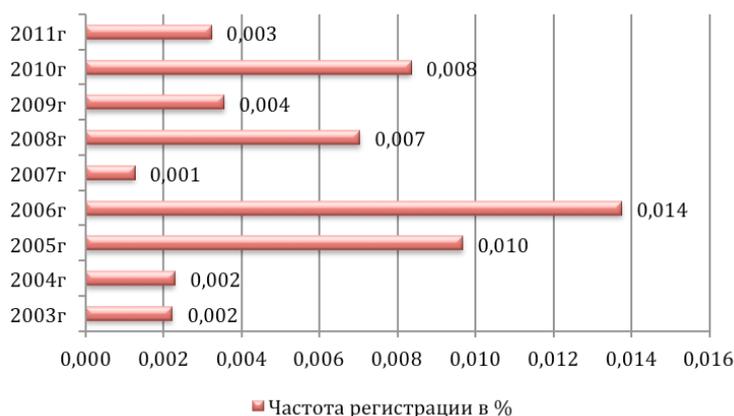


Рисунок — Частота регистрации осложнений в виде постинъекционных абсцессов (%) за 2003-2011 гг.

Развитие постинъекционных абсцессов происходило чаще у детей, чем у взрослых, и наблюдалось в 36 случаях (92,3±4,3%) . В показателях соотношения к числу привитых адсорбированными вакцинами детей осложнения в виде постинъекционных абсцессов возникали с частотой от 1:78773 привитых ребенка в 2007 г. до 1:7272 в 2006 г. Во всех случаях для лечения осложнения потребовалось хирургическое вмешательство. Учитывая, что профилактические прививки получает все детское население Республики Беларусь, выявление и верификация всех случаев постинъекционных абсцессов является важным направлением по совершенствованию условий безопасного проведения профилактических прививок.

Не все случаи абсцессов в ходе расследования осложнений были верифицированы по причинам их возникновения. В 15 случаях (38,6±7,6%) производился посев содержимого абсцессов. В 6 (40±12,6%) были выделены микроорганизмы: *S. aureus* — 2 (13,3±8,7%), *S. epidermidis* — 3 (20,0±10,3%), *Str. pneumoniae* — 1 (6,6±6,4%). Во всех наблюдениях, где определялись микроорганизмы, при эпидемиологическом обследовании прививочных кабинетов организаций здравоохранения выявлены нарушения правил асептики при введении вакцины: отсутствие горячего водоснабжения на момент прививок, одноразовых перчаток, нарушение методик использования кожных антисептиков, правил использования стерильного материала для обработки инъекционного поля.

В остальных 9 случаях (60±12,6%) результаты посева содержимого абсцесса были отрицательными, в связи с чем можно предположить, что стерильные абсцессы могли быть связаны с другими причинами: нарушением условий транспортировки или хранения, техники введения вакцины.

Предполагается, что немаловажным фактором в возникновении поствакцинальных осложнений на профилактические прививки являются не отдельные причины, а комплекс условий при организации профилактических прививок. Это подтверждается данными анализа развития абсцессов по учреждениям. В 34 случаях (87,2±5,4%) постинъекционные абсцессы возникли при проведении профилактических прививок в амбулаторно-поликлинических организациях, в т.ч. 24 (70,5±7,8%) регистрировались по два и более случая на одно учреждение. Наибольшее число осложнений на одно учреждение составило 5 (20,8± 8,3%) , из которых 3 регистрировались в течение одного года. В двух учреждениях было зарегистрировано по 4 случая, в одном - 3 и в 4 - по 2 случая. Остальные 4 (10,2±4,8%) случая абсцессов зарегистрированы в амбулаториях.

Таким образом, мониторинг побочных реакций должен учитывать не только сам факт их появления, но и фиксировать факт исчезновения возникшей реакции. В противном случае побочная реакция должна расцениваться как подозрение на поствакцинальное осложнение и дифференцироваться с поствакцинальным (постинъекционным) абсцессом.

Своевременное выявление постинъекционных абсцессов имеет значение не только с точки зрения благоприятного исхода для пациента, но и для предотвращения последующих осложнений в учреждении здравоохранения, поскольку они не во всех случаях обусловлены нарушением противоэпидемического режима. Предотвращение риска развития поствакцинальных осложнений возможно только при создании системы санитарно-противоэпидемических требований к условиям проведения профилактических прививок, контроль которых позволит обеспечить безопасные условия иммунизации.

#### **Выводы:**

1. В наблюдательном исследовании за вакцинацией вакциной АКДС местные реакции диаметром 2,0±1,7 см отмечались с частотой 25,8±3,1% и купировались в течение 1-2-х сут. после проведения прививки у 98,1% детей. Поствакцинальные реакции следует расценивать как побочные на введение вакцин, если они проходят в сроки, предусмотренные инструкцией по применению.

2. Постинъекционные абсцессы возникают в сроки появления побочных реакций на 1-2-е сут. и имеют диаметр 3,6±2,7 см, сопоставимый таковым при побочных реакциях на

введение, но в отличие от побочных реакций не купируются в течение первых 2-х сут.

3. Все зарегистрированные случаи постинъекционных абсцессов были связаны с введением адсорбированных вакцин, из них 6 ( $40 \pm 12,6\%$ ) были связаны с нарушением правил асептики при введении вакцин, остальные с другими причинами.

4. С амбулаторно-поликлиническими организациями здравоохранения были связаны 34 случая ( $87,2 \pm 5,4\%$ ) постинъекционных абсцессов, 24 ( $70,5 \pm 7,8\%$ ) с 8 организациями здравоохранения и регистрировались как 2-5 случаев на одно учреждение.

#### Литература

1. Иммунопрофилактика-2005: справочник / под ред. В.К. Таточенко, Н.А. Озерцовского. – 7-е изд. – М., 2005. – 192 с.
2. О совершенствовании организации проведения профилактических прививок: Приказ М-ва здравоохран. Респ. Беларусь от 05.12.2006 № 913.
3. Соколова, Н.Г. Как правильно делать инъекции / Н.Г. Соколова. – 4-е изд. – Ростов н/Д: Феникс, 2008. – 62 с.
4. Таточенко, В.К. Профилактика и мониторинг поствакцинальных осложнений: пособие для врачей / В.К. Таточенко, А.М. Федоров, Н.А. Озерцовский. – М., 2004. – 128 с.
5. World Health Organization, Expanded Program Immunization. Supplementary Information on Vaccine Safety. WHO/V&B/00.36. – Geneva: WHO, 2000. – Part 2: Background rates of adverse events following immunization.
6. Поствакцинальные осложнения: пособие для практического врача / Е.А. Лакоткина [и др.]. – М., 2004. – 80 с.
7. What necessary to do at development reaction, in accordance with vaccination or immunization supposedly / Pan-American Organization of the Public Health Regional Agency Worldwide Organization of the Vaccine Division Public Health and Immunizations, Safety to Immunizations. – Washington, 2002.
8. Петри, А. Наглядная медицинская статистика / А. Петри, К. Сэбин; пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. – 2-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 168 с.
9. Шмелева, Н.Д. Сравнительная оценка неблагоприятных событий поствакцинального периода у привитых АКДС детей, здоровых и имеющих патологию / Н.Д. Шмелева, Н.Д. Коломиец, Н.Д. Ключарева // Мед. панорама. – 2011. – № 1. – С. 15-17.
10. Инструкция по применению вакцины коклюшно-дифтерийно-столбнячной адсорбированной жидкой / Постанов. М-ва здравоохран. РФ от 05.10.2009 № 01-11/152-09.

Поступила 20.08.2012

## EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE ON VACCINE REACTIONS AND PREVENTION OF POSTINJECTION ABSCESS

Shmeleva N.D.

*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus*

Conducted surveillance of local adverse events following administration of DTP vaccine in 205 children age  $94 \pm 5.6$  days. In 53 ( $25.8 \pm 3.1\%$ ) of children registered local adverse reactions diameter  $2.0 \pm 1.7$  cm. Analyzed 42 cases of postinjection abscesses after vaccine administration from 1990 to 2011, and found that the first symptoms of complications occurred 1-2 days after the injection of the vaccine, had a diameter of  $3.6 \pm 2.7$  cm, not stopped after 48 hours and required surgery. In 6 ( $40 \pm 12.6\%$ ) surveyed laboratory cases of postinjection abscesses identified pathogenic and opportunistic microorganisms.

**Keywords:** surveillance, postinjection abscesses, adverse reaction, vaccine, vaccination.

## АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ И Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОК, СТРАДАЮЩИХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, В ПРОЦЕССЕ АУТОИММУНОТЕРАПИИ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ

Гончаров А.Е.<sup>1</sup>, Кошелев С.В.<sup>2</sup>, Романова И.В.<sup>1</sup>,  
Квакухо В.А.<sup>1</sup>, Титов Л.П.<sup>1</sup>, Путырский Л.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;

<sup>2</sup>РНПЦ онкологии и медицинской радиологии, Минск, Беларусь

**Резюме.** В исследовании использованы образцы периферической крови 10 пациенток с раком молочной железы I–II клинической стадии, полностью завершивших этапы иммунотерапии дендритными клетками. Показано значительное увеличение числа антигенспецифических клеток в периферической крови  $80,0 \pm 12,6\%$  пациенток в процессе иммунотерапии и существенное снижение содержания Т-регуляторных клеток в периферической крови  $90,0 \pm 9,5\%$  пациенток, что указывает на активацию иммунного ответа. Полученные результаты указывают на иммунологическую эффективность использования аутологичных дендритных клеток у пациентов с ранним агрессивным раком молочной железы и позволяет надеяться на клиническую эффективность применения данного метода терапии.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, регуляторные Т-клетки, антигенспецифические клетки, рак молочной железы, клеточная иммунотерапия.

**Введение.** Рак молочной железы (РМЖ) является самым распространенным злокачественным новообразованием у женщин индустриально развитых стран, занимая 2-е место в структуре смертности от злокачественных новообразований [1, 2].

В настоящее время для терапии РМЖ используют так называемую классическую триаду хирургических, лучевых и химиотерапевтических методов лечения. Данные методы терапии не всегда оказываются эффективными в предотвращении рецидивов болезни [2]. В связи с этим, в последнее десятилетие предпринимаются попытки улучшить результаты терапии рака при помощи воздействия на иммунную систему пациента. Во многих странах мира проходят клинические испытания способа иммунотерапии рака, основанного на использовании дендритных клеток (ДК). Основной функцией ДК является генерация антигенспецифических CD3+ Т-клеток (АСК), обладающих прямой и опосредованной противоопухолевой активностью. Увеличение числа АСК у пациентов с раком на фоне проводимой иммунотерапии рассматривается как свидетельство достаточной стимуляции иммунитета дендритными клетками и, как правило, коррелирует с клинической эффективностью лечения [3]. Так, опубликованы результаты клинических испытаний метода иммунотерапии пациентов с РМЖ с использованием ДК, праймированных различными антигенами [4, 5]. Результаты большинства исследований обнадеживающие: показана безопасность применения ДК и хороший клинический эффект. Убедительные доказательства безопасности и эффективности лечения рака простаты с использованием ДК, позволило Управлению по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов (FDA) США в 2010 г. одобрить использование данного метода терапии для широкого применения [6].

В Республике Беларусь исследования с целью применения аутологичных ДК для иммунотерапии хронических инфекционных и онкологических заболеваний начаты в 2005 г [7-12]. В настоящее время на базе РНПЦ онкологии и медицинской радиологии в рамках задания ГНТП проводятся клинические испытания «Метода противорецидивной аутоиммунотерапии пациентов с первичным агрессивным раком молочной железы с использованием аутологичных дендритных клеток, праймированных опухоли-ассоциированными антигенами», разработанного совместными усилиями сотрудников РНПЦ эпидемиологии и микробиологии и РНПЦ онкологии и медицинской радиологии. Программа испытаний утверждена решением Комиссии по способам профилактики, диагностики, лечения, реабилитации и организационным формам работы Министерства здравоохранения Республики Беларусь (протокол от 6 мая 2010 г.).

Т-регуляторные клетки (Т-рег), имеющие фенотип CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup>/lowFoxP3<sup>+</sup>, являются основными клетками системы иммунитета, обладающими иммуносупрессивной активностью. Во множестве работ показано, что у пациентов с раком различной локализации число Т-рег увеличено как в периферической крови, так и в инфильтратах, окружающих опухоль. При этом большее число Т-рег ассоциировано с худшим клиническим прогнозом.

В то же время, уменьшение пула циркулирующих Т-рег у пациентов с раком положительно коррелировало с продолжительностью безрецидивного периода, что позволяет использовать результаты определения Т-рег в качестве прогностического теста. Известно, что Т-рег способны посредством секреции ряда субстанций ослаблять функцию ДК и цитотоксических Т-лимфоцитов, наиболее важных в иммунной защите против злокачественных клеток. Помимо этого выявлена способность Т-рег стимулировать ангиогенез опухолей [13].

**Цель исследования:** оценка показателей иммунного статуса и опухолеспецифического иммунного ответа у пациентов с РМЖ, прошедших полный курс иммунотерапии ДК.

**Материалы и методы** исследования. Объекты исследований. В исследовании использованы образцы периферической крови 10 пациенток с РМЖ I—II клинической стадии, полностью завершивших этапы иммунотерапии ДК. Исследовали следующие субпопуляции лимфоцитов периферической крови: CD3+ Т-лимфоциты, TCR $\alpha\beta$ + Т-лимфоциты, TCR $\gamma\delta$ + Т-лимфоциты, CD3+CD4+ Т-хелперы, CD3+CD8+ Т-цитотоксические лимфоциты, CD4+CD25<sup>high</sup> Т-регуляторные клетки, CD3–CD16+CD56+ естественные киллеры, CD3+CD45R0+ Т-клетки памяти, CD3+HLA-DR+ Т-лимфоциты активированные, CD19+ В-лимфоциты, CD19+CD5+ В1-лимфоциты, CD19+CD5–CD27+ В-лимфоциты памяти, CD3+CD69+ Т-лимфоциты активированные, CD28+ Т-лимфоциты. Для определения иммунотипа лимфоцитов венозную гепаринизированную кровь инкубировали с соответствующими моноклональными антителами, после чего эритроциты лизировали раствором хлорида аммония. Для определения внутриклеточных цитокинов и антигенспецифических клеток к крови в количестве 500 мкл добавляли: 1) DPBS; 2) форбол-12-миристан-13-ацетат (25 нг/мл) и иономицин (1 мкг/мл); 3) синтетические короткоцепочечные пептиды мутантного протеина р53: р5365-73 RMPEAAPPV, р53264-272 LLGRNSFEV, р53139-147 KLCVPQLWV, р53103-111 YLGSYGFRL в количестве 10 мкг/мл каждого, довели объем средой RPMI-1640 до 1 мл и культивировали 2 часа при температуре 37 °С. Затем добавляли монензин (10 мкг/мл) и инкубировали дополнительно 4 часа. Активированную кровь в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональным антителом к CD3, после чего лизировали эритроциты, лимфоциты фиксировали параформальдегидом, пермеабелизировали в растворе сапонина и инкубировали с моноклональными антителами к интерферону- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ). Учет результатов осуществляли на проточном цитофлюориметре «FACSCalibur» (BD, США) [14]. Данные анализировали при помощи программы «Weasel» версия 3 (WENI, Австралия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы «Statistica» 8 («StatSoft», США). Значения показателей представлены в виде Me (25–75), где Me медиана, а 25 и 75 — интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро-Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения двух зависимых выборок использовали критерий Вилкоксона. В качестве критерия достоверности различий между показателями принимали уровень значимости  $p < 0,05$  [15].

**Результаты и их обсуждение.** В процессе проведения иммунотерапии не зарегистрировано существенного изменения количественных показателей большинства субпопуляций лимфоцитов (табл.).

Таблица — Содержание субпопуляций лимфоцитов у пациентов с РМЖ

Субпопуляция, %	Группа		p
	Пациенты до терапии	Пациенты после терапии	
CD3+	70,8(65,1–75,1)	68,8(65,9–73,2)	0,721
CD3+TCR $\alpha\beta$ +	67,6(60,9–71,2)	64,5(61,7–69,5)	0,508
CD3+TCR $\gamma\delta$ +	3,2(2,0–3,9)	3,3(2,8–3,8)	0,721
CD3+CD4+	44,4(35,9–50,4)	40,6(35,9–47,2)	0,139
CD3+CD8+	30,0(28,0–32,9)	28,1(25,6–30,7)	0,47
CD3–CD16+CD56+	18,5 (13,3–22,9)	17,0 (15,3–25,5)	0,799
CD19+	8,3 (3,3–13,4)	11,1 (7,8–12,4)	0,057
CD19+CD5+	2,3 (1,1–4,1)	2,4 (1,5–3,9)	0,721
CD3+HLA-DR+	6,6(5,1–9,3)	5,1(2,8–8,1)	0,047
CD3+CD69+	4,0(1,7–6,2)	4,6(3,7–7,8)	0,721
CD4+CD25 <sup>high</sup>	6,7(5,0–9,1)	2,9(2,3–3,7)	0,007
CD28+	53,6(46,9–67,7)	53,9(40,6–56,0)	0,445
CD45R0+	45,8(37,7–51,1)	39,4(37,2–46,4)	0,241
CD19+CD27+CD5–	0,8(0,5–1,2)	1,2(0,9–1,5)	0,139
CD3+ИФН- $\gamma$ +	15,5(10,2–18,2)	17,0(13,0–22,5)	0,386
CD3+ИЛ-17+	0,32(0,12–0,64)	0,44(0,40–0,70)	0,575

Выявлено существенное общегрупповое снижение содержания Т-регуляторных клеток после проведения иммунотерапии, что указывает на отсутствие развития иммунологической толерантности и активацию иммунного ответа, что является благоприятным прогностическим признаком. Уменьшение пула Т-регуляторных клеток периферической крови выявлено у 9 из 10 пациенток (кроме пациентки 6Д), (рисунок 1).

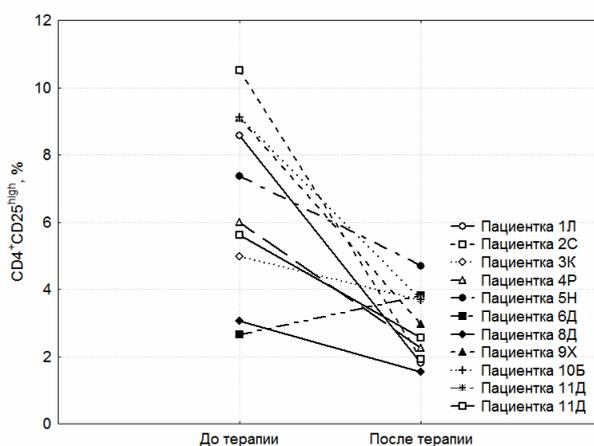


Рис 1 — Динамика пула Т-регуляторных клеток в процессе иммунотерапии ДК

Для исследования динамики накопления АСК после проведения иммунотерапии обследованы пациентки, полностью завершившие программу испытаний. Число АСК составило 0,33(0,0–0,50)% в начале лечения и 0,95(0,64–1,58)% после курса иммунотерапии (p=0,005) (рисунок 2).

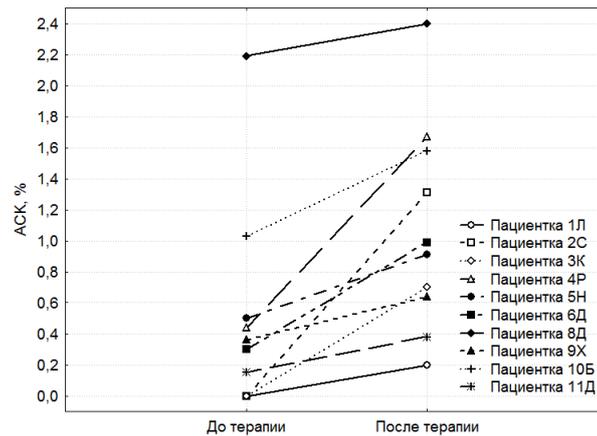


Рисунок 2 — Динамика содержания АСК в периферической крови в процессе иммунотерапии ДК

Увеличение числа антигенспецифических клеток выявлено у всех пациенток. У пациентки 1Л с изначально недетектируемым количеством антигенспецифических клеток число последних значительно не увеличилось и составило 0,2%. Данной пациентке будет назначен дополнительный курс терапии дендритными клетками. У пациентки 8Д изначально высокий уровень АСК увеличился незначительно с 2,19% до 2,40%.

**Заключение.** Оценка показателей специфического иммунного ответа показала значительное увеличение числа АСК в периферической крови  $80,0 \pm 12,6\%$  пациенток в процессе иммунотерапии, что свидетельствует о формировании иммунного ответа.

Выявлено существенное снижение содержания Т-регуляторных клеток в периферической крови  $90,0 \pm 9,5\%$  пациенток после проведения иммунотерапии, что указывает на активацию иммунного ответа и, несомненно, является благоприятным прогностическим признаком.

Таким образом, предварительный анализ динамического лабораторного обследования пациентов указывает на иммунологическую эффективность использования аутологичных ДК у пациентов с ранним агрессивным РМЖ и позволяет надеяться на клиническую эффективность применения данного метода терапии.

#### Литература

1. Савицкий, С.Э. Опыт гродненского онкологического диспансера в диагностике первично-множественного рака молочной железы / С.Э. Савицкий, Ю.И. Бобко, И.Н. Бобко // Онкологический журнал. – 2010. – Т.4, № 4. – С. 35-39.
2. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007 / A. Goldhirsch [et al.] // Ann. Oncol. – 2007. – Vol. 18, N 7. – P. 1133-1144.
3. Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters / L. Engell-Noerregaard [et al.] // Cancer Immunol. Immunother. – 2009. – Vol. 58. – С. 1-14.
4. Vaccination with p53 peptide-pulsed dendritic cells is associated with disease stabilization in patients with p53 expressing advanced breast cancer; monitoring of serum YKL-40 and IL-6 as response biomarkers / I.M. Svane [et al.] // Cancer Immunol. Immunother. – 2007. – Vol. 56. – P. 1485-99.
5. Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion / B.J. Czerniecki [et al.] // Cancer Res. – 2007. – Vol. 67, N 4. – P.1842–1852.
6. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA approved therapeutic cancer vaccine / Cheever M.A., Higano C.S. // Clin. Cancer Res. – 2011. – Vol. 17. – P. 3520-3526.
7. Гончаров, А.Е. Влияние олигонуклеотидов ДНК бактерий рода klebsiella, содержащих CpG-мотивы, на функциональную активность мононуклеарных клеток периферической крови и моноцитарных дендритных клеток / А.Е. Гончаров, Л.П. Титов, О.О. Янович // Мед. иммунол. – 2006. – Т. 8, № 2-3. – С. 131-132.
8. Гончаров, А.Е. Фенотипическая и функциональная характеристика моноцитарных дендритных клеток при хронических вирусных гепатитах В, С и микст-гепатите В+С / А.Е. Гончаров, Л.П. Титов, Л.С. Жмуровская // Здоровоохранение. – 2007. – № 11. – С. 28-32.
9. Гончаров, А.Е. Функциональная характеристика моноцитарных дендритных клеток больных туберкулезом легких / А.Е. Гончаров, Л.П. Титов // Докл. НАН Беларуси. – 2008. – Т. 52, № 1. – С. 92-96.
10. Иммунофенотип и функциональные свойства моноцитарных дендритных клеток больных раком молочной железы / Л.П. Титов [и др.] // Здоровоохранение. – 2010. – Т. 10. – С. 52–55.

11. Safety and short term Efficacy of dendritic cell immune therapy in patients with chronic hepatitis B / L.P. Titov [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2010. – Vol. 125, № 2 (suppl.). – P. AB13.
12. Titov, L.P. Responses of patients with multiple drug resistant pulmonary tuberculosis to cellular immunotherapy with autologous monocyte-derived dendritic cells / L.P. Titov, A.Y. Hancharou, A.M. Skrahina // Allergy. – 2011. – Vol. 66, suppl. 94. – P. 513.
13. Facciabene, A. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis / A. Facciabene, G.T. Motz, G. Coukos // Cancer Res. – 2012. – Vol. 72. – P. 2162-2171.
14. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) / С.В. Хайдуков [и др.] // Мед. иммунол. – 2009. – Т. 11, № 2-3. – С. 227-238.
15. A guide to modern statistical analysis of immunological data [Electronic resource] / B. Genser [et al.] // BMC Immunol. – 2007. – Vol. 8, N 27. – doi: 10.1186/1471-2172-8-27. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2234437/>. – Data of access: 13.07.2012.

Поступила 12.07.2012

## ANALYSIS OF ANTIGENSPECIFIC T-CELLS AND T-REGULATORY CELLS IN BREAST CANCER PATIENTS EXPOSED TO DENDRITIC CELL IMMUNOTHERAPY

**Hancharou A.Y. <sup>1</sup>, Koshaleu S.V. <sup>2</sup>, Ramanava I.U. <sup>1</sup>, Kvakukha V.A. <sup>1</sup>, Titov L.P. <sup>1</sup>,  
Putyrsky L.A. <sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Republican Research & Practical Center for Epidemiology and Microbiology;*

<sup>2</sup>*Belarusian Cancer Center of N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus*

In the current investigation the number of T-regs and antigenspecific T-cells was assayed in the patients with breast cancer after dendritic cell-based immunotherapy. The increase of antigenspecific T-cells was established in 80,0±12.6% of patients after the course of immunotherapy. T-regs were decreased with treatment in 90,0±9.5% of patients. Taken together these data indicate activated immune response in the patients treated with dendritic cells. Clinical efficacy of dendritic cell based treatment as well as the comparison with the control group will be studied later.

**Keywords:** breast cancer, dendritic cells, immunity, immunotherapy.

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ РАЗВИТИЯ И ТЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И НЕВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СУСТАВОВ

**Полуян О.С., Костюк С.А.**

*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В ходе проведения иммунологических исследований установлено, что диагностическим критерием развития и течения ревматоидного артрита является повышение содержания TNFα и IL4 и снижение содержания неоптерина в сыворотке крови; для реактивного артрита характерно резкое снижение содержания TNFα на фоне усиленной продукции неоптерина в сыворотке крови; псориатический артрит характеризуется резким увеличением содержания IL4 и неоптерина в синовиальной жидкости; для подагрического артрита характерна усиленная продукция TNFα на фоне резкого снижения содержания IL4 и неоптерина; при остеоартрозе наблюдается повышение содержания TNFα в синовиальной жидкости на фоне увеличения содержания IL4 и неоптерина в сыворотке крови.

**Ключевые слова:** воспалительные и невоспалительные заболевания суставов, цитокины, неоптерин.

**Введение.** Современная классификация заболеваний суставов представляет значительные трудности, которые обусловлены, во-первых, многообразием суставных заболеваний, имеющих весьма сходные клинические и анатомические признаки, и, во-вторых, неясностью этиологии и патогенеза большинства поражений суставов. Также следует отметить отсутствие единой номенклатуры суставных заболеваний [1].

В основу существующих классификаций положен клинико-анатомический признак, согласно которому все поражения суставов разделяются на две большие группы: воспалительные (артриты) и невоспалительные (дегенеративно-дистрофические, или артрозы) заболевания суставов [1, 2].

В исследованиях, посвященных изучению иммунных механизмов формирования артропатий, отмечено, что формирование заболеваний суставов связано с нарушениями в клеточном и гуморальном звеньях иммунной регуляции [3, 4]. Данные последних лет свидетельствуют об активном участии цитокинов в регуляции звеньев аутоиммунной агрессии у пациентов с воспалительными и невоспалительными заболеваниями суставов [5]. При этом прогрессирование заболевания определяется нарушением равновесия между синтезом провоспалительных цитокинов преимущественно макрофагальной природы (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8) и противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10, растворимый антагонист IL-1 $\beta$ ) [3-6].

В последние годы особый интерес представляет изучение неоптерина — чувствительного и стабильного маркера активации моноцитов-макрофагов, увеличение уровня которого наблюдается при широком круге инфекционных, аутоиммунных заболеваний человека и злокачественных новообразованиях [7].

Таким образом, в возникновении и поддержании воспалительного процесса при заболеваниях суставов различной этиологии принимают участие большое количество разнообразных провоспалительных, регуляторных и противовоспалительных параметров. Диагностическое и прогностическое значение большинства из них изучено недостаточно, что говорит о важности и своевременной необходимости проведения исследований, направленной на уточнение роли данных иммунологических маркеров [5, 6, 8].

**Материалы и методы** исследования. В исследование были включены 200 пациентов с воспалительными и невоспалительными заболеваниями, группу контроля составили 40 практически здоровых лиц. При этом пациенты основной группы были разделены на следующие подгруппы: подгруппа 1 — пациенты с ревматоидным артритом (n=40), подгруппа 2 — пациенты с реактивным артритом (n=40), подгруппа 3 — пациенты с псориатическим артритом (n=40), подгруппа 4 — пациенты с подагрическим артритом (n=40), подгруппа 5 — пациенты с остеоартрозом (n=40).

Средний возраст пациентов с воспалительными и невоспалительными заболеваниями суставов на момент включения в исследование составил  $55,9 \pm 12,3$  лет. В подгруппах 1-4 преобладали лица женского пола — их удельный вес для подгруппы 1 составил 72,5% (n=29), для подгруппы 2 — 55,0% (n=22), для подгруппы 3 — 77,5% (n=31), для подгруппы 4 — 65,0% (n=26). Распределение по полу пациентов подгруппы 5 выглядело следующим образом: удельный вес женщин составил 45,0% (n=18), мужчин — 55% (n=22). Продолжительность заболевания составила  $18,7 \pm 12,0$  недель. В группу контроля были включены 20 женщин и 20 мужчин, средний возраст которых составил  $42,5 \pm 7,1$  года.

Отбор пациентов проводился в соответствии с критериями включения и исключения пациентов из исследования.

Всем пациентам проводилась рентгенография кистей и дистальных отделов стоп в прямой (переднезадней) проекции с использованием стандартных режимов на рентгенодиагностическом комплексе «Bennett» (США), суммарная поглощенная доза составила 0,04 мЗв.

Всем пациентам основной группы проводилось стандартное клиническое обследование с определением числа припухших (ЧПС) и числа болезненных суставов (ЧБС) и полным

физикальным осмотром. Болевой синдром оценивался по ВАШ (по визуальной аналоговой шкале), функциональный статус пациента по HAQ (Health Assessment Questionnaire); активность заболевания — по DAS 28.

$DAS\ 28 = 0,56 \cdot (\sqrt{ЧБС28}) + 0,28 \cdot (ЧПС28) + 0,7 \cdot \ln\ COЭ + 0,014 \cdot ОСЗ$ , где

ЧБС — число болезненных суставов;

ЧПС — число припухших суставов;

ОСЗ — общая оценка активности заболевания по мнению пациента (по ВАШ).

Разделение пациентов на группы с воспалительными и невоспалительными заболеваниями осуществлялось на основании биохимических исследований (для воспалительных заболеваний  $COЭ > 30$  мм/ч, С-реактивный белок  $> 80$  мкг/мл), а также результатов ПЦР-исследований по наличию в соскобах урогенитального тракта и образцах синовиальной жидкости ДНК артритогенных возбудителей *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Borrelia burgdorferi*, *Herpes simplex virus I/II*, *Cytomegalovirus*, *Epstein-Barr virus*.

Определение иммунологических показателей — TNF $\alpha$ , IL-4, неоптерин — в сыворотке крови и синовиальной жидкости пациентов с воспалительными и невоспалительными заболеваниями суставов, а также в сыворотке крови пациентов группы контроля проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием диагностических тест-систем производства «Вектор-Брест» (Россия). Результаты ИФА регистрировались с помощью спектрофотометра SOLAR PV-51С (Беларусь).

Все данные, полученные в ходе исследований, вносились в соответствующую компьютерную базу, с последующей статистической обработкой при помощи стандартного статистического пакета программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.). Для количественных параметров, распределение которых не подчинялось нормальному закону (при использовании критерия Колмогорова-Смирнова), вычислялись медиана Me и (25/75) процентиля. Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна-Уитни (U-тест) с целью сравнения величин измерений признака. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень  $p < 0,05$  [9].

**Результаты и их обсуждение.** При сравнении значений уровней TNF $\alpha$  в сыворотке крови и синовиальной жидкости пациентов исследуемых групп были получены следующие данные: для группы 1 значение Me (25/75 процентиля) составило 21,54 (21,23/21,90) пг/мл и 7,02 (6,75/7,43) пг/мл, для группы 2 — 1,90 (1,74/2,18) пг/мл и 11,01 (9,01/13,72) пг/мл, для группы 3 — 8,61 (8,42/8,92) пг/мл и 5,92 (5,70/6,15) пг/мл, для группы 4 — 7,61 (7,27/7,86) пг/мл и 15,59 (15,45/15,91) пг/мл, для группы 5 — 5,91 (5,25/7,37) пг/мл и 153,2 (141,3/163,0) пг/мл, для группы 6 — 5,62 (4,78/6,37) пг/мл соответственно (рисунок 1).

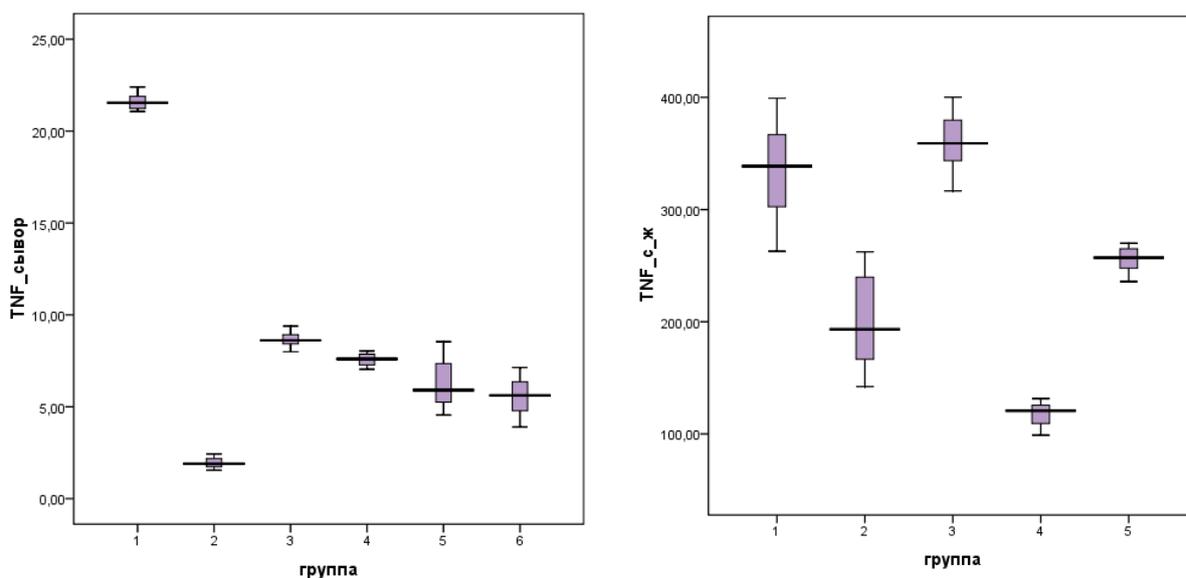


Рисунок 1 — Концентрационные уровни TNF $\alpha$  в сыворотке крови и синовиальной жидкости обследуемых групп пациентов

При проверке гипотезы о достоверности полученных результатов по определению содержания TNF $\alpha$  в сыворотке пациентов с использованием критерия Манна-Уитни было установлено следующее: для групп 1-2  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-3  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-4  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-5  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-6  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-3  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-4  $Z=-7,701$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-5  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-6  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-4  $Z=-7,652$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-5  $Z=-7,368$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-6  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 4-5  $Z=-4,226$ ,  $p=0,000$ , для групп 5-6  $Z=-2,002$ ,  $p=0,045$ . Полученные данные свидетельствуют о достоверных различиях по данным показателям среди сравниваемых групп пациентов за исключением групп 5-6.

Использование непараметрического критерия Манна-Уитни для проверки гипотезы о достоверности полученных результатов по определению содержания TNF $\alpha$  в синовиальной жидкости пациентов позволило установить наличие достоверных различий между всеми сравниваемыми группами: для групп 1-2  $Z=-6,550$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-3  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-4  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-5  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-3  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-4  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-5  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-4  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-5  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 4-5  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ .

При сравнении значений уровней ИЛ4 в сыворотке крови и синовиальной жидкости обследуемых групп пациентов были получены следующие данные: для группы 1 значение Me (25/75 перцентили) составило 58,22 (53,62/60,02) пг/мл и 338,70 (302,55/366,83) пг/мл, для группы 2 — 4,10 (3,75/4,33) пг/мл и 193,26 (166,70/240,27) пг/мл, для группы 3 — 11,31 (10,83/11,63) пг/мл и 359,09 (343,20/379,90) пг/мл, для группы 4 — 11,15 (10,80/11,55) пг/мл и 120,72 (109,06/125,70) пг/мл, для группы 5 — 12,45 (11,51/13,01) пг/мл и 257,08 (247,73/265,19) пг/мл, для группы 6 — 5,90 (5,40/6,16) пг/мл соответственно (рисунок 2).

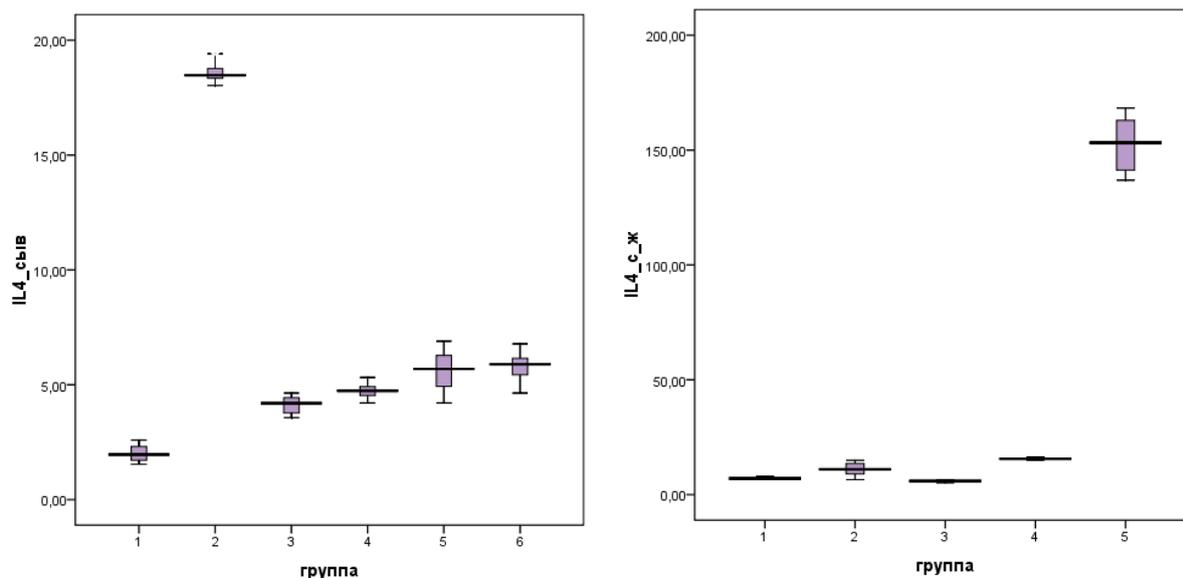


Рисунок 2 — Концентрационные уровни IL4 в сыворотке крови и синовиальной жидкости обследуемых групп пациентов

При проверке гипотезы о достоверности полученных результатов по определению содержания IL4 в сыворотке пациентов с использованием критерия Манна-Уитни было установлено следующее: для групп 1-2  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-3  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-4  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-5  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-6  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-3  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-4  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-5  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-6  $Z=-7,536$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-4  $Z=-0,467$ ,  $p=0,641$ , для групп 3-5  $Z=-5,154$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-6  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 4-5  $Z=-5,505$ ,  $p=0,000$ , для групп 5-6  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ . Полученные данные свидетельствуют о достоверных различиях по данным показателям среди сравниваемых групп пациентов за исключением групп 3-4.

Статистический анализ с использованием критерия Манна-Уитни выявил наличие достоверных различий по содержанию IL4 в синовиальной жидкости пациентов всех обследуемых групп: для групп 1-2  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-3  $Z=-3,311$ ,  $p=0,001$ , для групп 1-4  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-5  $Z=-7,396$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-3  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-4  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-5  $Z=-6,015$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-4  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-5  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 4-5  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ .

Дальнейшие исследования по определению содержания неоптерина в сыворотке крови и синовиальной жидкости пациентов с воспалительными и невоспалительными артритами, а контрольной группы позволили установить следующее: для группы 1 значение Me (25/75 процентиля) составило 1,97 (1,71/2,32) нмоль/л и 221,64 (175,03/243,13) нмоль/л, для группы 2 — 18,48 (18,33/18,79) нмоль/л и 184,42 (181,61/189,02) нмоль/л, для группы 3 — 4,20 (3,77/4,44) нмоль/л и 249,92 (216,50/273,31) нмоль/л, для группы 4 — 4,74 (4,53/4,93) нмоль/л и 66,81 (62,95/73,48) нмоль/л, для группы 5 — 5,69 (4,93/6,28) нмоль/л и 135,80 (124,57/140,37) нмоль/л, для группы 6 — 3,37 (3,23/3,62) нмоль/л соответственно (рисунок 3).

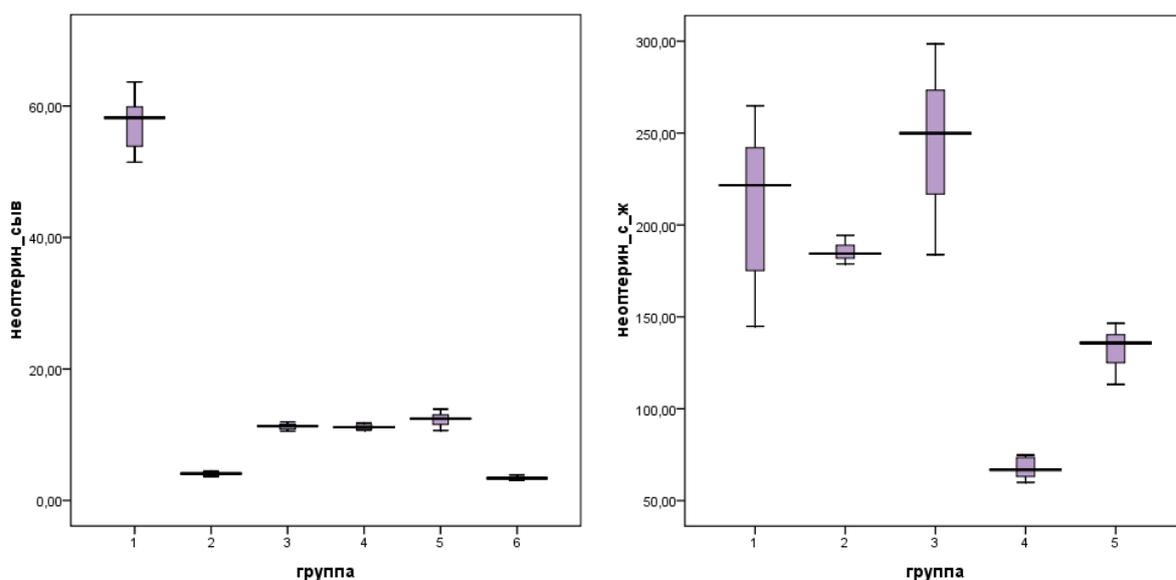


Рисунок 3 — Концентрационные уровни неоптерина в сыворотке крови и синовиальной жидкости обследуемых групп пациентов

При проверке гипотезы о достоверности полученных результатов по определению содержания неоптерина в сыворотке пациентов с использованием критерия Манна-Уитни было установлено следующее: для групп 1-2  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-3  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-4  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-5  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-6  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-3  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-4  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-5  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-6  $Z=-7,700$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-4  $Z=-6,097$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-5  $Z=-6,896$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-6  $Z=-6,853$ ,  $p=0,000$ , для групп 4-5  $Z=-4,644$ ,  $p=0,000$ , для групп 5-6  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ . Полученные данные свидетельствуют о достоверных различиях по данным показателям среди сравниваемых групп пациентов.

Аналогичные данные получены при статистическом анализе данных по определению содержания неоптерина в синовиальной жидкости пациентов с использованием критерия Манна-Уитни: для групп 1-2  $Z=-2,435$ ,  $p=0,015$ , для групп 1-3  $Z=-3,311$ ,  $p=0,001$ , для групп 1-4  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 1-5  $Z=-7,622$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-3  $Z=-7,237$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-4  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 2-5  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-4  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 3-5  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ , для групп 4-5  $Z=-7,699$ ,  $p=0,000$ .

Таким образом, полученные нами количественные показатели содержания цитокинов  $TNF\alpha$ ,  $IL-4$ , неоптерина в различном биологическом материале (сыворотке крови и синовиальной жидкости) свидетельствуют о различающихся их концентрациях в зависимости от этиологического фактора развития заболевания (воспалительные и невоспалительные заболевания суставов).

Для ревматоидного артрита характерно статистически значимое ( $p<0,05$ ) достоверное увеличение содержания  $TNF\alpha$  в сыворотке крови (значение  $Me$  (25/75 перцентили) составило 21,54 (21,23/21,90) пг/мл) и снижение содержания  $TNF\alpha$  в синовиальной жидкости данной группы пациентов. Аналогичные данные получены и в отношении  $IL-4$  в сыворотке крови пациентов, характеризующиеся статистически достоверным ( $p<0,05$ ) увеличением содержания данного показателя (58,22 (53,62/60,02) пг/мл). Количественные значения  $IL-4$  в синовиальной жидкости также свидетельствуют об усиленном образовании данного цитокина (338,70 (302,55/366,83) пг/мл). При проведении исследований по определению содержания неоптерина в исследуемом биологическом материале было установлено

статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение концентраций данного цитокина в сыворотке крови (1,97 (1,71/2,32) нмоль/л) и увеличение концентраций в синовиальной жидкости (221,64 (175,03/243,13) нмоль/л).

Реактивный артрит характеризуется статистически значимым достоверным ( $p < 0,05$ ) снижением содержания TNF $\alpha$  в исследуемом биологическом материале (сыворотке крови) (1,90 (1,74/2,18) пг/мл). Выявляется также снижение концентрации IL4 в сыворотке крови пациентов с реактивным артритом по сравнению с контрольной группой (4,10 (3,75/4,33) пг/мл). Результаты определения неоптерина в сыворотке крови пациентов исследуемой группы свидетельствуют о достоверном статистически значимом ( $p < 0,05$ ) увеличении содержания данного цитокина (18,48 (18,33/18,79) нмоль/л).

Данные, полученные при проведении исследования по определению содержания цитокинов в биологическом материале (сыворотке крови и синовиальной жидкости), свидетельствуют о том, что при псориатическом артрите наблюдается достоверное статистически значимое ( $p < 0,05$ ) повышение уровня TNF $\alpha$  в сыворотке крови пациентов по сравнению с контрольной группой (8,61 (8,42/8,92) пг/мл). Также для псориатического артрита характерно повышенное содержание IL4 в сыворотке крови (11,31 (10,83/11,63) пг/мл) и синовиальной жидкости (359,09 (343,20/379,90) пг/мл). Проведение исследования по определению концентрации неоптерина в биологическом материале (сыворотке крови и синовиальной жидкости) пациентов исследуемой группы свидетельствуют о значительном достоверном статистически значимом ( $p < 0,05$ ) увеличении содержания данного цитокина в синовиальной жидкости (249,92 (216,50/273,31) нмоль/л). Наблюдается достоверное статистически значимое ( $p < 0,05$ ) повышение уровня неоптерина в сыворотке крови обследуемой подгруппы (4,20 (3,77/4,44) нмоль/л).

Для подагрического артрита характерно достоверное статистически значимое ( $p < 0,05$ ) повышение уровня содержания в сыворотке крови пациентов TNF $\alpha$  (7,61 (7,27/7,86) пг/мл), IL4 (11,15 (10,80/11,55) пг/мл) и неоптерина (4,74 (4,53/4,93) нмоль/л) по сравнению с контрольной группой. Данные, полученные при определении вышеуказанных цитокинов в синовиальной жидкости пациентов с подагрическим артритом, указывают на достоверное снижение содержания как IL4 (120,72 (109,06/125,70) пг/мл), так и неоптерина (66,81 (62,95/73,48) нмоль/л) в исследуемом биологическом материале по сравнению с другими группами пациентов.

Полученные в ходе исследования количественные данные по содержанию TNF $\alpha$ , IL4 и неоптерина указывают на то, что для остеоартроза характерно значительное повышение уровня TNF $\alpha$  в синовиальной жидкости (153,2 (148,3/163,0) пг/мл). При остеоартрозе наблюдается достоверное статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение концентрации IL4 в сыворотке крови пациентов (составило 12,45 (11,51/13,01) пг/мл) по сравнению с контрольной группой, а также повышение содержания неоптерина в сыворотке крови (5,69 (4,93/6,28) нмоль/л).

**Выводы.** На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Ревматоидный артрит характеризуется повышением содержания цитокинов TNF $\alpha$  и IL4 и снижением неоптерина в сыворотке крови, что может являться диагностическим критерием развития и течения данного заболевания. Несмотря на статистически достоверную подтвержденность различий полученных данных по определению количественных уровней цитокинов TNF $\alpha$ , IL4 и неоптерина в синовиальной жидкости, исследование данного биологического материала при указанной патологии является малоинформативным.

2. Установлено, что при реактивном артрите наблюдается резкое снижение содержания TNF $\alpha$  на фоне усиленной продукции неоптерина в сыворотке крови указанной группы пациентов.

3. При псориатическом артрите наблюдается повышение содержания всех исследуемых цитокинов TNF $\alpha$ , IL4, неоптерин в сыворотке крови, однако данные изменения носят

незначительных характер по сравнению, например, с ревматоидным артритом. Исследование синовиальной жидкости показывает наибольшие концентрационные уровни IL4 и неоптерина среди всех обследуемых групп.

4. Для подагрического артрита первостепенное значение имеет исследование синовиальной жидкости: усиленная продукция TNF $\alpha$  (самые высокие значения содержания данного показателя среди пациентов с воспалительными заболеваниями суставов) происходит на фоне резкого снижения содержания IL4 и неоптерина.

5. Для невоспалительных заболеваний суставов характерно нормальное содержание TNF $\alpha$  на фоне увеличения содержания IL4 и неоптерина в сыворотке крови, при этом повышенный уровень содержания TNF $\alpha$  в синовиальной жидкости данных пациентов может рассматриваться в качестве диагностического маркера развития и течения заболевания.

#### **Литература**

1. Ивашкин, В.Т. Болезни суставов. Пропедевтика, дифференциальный диагноз, лечение / В.Т. Ивашкин, В.К. Султанов. – М.: Литтера, 2005. – 544 с.
2. Relationship between angiogenesis and inflammation in experimental arthritis / G. Clavel [et al.] // Eur. Cytokine Netw. – 2006. – Vol. 17. – P. 202-210.
3. Gabriel, S.E. The epidemiology of rheumatoid arthritis / S.E. Gabriel // Rheum. Dis. Clin. North Amer. – 2001. – Vol. 27. – P. 269-281.
4. Weissmann, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis / G. Weissmann // Bull. NYU Hosp. Joint Dis. – 2006. – Vol. 64, № 1. – P. 12-15.
5. Klimiuk, P.A. Serum cytokines in different histological variants of rheumatoid arthritis / P.A. Klimiuk // J. Rheumatol. – 2001. – Vol. 28. – P. 1211-1217.
6. Brown, M. Functions of IL-4 and control of its expression / M. Brown, J. Hural // Crit. Rev. Immunol. – 2007. – V. 17. – P. 1-32.
7. Kaski, J.C. Neopterin: still a forgotten biomarker / J.C. Kaski, P. Avanzas, R. Arroyo-Espliguero // Clin. Chem. – 2005. – Vol. 28. – P. 1902-1903.
8. Veale, D. Immunopathology of psoriasis and psoriatic arthritis / D. Veale, C. Ritchlin, O. FitzGerald // Ann. Rheum. Dis. – 2005. – Vol. 64. – P. 9-26.
9. Наследов, А.Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных / А.Д. Наследов. – СПб.: Питер, 2008. – 416 с.

Поступила 23.09.2012

## **DIAGNOSTIC CRITERIA FOR DEVELOPMENT AND COURSE OF INFLAMMATORY AND NON-INFLAMMATORY JOINT DISEASES**

**Poluyan O.S., Kostiuk S.A.**

*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus*

In the course of the immunological investigation it was showed that the diagnostic criteria for development and course of rheumatoid arthritis is the increase of the TNF $\alpha$  and IL4 levels and the decrease of the neopterin level in blood serum; the sharp decrease of TNF $\alpha$  level against strengthened neopterin production in blood serum is characterized for the reactive arthritis; sharp increase of IL4 and neopterin levels in synovial fluid is characterized for psoriatic arthritis; the strengthened production of TNF $\alpha$  against sharp decrease of IL4 and neopterin level is characteristic for gouty arthritis; the increase of TNF $\alpha$  level in synovial fluid against the increase of IL4 and neopterin levels in blood serum is observed for osteoarthritis.

**Keywords:** inflammatory and non-inflammatory joint diseases, cytokines, neopterin.

## СПЕКТР ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G У ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В РЕАКЦИЯХ С ХРОМОГЕННЫМИ СУБСТРАТАМИ

Окулич В.К., Сенькович С.А., Савкина Ю.Г., Прищепенко В.А., Яцыно М.В.,  
Гончарова А.И.

*Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь*

**Резюме.** В реакциях с хромогенными субстратами бензоил-аргинин-р-нитроанилид (БАПНА), лизин-р-нитроанилид (ЛНА) и ацетил-аспартат-р-нитроанилид (ААНА), а также с эластин-Конго красным исследована протеолитическая активность иммуноглобулинов класса G (IgG) у пациентов с острой и хронической хирургической инфекцией. Выявлено, что у пациентов с хирургической инфекцией уровень БАПНА-амидазной активности был достоверно ( $p < 0,01$ ) выше, ЛНА-амидазной не отличался и ААНА-амидазной достоверно ( $p < 0,0001$ ) ниже, чем в группе здоровых доноров. Обнаружен значительный вклад абзимной активности в общую БАПНА — амидазную активность сыворотки у пациентов с хирургической инфекцией. Не обнаружено достоверно значимого уровня эластазной активности у препаратов IgG.

**Ключевые слова:** хирургическая инфекция, протеолитическая активность, абзимы.

**Введение.** Примерно с середины 80-х гг. XX века сформировалась новая область иммунологии, посвященная изучению антител, обладающих собственной каталитической активностью. Такие антитела-биокатализаторы были названы абзимами (abzymes, от англ. antibody + enzyme), или каталитически активными антителами, а соответствующая область иммунологии, биохимии и биотехнологии получила название «абзимология» [1]. С момента открытия этого явления проведен обширный цикл исследований, посвященных механизму каталитического действия абзимов, структуре каталитических антител, методам их получения, оценке кинетических параметров абзимных реакций [1, 2]. Предпринимаются попытки использования абзимного катализа в биотехнологических процессах. Доказано участие каталитических антител в патогенезе системных заболеваний соединительной ткани, аутоиммунных процессов [2, 3]. Обнаружено наличие абзимов у пациентов с инфекционной патологией, а также у здоровых лиц. Предполагается, что на основе абзимной активности возможна разработка новых диагностических критериев и методов терапии.

При взаимодействии макроорганизма с инфекционным агентом происходит массивная стимуляция иммунной системы антигенами микроорганизмов, в том числе его ферментами. При этом, согласно теории иммунных сетей Ерне, по механизму идиотип-антиидиотипического взаимодействия, возможно образование каталитических антител [4-6]. Появление таких абзимов, по-видимому, представляет собой побочный эффект продукции антиидиотипических антител [7]. Тем не менее, такие антитела могут участвовать в патогенезе инфекционных заболеваний за счет каталитической активности. Воздействие абзимов отличается от действия истинных ферментов макро- и микроорганизма из-за длительности (определяется периодом полувыведения антител и большей мягкости ферментного воздействия), поскольку энзимная активность антител в природных условиях, как правило, значительно уступает активности истинных ферментов. Влияние каталитических антител на течение инфекционного процесса может быть как положительным, так и отрицательным. Положительное влияние может быть обусловлено инактивацией микроорганизма, его факторов агрессии и инвазии, а также за счет изменения среды обитания бактерий. Отрицательное за счет разрушения структур макроорганизма.

Для оценки протеолитической активности в настоящее время широко используются хромогенные субстраты. При расщеплении этих субстратов по пептидной (амидной) связи

происходит высвобождение хромогенной молекулы, что изменяет оптическую плотность раствора. Наиболее широко распространены хромогенные субстраты выполненные на основе р-нитроанилида, придающего раствору после высвобождения вследствие разрыва амидной связи желтую окраску.

Учитывая высокую специфичность каталитических антител логично предположить, что взаимодействие с различными субстратами для определения протеолиза может протекать не одинаково и уровень активности будет значительно отличаться. Поэтому представляется важным оценить взаимодействие абзимов с протеолитической активностью с различными субстратами для определения протеолиза. Эти данные могут иметь значение для понимания патогенеза хирургической инфекции, а также для разработки новых диагностических критериев.

Каталитические антитела постепенно находят свою нишу для применения в медицине в качестве диагностических и лечебных средств. Дальнейшие исследования могут быть направлены на поиск новых видов абзимной активности антител, разработку критериев использования абзимов в диагностике заболеваний, а также на получение новых, высокоэффективных и специфичных препаратов каталитических антител.

**Цель исследования:** определить уровень протеолитической активности иммуноглобулинов G (IgG) пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями в сравнении со здоровыми донорами при взаимодействии с различными хромогенными субстратами.

**Материалы и методы** исследования. Нами исследованы препараты IgG из крови пациентов с острыми и хроническими гнойно-воспалительными процессами (опытные группы), и препараты IgG из крови доноров (контрольная группа). Выделение иммуноглобулинов начинали в день забора сыворотки крови без предварительной заморозки. Очистка проводилась в несколько этапов.

Первый этап — осаждение сыворотки крови 0,75% раствором риванола (2-этокси-6,9-диаминоакридина лактат) с последующей обработкой надосадка активированным углем для его удаления.

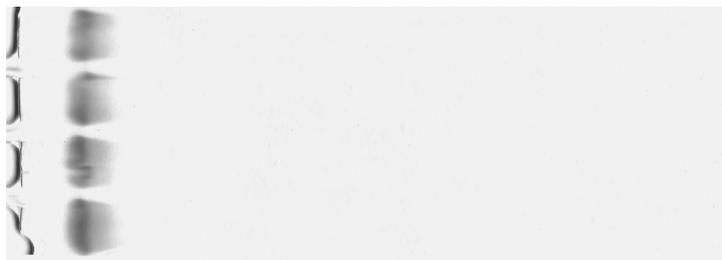
Далее проводили аффинную хроматографию полученного материала на агарозе, конъюгированной с протеином А золотистого стафилококка. Хроматографическую колонку последовательно отмывали 0,01 М фосфатным буферным раствором pH 7,4, содержащим 1% раствор твин 20 и 0,01 М фосфатным буферным раствором с pH 7,4 без детергента до исчезновения белка в элюенте.

Элюцию связавшихся с конъюгированным протеином А IgG вели 0,1 М глицин-HCl буфером, pH 2,8, которую контролировали по выходу белка с помощью метода Бредфорда.

Полученные иммуноглобулины концентрировали и дополнительно очищали: производили переосаждение в 40% растворе сульфата аммония, растворяли в 2 мл дистиллированной воды и проводили диализ против 2,5 л 0,9% NaCl четыре раза. Поскольку подкласс 3 IgG не связывается аффинно со стафилококковым протеином А, то полученный препарат содержал только IgG подклассов 1, 2 и 4.

До проведения анализов образцы иммуноглобулинов замораживали и хранили в жидком азоте или при  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  в холодильнике.

Контроль чистоты полученных препаратов иммуноглобулинов производили с помощью электрофореза в 10% и градиентном 4-20% полиакриламидном геле (рисунок 1) в присутствии додецил-сульфата натрия в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Гель окрашивали нитратом серебра.



Электрофоретические полосы гомогенные, отсутствуют дополнительные полосы  
Рисунок 1 — Электрофореграмма препаратов иммуноглобулинов G

Проверка стерильности полученного материала осуществлялась выборочным посевом проб иммуноглобулинов на кровяной агар и сахарный бульон.

Для оценки уровня протеолитической активности IgG нами были использованы хромогенные субстраты: бензоил-аргинин-р-нитроанилид (БАПНА), лизин-р-нитроанилид (ЛНА) и ацетил-аспартат-р-нитроанилид (ААНА). При расщеплении этих субстратов по амидной связи происходит высвобождение р-нитроанилина, что приводит к изменению цвета и оптической плотности реакционной смеси.

Методы для определения протеолитической активности были разработаны на основе метода Эрлангера [8, 9]. Субстратная смесь состояла из 0,8% раствора соответствующего субстрата на 0,02 М трис HCl-буфере с рН 7,4. Реакционная смесь состояла из 0,1 мл субстратной смеси и 0,1 мл иммуноглобулинов в концентрации 1,5 мг/мл для БАПНА и 1 мг/мл для остальных субстратов. В качестве отрицательного контроля использовали 0,9% раствор NaCl. Учет результатов реакции производили после 20-ти часовой инкубации при 37 °С на многоканальном спектрофотометре Ф300 при длине волны 405 нм.

Для пересчета полученных единиц оптической плотности в пикокаталы использовалась формула:

$$Y = 0,028 + 11xEOп,$$

где Y — искомый результат;

EOп — разница между оптической плотностью пробы и оптической плотностью контроля.

Предложенная формула была выведена на основе определения зависимости оптической плотности, измеренной на иммуноферментном анализаторе Ф300, от молярной концентрации р-нитроанилина в растворе (при распаде 1 молекулы БАПНА, ЛНА или ААНА образуется 1 молекула р-нитроанилина). Нами был построен калибровочный график (рисунок 2) с коэффициентом корреляции 0,99 ( $p < 0,001$ ).

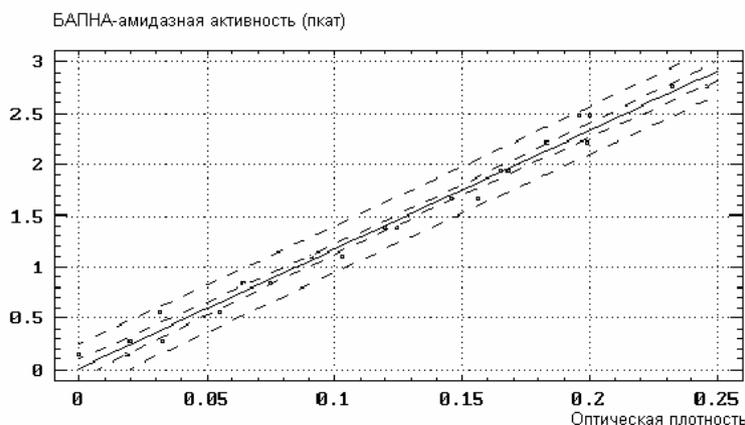


Рисунок 2 — Калибровочный график для определения БАПНА-мидазной активности

При определении БАПНА-амидазной активности сывороток крови субстратная смесь состояла из 0,2 мл раствора БАПНА и 0,005 мл сыворотки. В остальном, метод был аналогичен методике для оценки активности иммуноглобулинов. Определение количества иммуноглобулинов в сыворотке производили с помощью набора для иммуноферментного анализа «IgG общий — ИФА–БЕСТ» (ЗАО «Вектор-БЕСТ», Россия). Для определения вклада БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов в общую сывороточную активность вычисляли общую активность иммуноглобулинов в сыворотке умножением удельной активности иммуноглобулинов на их концентрацию в сыворотке. Далее вычисляли долю активности, приходящейся на иммуноглобулины в общей сывороточной активности делением общей активности иммуноглобулинов на активность сыворотки.

Оценку эластазной активности препаратов иммуноглобулинов производили по изменению оптической плотности раствора при высвобождении Конго красного из эластина вследствие его расщепления. В ряд эппендорфов вносили последовательно: 0,4 мл раствора эластина-Конго красного на трис-НСI буфере pH 7,4 (8,8) и 0,1 мл IgG в концентрации 1 мг/мл. В контрольных пробах вместо иммуноглобулинов использовали 0,9% раствор NaCl. Инкубацию проб проводили в термостате при  $t=37^{\circ}\text{C}$  в течение 20 ч. Затем пробы извлекали из термостата и центрифугировали в течение 7 мин (10 тыс об/мин; MICRO 120) для осаждения оставшегося в виде не разрушенных частиц эластина-Конго красного. Учет результатов реакции производили на многоканальном спектрофотометре Ф300 при длине волны 492 нм.

Для сравнения достоверности отличия данных в различных группах использовали критерий Манна-Уитни. Корреляцию оценивали методом Пирсона.

Результаты исследования. Выявлено, что уровень БАПНА-амидазной активности IgG в группах пациентов с гнойными процессами был достоверно выше ( $p<0,01$ ), чем у здоровых доноров. Достоверных отличий (табл. 1) между группами в зависимости от остроты гнойного процесса выявлено не было ( $p>0,05$ ).

Таблица 1 — БАПНА-амидазная активность IgG

Группа	N	Медиана Пкат	Процентиль 25-75 Пкат	Достоверность отличий
Хронический остеомиелит	40	0,27	0 - 0,524	P1-3<0,01 P2-3<0,001
Острые гнойно- воспалительные заболевания	35	0,281	0,148 – 0,453	
Здоровые доноры	16	0,056	0,006-0,105	

Нами произведена оценка вклада, приходящегося на долю IgG в общую БАПНА-амидазную активность сыворотки крови. Мы исследовали пары иммуноглобулин-сыворотка, полученные от 12 пациентов с хроническим остеомиелитом и 7 пациентов с острой хирургической инфекцией. Обнаружено (таблица 2), что доля IgG в общей сывороточной протеолитической активности у пациентов с хирургической инфекцией оказалась весьма значительной и составила для лиц с хроническим остеомиелитом: медиана — 11,64%, 25-75 процентиля — 6,19% и 46,86%, а у пациентов с острыми гнойно-воспалительными процессами: медиана — 16,31%, 25-75 процентиля — 7,84% и 96,8%.

Таблица 2 — Доля БАПНА-амидазной активности IgG в общей сывороточной активности

	Общая сывороточная активность пкат/мл	Удельная активность IgG пкат/мг	Общая активность IgG сыворотки пкат/мл	Доля активности IgG в общей сывороточной активности%
Хронический остеомиелит	39,6 (18,2-73,2)	0,526 (0,252-0,699)	6,67 (3,54-14,32)	11,64 (6,19-46,86)
Острые гнойно- воспалительные процессы	16,3 (5-32,1)	0,515 (0,13-0,755)	5,92 (1,722-12,33)	16,31 (7,84-96,8)

Примечание: достоверных отличий между группами не выявлено.

Следует отметить, что в 4 парах сыворотка-иммуноглобулин расчетная доля активности иммуноглобулина приближалась и даже превышала 100%. Очевидно, это связано с тем, что в сыворотке протеолитическая активность блокируется антипротеазами, но тем не менее, вклад иммуноглобулинов в общую сывороточную активность остается весьма значительным, что может играть роль в патогенезе гнойно-воспалительных заболеваний.

При оценке ЛНА-амидазной активности иммуноглобулинов (табл. 3) оказалось, что ее уровень у пациентов с гнойно-воспалительными процессами (0,325; 0,149-0,996 пкат, n=21) не отличался достоверно ( $p>0,05$ ) от уровня активности у здоровых доноров (0,281; 0,259-0,358 пкат, n=16).

Таблица 3 — ЛНА-амидазная активность IgG

Группа	N	Медиана Пкат	Процентиль 25-75 Пкат	Достоверность отличий
Острые гнойно-воспалительные заболевания	21	0,325	0,149 -0,996	$p>0,05$
Здоровые доноры	16	0,281	0,259-0,358	

Уровень ацетил-аспартат-р-нитроанилид-амидазной активности иммуноглобулинов (таблица 4) у пациентов с гнойно-воспалительными процессами был достоверно ( $p<0,0001$ ) ниже (0; 0-0,083 пкат, n=21), чем в группе здоровых доноров (0,122; 0,083-0,149 пкат, n=16).

Не обнаружено корреляции между уровнями БАПНА-амидазной, ЛНА-амидазной и ААНА-амидазной активностями иммуноглобулинов у здоровых доноров. В тоже время в группе пациентов с хирургической инфекцией обнаружены достоверные ( $p<0,01$ ) сильные ( $r>0,6$ ) корреляции между всеми парами активностей.

При определении эластазной активности (n=12) не выявлено достоверных отличий между опытной и контрольной группой.

Таблица 4 — ААНА-амидазная активность IgG

Группа	N	Медиана Пкат	Процентиль 25-75 Пкат	Достоверность отличий
Острые гнойно-воспалительные заболевания	21	0	0 – 0,083	$p<0,0001$
Здоровые доноры	16	0,122	0,083 – 0,149	

#### Выводы:

1. Выявлено, что большинство проб IgG пациентов с гнойно-воспалительными процессами и здоровых доноров обладают протеолитической активностью за исключением эластазной.

2. Обнаружено, что в группе пациентов с хирургической инфекцией уровень БАПНА-амидазной активности был достоверно выше, ЛНА-амидазной не отличался, в тоже время уровень ААНА-амидазной активности оказался достоверно ниже, чем в группе здоровых доноров.

3. У лиц с гнойно-воспалительными процессами обнаружены сильные корреляции уровня протеолитической активности иммуноглобулинов при взаимодействии с различными субстратами, что свидетельствует о однонаправленном изменении уровня различных видов протеолитической активности иммуноглобулинов у пациентов с гнойными процессами. В группе здоровых доноров такие корреляции отсутствуют.

4. У пациентов с хирургической инфекцией установлено, что в общую БАПНА - амидазную активность сыворотки значительный вклад вносит абзимная активность (11,64% и 16,31% при хронических и острых гнойно-воспалительных процессах соответственно).

#### Литература

1. Генералов, И.И. Абзимная активность иммуноглобулинов / И.И. Генералов. – Витебск: изд-во Витебск. гос. мед. ун-та, 2000. – 152 с.
2. Невинский, Г.А. Каталитически активные антитела (обзор) / Г.А. Невинский, Д.В. Семенов, В.Н. Бунева // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – С. 1459-1472.
3. Сидорская, Е.В. Каталитическая активность препаратов IgG при заболеваниях щитовидной железы / Е.В. Сидорская, И.И. Генералов, А.Н. Окоороков // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2000. – № 1. – С. 57-61.
4. Jerne, N.K. Towards a network theory of the immune system / N.K. Jerne // Ann. Immunol. (Paris). – 1974. – Vol. 125C, N 1-2. – P. 373-389.
5. Monroe, J.G. Anti-idiotypic antibodies and disease / J.G. Monroe, M.I. Green // Immunol. Invest. – 1986. – Vol. 2. – P. 15-17.
6. Иммуноглобулины класса G с гиалуронидазной активностью и возможные механизмы их образования / К.С. Азаренок [и др.] // Иммунология. – 1989. – № 2. – С. 15-17.
7. Иммунология: пер. с англ., в 3 т. / У. Пол. [и др.]; под общ. ред. У. Пола. – М.: Мир, 1988. – Т. 2. – 456 с.
8. Erlanger, B.F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / B.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen // Arch. Biochem. Biophys. – 1961. – Vol. 95. – P. 271-276.
9. Определение БАПНА-амидазной активности микроорганизмов, сывороток крови и иммуноглобулинов класса G: инструкция на метод; рег. № 6-0101 / В.К. Окулич [и др.]. – 2002.

Поступила 24.07.2012

## SPECTRUM OF PROTEOLYTIC ACTIVITY OF IMMUNOGLOBULINS G IN PATIENTS WITH SURGICAL INFECTION IN REACTIONS WITH CHROMOGENIC SUBSTRATES

**Okulich V.K., Senkovich S.A., Savkina Y.G., Pryschepenko V.A., Yatsyno M.V., Goncharova A.I.**

*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus*

Proteolytic activity of IgG class antibodies in the reactions with chromogenic substrates – benzoyl-arginin-p-nitroanilid (BAPNA), lyzin-p-nitroanilid (LPA) and acetyl- aspartate-p-nitroanilid (AANA), and also with elastin-Congo red has been investigated in patients with acute and chronic surgical infections. It was revealed that in patients with surgical infections level BAPNA-amidase activity was authentically higher ( $p<0,01$ ), LPA-amidase activity wasn't differ and AANA-amidase activity was authentically ( $p<0,0001$ ) lower, then in group of healthy donors. The considerable contribution of the abzyme activity to the general serum BAPNA-amidase activity in patients with surgical infections was founded. Evidence of significant level of elastase activity in IgG preparations was no found.

**Keywords:** surgical infections, proteolytic activity, abzyme.

## ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ К РАЗРУШЕНИЮ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДНОГО МАТРИКСА БИОПЛЕНОК

**Плотников Ф.В., Окулич В.К., Сенькович С.А., Кабанова А.А.**

*Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь*

**Резюме.** В представленном исследовании произведена оценка способности поликлональных препаратов иммуноглобулинов G, выделенных от пациентов с гнойно-воспалительными процессами и здоровых доноров, разрушать экзополисахариды матрикса биопленок. Показано, что способность разрушать экзополисахариды достоверно чаще встречается и более выражена у иммуноглобулинов здоровых доноров. Полученные данные могут иметь значение для понимания патогенеза инфекционных процессов.

**Ключевые слова:** биопленка, экзополисахаридный матрикс, иммуноглобулины, абзимы, хирургическая инфекция.

**Введение.** Несмотря на значительные успехи, проблема гнойно-воспалительной хирургической инфекции остается актуальной. Развитие инфекционного процесса представляет собой сложное взаимодействие макро- и микроорганизмов [1]. Без знания особенностей этого взаимодействия невозможна разработка новых методов диагностики и лечения гнойно-воспалительных заболеваний.

Недостаточная эффективность проводимого лечения хирургической инфекции в определенной мере объясняется наличием у микроорганизмов действенных механизмов защиты от внешних повреждающих факторов. Одним из таких механизмов защиты микроорганизмов от воздействия факторов иммунной защиты макроорганизма является образование структурированных сообществ — биопленок. Биопленки — это естественные сообщества бактерий, фиксированные на плотной поверхности и окруженные экзополисахаридным матриксом [2]. Матрикс, выделяемый бактериями, занимает 85% массы биопленки и защищает тела бактерий от неблагоприятных воздействий, в том числе от факторов иммунной защиты.

На сегодняшний день биопленкообразование госпитальными штаммами бактерий является серьезной угрозой для практического здравоохранения. Особое значение эта проблема приобретает в отделениях интенсивной терапии, хирургических стационарах, поскольку образование биопленок является причиной возникновения тяжелых катетер и вентиляторассоциированных нозокомиальных инфекций, сепсисов, пневмоний и летальных исходов. Большие экономические потери связаны с неэффективной антибиотикотерапией при биопленка-ассоциированной инфекции. Отдельными исследованиями показано, что экзополисахаридный матрикс физически предотвращает доступ некоторых антибактериальных агентов в биопленку, действуя как ионообменник, ограничивая таким образом распространение нежелательных веществ из окружающей среды в биопленку. Концентрации антибиотиков, требуемых для достижения бактерицидного эффекта для микроорганизмов, структурированных в биопленку, в некоторых случаях, в зависимости от природы антибиотика, может быть в 10-100 раз выше, чем для планктонных форм данной бактерии. Проблема повышенной резистентности биопленок к действию антимикробных препаратов заключается в нескольких аспектах. Это диффузионный барьер; способность бактерий накапливать в матриксе внеклеточные ферменты, разрушающие антибиотики; агрегационная природа биопленок, связанная с уменьшением площади открытой поверхности клеток — физическая недоступность молекул; и, собственно, резистентный фенотип клеток. Исследования выявили снижение скорости проникновения через микробные биопленки различных групп антибактериальных препаратов: фторхинолонов, аминогликозидов, бета-лактамов антибиотиков, гликопептидов [3].

С 1986 г. началось активное развитие новой области иммунологии, посвященной изучению каталитических антител (абзимов). Показано, что антитела с собственной ферментной активностью могут быть обнаружены у пациентов с различными патологическими процессами, а также у здоровых лиц. Значение их до конца не изучено. Доказана роль абзимов в патогенезе системных заболеваний соединительной ткани, аутоиммунных процессов. Есть мнение и о возможном протективном действии каталитических антител [4]. Учитывая, что к настоящему времени обнаружены природные абзимы, катализирующие различные реакции, представляется целесообразным оценить способность каталитических антител воздействовать на матрикс биопленок, как защитно-приспособительную реакцию на инфекционный агент.

**Цель исследования:** оценить способность поликлональных иммуноглобулинов расщеплять экзополисахаридный матрикс биопленок.

**Материалы и методы.** Нами исследованы препараты иммуноглобулинов G из крови пациентов с острыми и хроническими гнойно-воспалительными процессами в сравнение с

иммуноглобулинами, полученными от здоровых доноров (контрольная группа). Выделение иммуноглобулинов проводилось риванол-сульфатным методом с использованием аффинной хроматографии на протеине А стафилококка [5].

Для получения биопленки 10 мл взвеси *P. aeruginosa* в концентрации  $0,15 \cdot 10^8$  КОЕ/мл вносили в стерильную чашку Петри с мясо-пептонным агаром. Предварительно на агар помещали стерильную нитроцеллюлозную мембрану, на которой и происходило формирование биопленки. После 3 суток инкубации при температуре 37 °С мембрану извлекали и биопленку смывали стерильным физиологическим раствором. К полученной суспензии добавляли в избытке раствор конго-красного. Этот краситель способен специфически связываться с полисахаридами матрикса и практически не взаимодействует со структурными элементами бактерий [6]. Суспензию дважды отмывали физиологическим раствором для удаления не связавшегося раствора конго-красного, добавляли азид натрия до концентрации 2 мг/мл для подавления роста бактерий и замораживали до проведения эксперимента.

Реакцию ставили в пробирках типа «эппендорф». Реакционная смесь состояла из 0,1 мл раствора иммуноглобулинов в концентрации 1 мг/мл и 0,3 мл суспензии биопленки. Учет результатов реакции проводили через 24 часовой период инкубации при 37 °С. Реакционную смесь центрифугировали 10 мин при 12 тыс. оборотов в минуту для осаждения не разрушенных элементов биопленки и переносили по 0,15 мл надосадка в лунки планшета для иммуноферментного анализа. Далее производили учет реакции по увеличению оптической плотности надосадка на спектрофотометре Ф-300 при длине волны 492 нм за счет высвобождения конго-красного при разрушении комплекса красителя с полисахаридами. В качестве отрицательного контроля вместо раствора иммуноглобулинов использовали физиологический раствор. Значения представляли в виде  $E_{оп} = (E_{оп}(опыт) - E_{оп}(контроль)) \cdot 1000$ . Определение активности каждого препарата иммуноглобулинов производили трехкратно.

Полученные результаты обрабатывались с помощью компьютерных программ Statistica 7.0 и «Excel». Перед использованием методов описательной статистики определяли тип распределения количественных признаков. При распределении признака, отличным от нормального, вычисляли медиану (Me), нижний 25-й (LQ) и верхний 75-й квартили (UQ). Оценку статистической значимости различий частоты встречаемости признаков использовали точный критерий Фишера. Для оценки статистической значимости между независимыми группами использовался критерий Манна–Уитни. Различия признавались статистически значимыми при  $p < 0,05$ , при множественных сравнениях использовалась поправка Бонферони [7].

**Результаты и их обсуждение.** Всего нами исследовано 10 препаратов иммуноглобулинов G пациентов с гнойно-воспалительными процессами в сравнении с 15 препаратами здоровых доноров. Уровень активности в опытной группе составил: медиана — 7  $E_{оп}$ ; 25-75 процентиля 0–27  $E_{оп}$ , и не отличался достоверно ( $p > 0,5$ , критерий Манна–Уитни) от уровня активности в группе здоровых доноров (соответственно 16; 12–20  $E_{оп}$ ) (таблица).

Таблица — Уровень активности препаратов иммуноглобулинов G

Исследуемые группы	n	Me	LQ	UQ
Опытная группа	10	7	0	27
Контрольная группа	15	16	12	20

Однако из 10 препаратов иммуноглобулинов опытной группы только в 1 обнаружена достоверно положительная активность, что достоверно меньше ( $p < 0,001$ , точный критерий Фишера), чем в группе здоровых доноров, где достоверно положительная активность выявлена во всех препаратах иммуноглобулинов.

Таким образом, у здоровых лиц частота встречаемости способности иммуноглобулинов G разрушать матрикс биопленки выше, чем у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями. Можно предположить, что данный феномен может являться частью естественной защиты макроорганизма от сообществ бактерий. Однако вероятен вариант, что бактерии способны вырабатывать факторы агрессии, вызывающие специфический иммунодефицит пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями. Соответственно, пациенты со сниженной каталитической активностью антител к матриксу биопленки оказываются менее защищенными от возбудителей способных образовывать биопленки.

#### **Выводы:**

1. Показано, что препараты поликлональных иммуноглобулинов G, выделенные из крови пациентов с гнойно-воспалительными процессами и здоровых доноров, способны разрушать экзополисахариды матрикса биопленки.

2. Частота встречаемости способности иммуноглобулинов G разрушать экзополисахариды биопленки у пациентов с гнойно-воспалительными процессами оказалась с высокой степенью достоверности ниже, чем иммуноглобулинов G у здоровых доноров.

3. Способность иммуноглобулинов G разрушать экзополисахариды матрикса биопленки может являться частью иммунной защиты и играть роль в развитии инфекционного процесса.

#### **Литература**

1. Антибактериальная терапия в гнойной хирургии: руководство / под ред. А.Н. Косинца. – Витебск: ВГМУ, 2002. – С. 30-31.
2. Davey, M.E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics / M.E. Davey, G.A. O'Toole // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2000. – Vol. 64, N 4. – P. 847-867.
3. Gilbert, P. Biofilms susceptibility to antimicrobials / P. Gilbert, J. Das, I. Foley // Adv. Dent. Res. – 1997. – Vol. 11. – P. 160-167.
4. Генералов, И.И. Абзимная активность иммуноглобулинов / И.И. Генералов. – Витебск: ВГМУ, 2000. – 152 с.
5. Фримель, Г. Иммунологические методы / Г. Фримель. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
6. Allison, D.G. A staining technique for attached bacteria and its correlation to extracellular carbohydrate production / D.G. Allison I.W. Sutherland // J. Microbiol. Meth. – 1984. – Vol. 2. – P. 93-99.
7. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.

Поступила 16.07.2012

## **CAPACITY OF IMMUNOGLOBULINS FROM PATIENTS WITH SURGICAL INFECTION TO DESTROY EXOPOLYSACCHARIDE MATRIX BIOFILM**

**Plotnikov F.V., Okulich V.K., Senkovich S.A., Kabanova A.A.**

*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus*

In the present study the ability of polyclonal immunoglobulin G, isolated from patients with purulent-inflammatory diseases and healthy donors, to destroy the biofilm matrix of exopolysaccharides has been evaluated. It was shown that the ability to destroy the exopolysaccharides was significantly more frequent and more pronounced in immunoglobulins from healthy donors. These data may have implications for understanding the pathogenesis of infectious processes.

**Keywords:** biofilm, exopolysaccharide matrix, immunoglobulins, abzymes, surgical infection.

## КУЛЬТУРАЛЬНАЯ, МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА *Mycoplasma genitalium*, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ ЛИЦ С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ

Рубаник Л.В.<sup>1</sup>, Асташонок А.Н.<sup>1</sup>, Шишпоренок Ю.А.<sup>1</sup>,  
Руденкова Т.В.<sup>2</sup>, Квачева З.Б.<sup>1</sup>, Полещук Н.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;

<sup>2</sup>Белорусская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

**Резюме.** Исследован соскобный материал 23 пациенток с репродуктивными нарушениями из уретры и цервикального канала на наличие *Mycoplasma genitalium*. Скомбинирована питательная среда («ПС-Mg»), которая позволила выделить и накопить два штамма возбудителя (МГ-9, МГ-20) в титрах 104 и 103 КОЕ/мл. Сравнительный анализ со стандартной средой («Микоплазма гениталиум», РФ) не выявил отличий в характере роста анализируемых штаммов. Штамм *M. genitalium* МГ-9, имевший более высокий титр после предварительного накопления, внесен в культуру клеток Vero. Проведено моделирование инфекционного процесса *in vitro*. С помощью электронно-микроскопического анализа дана морфологическая характеристика возбудителя и описаны ультраструктурные особенности специфических изменений, обнаруженных в клетках. Модифицированная питательная среда перспективна для выделения, накопления и изучения штаммов *M. genitalium*, циркулирующих на территории Республики Беларусь.

**Ключевые слова:** *Mycoplasma genitalium*, питательная среда, электронная микроскопия.

**Введение.** В последние годы актуальность проблемы воспалительных процессов урогенитального тракта ассоциированных с *M. genitalium* значительно возросла. Данный возбудитель рассматривают как причину острых и хронических заболеваний мочеполовой системы, длительная персистенция которого способствует нарушению репродуктивной функции [1]. Патоген может прикрепляться к сперматозоидам и снижать их активность, что в дальнейшем может приводить к возникновению вторичного бесплодия [2].

Интерес к *M. genitalium* обусловлен уникальностью биологических свойств возбудителя, в морфогенезе которого присутствуют черты характерные не только для бактерий, но и вирусов [3]. В отличие от других видов микоплазм (*M. hominis*, *Ur. urealyticum*) данная разновидность возбудителя при своей репродукции затрагивает ядерный аппарат клеточной мишеней, напрямую повреждая геном [4].

Показано, что *M. genitalium* имеет размеры от 0,2 до 0,4 мкм, маленький геном — около 600 т.н.п., отличается большим полиморфизмом как по морфологии, так и в особенностях структуры поверхностного S-слоя. Возбудитель подвижен, т.к. имеет особые жгутикоподобные структуры, выполняющие роль сократительного аппарата [3].

На фоне отсутствия клеточной стенки *M. genitalium* обладает высокой генетически детерминированной антигенной вариабельностью, которая обуславливает присутствие в одной популяции фенотипически различающихся разновидностей патогена. Гено- и фенотипические особенности возбудителя во многом и определяют его вирулентность [3, 4].

*M. genitalium* относится к труднокультивируемым микроорганизмам и требует для своего роста наличия целого комплекса питательных веществ. В настоящее время разработано несколько подходов для выделения и накопления патогена: жидкие питательные среды (SP4, Friis), плотные питательные среды, содержащие агар и культуры клеток (Vero, McCoy, Hela, Hep-2 и др.) [5]. Однако все используемые подходы по накоплению возбудителя и изучению *in vitro* его биологических свойств имеют свои недостатки, основным из которых является потеря *M. genitalium* при культивировании ряда структурных детерминант, отвечающих за иммуногенные и патогенные свойства.

В Республике Беларусь производство отечественных сред отсутствует, в связи с чем

исследования культуральных, ультраструктурных, молекулярно-генетических и других особенностей штаммов *M. genitalium*, циркулирующих среди населения страны ограничены. Этот аспект обуславливает актуальность необходимости создания ростовой среды, накопления возбудителя в препаративных количествах и изучения его биологических свойств.

**Цель исследования:** скомпоновать отечественную питательную среду для выделения *M. genitalium*, отработать методику накопления возбудителя и изучить основные этапы его морфогенеза в культуре клеток.

**Материалы и методы.** Обследовано 23 женщины с репродуктивными нарушениями на фоне воспалительных заболеваний урогенитального тракта (эндометрит, аднексит). Мазки-соскобы забирались, транспортировались и культивировались в транспортной (ТС-Mg) и питательной (ПС-Mg) средах собственного приготовления РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Среда была приготовлена на основании прописи ингредиентов, имеющих в литературе [6] в нашей модификации с добавлением ростовых компонентов.

Параллельно, мазки-соскобы из уретры, цервикального канала, влагалища забирались в стандартную транспортную среду «Микоплазма-Т». Выделение возбудителя проводили в другой жидкой питательной среде «Микоплазма гениталиум». Обе стандартные среды производства ФГУН НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора, РФ были использованы в качестве сред сравнения для оценки эффективности транспортировки и выделения из клинического материала (мазков-соскобов) *M. genitalium* в разработанных нами транспортной (ТС-Mg) и жидкой селективной питательной (ПС-Mg) средах.

После внесения клинического материала в селективную среду культивирование осуществляли при +37 °С в течение 96 часов. Результаты оценивали по проявлению роста и изменению рН-индикатора питательной среды от красной, красно-малиновой до желтой.

Для количественного определения ДНК *M. genitalium* использовали детекцию однокопийного гена *gap* возбудителя методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Данный ген кодирует гликолитический фермент глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназу (GAPDH). При этом были использованы специально подобранные пары праймеров и зонды, которые были выбраны из нуклеотидной последовательности *gap* гена *M. genitalium* (номер регистрации в GeneBank NP\_072968) с использованием Vector NTI программного обеспечения: forward-праймер — 5'-GTG CTC GTG CTG CAG CTG T-3'; reverse-праймер — 5'-GCT TGA TTT ACT TGT TCA ACA GAT GGA C-3'; TaqMan олигонуклеотидный зонд — 5'-(FAM) TGT TGT TCC AGA AGC AAA TGG CAA ACT T (TAMRA)-3'. Подобранные праймеры позволяют детектировать фрагмент *gap* гена *M. genitalium* длиной 190 п.н. Зонд метили флуорохромом 6-carboxyfluorescein [FAM] на 5' конце и гасителем флуоресценции 6-carboxytetramethylrhodamine [TAMRA] на 3' конце.

Общую ДНК выделяли из образцов культур с использованием сорбентной методики. Для определения концентрации ДНК *M. genitalium* в растворе выделенной ДНК проводили ПЦР-РВ с использованием в качестве калибровочного референсного материала плазмиду pMGgap, содержащую исследуемый фрагмент гена в концентрациях от 5x10<sup>5</sup> до 5x10<sup>1</sup> копий/мл. Плазмида была подготовлена на базе лаборатории биотехнологии и соединений нуклеиновой природы ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси».

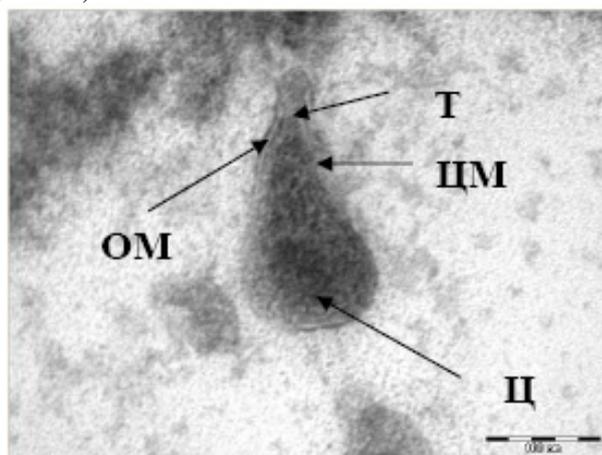
Были получены следующие концентрации ДНК *M. genitalium* в исследованных образцах: образец № 9 — 8,1x10<sup>4</sup> копий/мл, образец № 20 — 1,3x10<sup>3</sup> копий/мл.

Для проведения электронно-микроскопического исследования *M. genitalium*, выращенной на питательных средах и выделенной в культуре клеток Vero, была выбрана оптимальная для данного микроорганизма осмолярность фиксирующих смесей с предварительной фиксацией возбудителя *in situ* 1% глутаральдегидом на 0,1 М натрий-какодилатном буфере (рН 7,4) с последующей дофиксацией четырехокисью осмия, приготовленного на том же буфере. Образцы заключали в аралдит по общепринятой методике. Ультратонкие срезы

окрашивали насыщенным 1% раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу. Срезы анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-1011 при ускоряющем напряжении 100 кВт и инструментальном увеличении от 10 000 до 300 000.

**Результаты и их обсуждение.** Для обнаружения, идентификации и первичного выделения *M. genitalium* проводилось внесение исследуемого соскобного материала, как в среду сравнения, так и разработанную нами модифицированную питательную среду. Качественный анализ присутствия возбудителя в исследуемых средах оценивался по изменению цвета ее рН-индикатора (от красной до желтой). Результаты показали, что скомпонованная отечественная питательная среда («ПС-Mg») позволила выделить и накопить два штамма возбудителя (МГ-9 МГ-20) в титрах 104 и 103 КОЕ/мл. Сравнительный анализ со стандартной средой («Микопlasма гениталиум», РФ) не выявил отличий в характере роста анализируемых штаммов.

Результаты сравнительного анализа морфологии и ультраструктуры штамма *M. genitalium* МГ-20, выделенного как на среде сравнения, так и на разработанной нами модифицированной питательной среде показали значительный полиморфизм внеклеточных форм возбудителя. На обеих средах чаще всего визуализировались бактериальные структуры грушевидной или бокаловидной («бутылкообразной») формы со средними размерами 250-400 нм, соответствующие типичным вегетативным активно-пролиферирующим формам *M. genitalium* (рисунок 1).



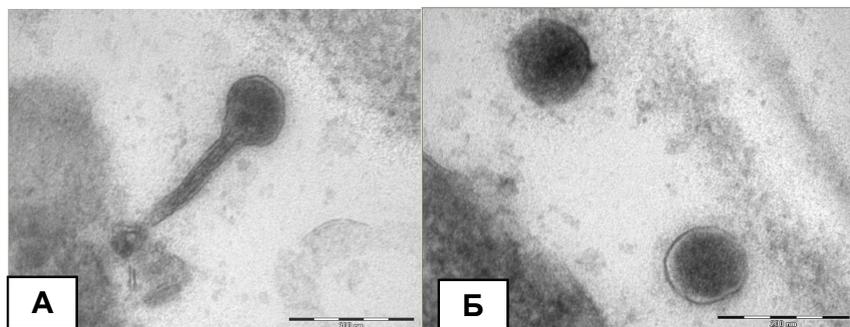
ОМ — ограничивающая мембрана, ЦМ — цитоплазматическая мембрана,  
Ц — цитопlasма, Т — терминальная структура (“bleb”). Ув. x300 000.

Рисунок 1 — Ультраструктурные особенности типичной бокаловидной формы *Mycoplasma genitalium*, выращенной на жидкой питательной среде

Основываясь на данных общей морфологии и ультраструктурной организации большинства описанных видов класса *Mollicutes* следует отметить ряд ультраструктур, хорошо выраженных у выделенного нами штамма возбудителя. Так, на поверхности ограничивающей мембраны различалась неоднородная электронно-плотная гомогенная субстанция, напоминающая «капсулу» или капсулоподобные образования. Подобные структуры ранее с помощью электронно-микроскопического анализа были обнаружены только у некоторых представителей микоплазм, таких как *M. pneumoniae*, *M. arthritidis*, *Ur. urealyticum* и т.д. [7]. Функции этих структур однозначно не определены, однако показано, что полисахариды, входящие в состав «капсул» микоплазм могут необратимо связываться с отрицательно заряженными поверхностями. В этой связи предполагается, что подобные элементы опосредуют прикрепление микоплазм к эукариотическим клеткам-хозяевам, а также, по-видимому, обладают антифагоцитарными свойствами, что обуславливает устойчивость данных микроорганизмов к перевариванию ферментами и, как следствие, длительную внутриклеточ-

ную персистенцию [7]. Помимо «капсулоподобных элементов» в структуре ограничивающей мембраны возбудителя обнаруживались зернистые нитевидные образования, которые имели вид тонких диффузных отростков. Аналогичные элементы были описаны для других видов микоплазм, в частности *M. pneumoniae*. Истинная их роль в настоящее время не известна, тем не менее, по мнению Razin S. [8], данные образования являются примитивными компонентами «цитоскелета» *M. genitalium*, которые, вероятно, поддерживают не только целостность всей структуры возбудителя, но и обеспечивают характерный скользящий тип движения возбудителя. Особые полярные структуры (“tip” или “bleb” — пузырек), отмеченные для других видов микоплазм, просматривались нерегулярно. Тем не менее, в ряде случаев они отчетливо различались и имели определенную ультраструктурную организацию. Диаметр их поперечного сечения составлял около 40 нм, на некоторых профилях сечения различались 3-4 электронно-плотных гранул или глобул размером 5-7 нм. По имеющимся литературным данным, данные полярные структуры определяют направление движения большинства видов микоплазм и обеспечивают сайт-специфическую адсорбцию возбудителя на поверхность эукариотической клетки хозяина [9]. Внутреннее содержимое протопласта описанных частиц возбудителя обладало повышенной электронной плотностью из-за наличия большого количества поли- и рибосомальных гранул. Нуклеоид просматривался достаточно редко, если он и различался, то, как правило, был представлен плотным осьmioфильным веществом.

Кроме описанных типичных вегетативных форм *M. genitalium* на ультратонких срезах нередко визуализировались палочковидные, гантелеобразные формы (рисунок 2, А), небольшие сферы (рисунок 2, Б), а также различные полигональные структуры возбудителя, также ограниченные по периферии трехслойной мембраной. Подобные формы возбудителя были лишены каких-либо полярных образований, однако имели конденсированный нуклеоид и электронно-плотную структуру мембран. Цитоскелетоподобные структуры не просматривались.



А — гантелеобразная форма возбудителя. Ув. x300 000.

Б — возбудитель сферической, кокковидной формы. Ув. x300 000

Рисунок 2 — Полиморфизм различных морфологических форм *M. genitalium*

Ультраструктурное изучение морфогенеза *Mycoplasma genitalium* в культуре клеток *Vero*. Изучение репродукции штамма *M. genitalium* МГ-20 в культуре клеток *Vero* позволило установить некоторые особенности морфогенеза данного возбудителя. Спустя 72 часа после инфицирования внутри клеток, как правило, обнаруживались многочисленные, реже одиночные специфические включения. Мембрана, ограничивающая подобные включения, имела извилистые края, однако сохраняла целостность на всем протяжении своей окружности, поэтому отдельные включения, хотя и находились в тесном контакте, не сливались друг с другом. Обращало на себя внимание характер расположения включений: большинство из них локализовались вблизи клеточного ядра, инвагинируя его отдельные участки и смещая ядро к периферии цитоплазмы. Внутри включений визуализировался возбудитель,

находящийся на различных этапах своего морфогенеза. Чаще всего наблюдали полиморфные частицы округлой, овальной, коккобацилярной, грушевидной или бокаловидной формы со средними размерами 200-400 нм. Цитоплазма подобных частиц была ограничена цитоплазматической мембраной, состоящей из двух электронно-плотных слоев, разделенных электронно-прозрачным слоем. У более крупных форм цитоплазма имела не однородную текстуру и была поделена на две области: осьmioфильную, по краям бактериальной структуры, с мелкими гранулярными элементами, вероятно рибосомами, и центральную прозрачную область, в пределах которой обнаруживалось множество тонких фибриллярных структур, по-видимому, являющихся нитями ДНК нуклеоида. Особые полярные терминальные структуры просматривались только у частиц возбудителя, имеющих классическую грушевидную или бокаловидную форму. Каких-либо «цитоскелетоподобных» структур не было обнаружено, либо они встречались не регулярно.

Гибель клеток, как правило, наступала в результате развития стойких патологических процессов, связанных с отдельными деструктивными изменениями как на уровне клеточного ядра, так и некоторых клеточных органелл, преимущественно относящихся к белоксинтезирующему аппарату. Наблюдалась гипертрофия ядрышек с частичной их фрагментацией, огрубление структуры хроматина, образование нетипичных электронно-плотных диффузных элементов внутри ядер и нарушение их двухконтурности. В перинуклеарном пространстве обнаруживались многочисленные вакуоли, рыхло заполненные возбудителем и сообщающиеся с внеклеточной системой каналов эндоплазматического ретикулума. В местах подобных контактов нередко обнаруживались локальные расширения, в которых визуализировались гомогенные сгустки или «глыбки» электронно-плотного материала, а также фрагменты или остатки структур мембраноподобного типа. В отдельных случаях отмечалось формирование многослойных концентрических мембран, образующих достаточно плотные переплетения и занимающих значительные участки в цитоплазме. Существенных деструктивных изменений на уровне энергетического аппарата клетки не было отмечено, однако в отдельных случаях наблюдалась набухание матрикса митохондрий с частичной потерей крист.

**Заключение.** Таким образом, жидкая питательная среда «ПС-Mg» по своим свойствам не уступает контрольной среде. Среда может использоваться в практическом здравоохранении для изоляции штаммов *M. genitalium*, циркулирующих на территории Республики Беларусь, а также для накопления возбудителя с последующей индикацией и изучением его биологических свойств.

Уточнены этапы морфогенеза *M. genitalium* в культуре клеток и охарактеризованы поверхностные структуры возбудителя, отвечающие за адгезию.

Полученная модельная система на основе избранного подхода с первоначальным накоплением возбудителя в питательной среде и последующим внесением в культуру клеток перспективна как для изучения морфологических преобразований в самом возбудителе, так и анализе особенностей морфогенеза при взаимодействии со структурными органеллами чувствительных клеток-мишеней.

#### Литература

1. Инфекция, вызванная *Mycoplasma genitalium*: клиника, диагностика, лечение [Электронный ресурс] / А.М. Савичева [и др.] // Гинекология. – 2008. – Т. 10, № 1. – Режим доступа: <http://www.nasled.com/?id=449>. – Дата доступа: 03.09.2012.
2. *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa / H.F. Svenstrup [et al.] // J. Hum. Reprod. – 2003. – Vol. 18. – P. 2103-2109.
3. Микоплазмы. Молекулярная и клеточная биология. Взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика / С.Н. Борксениус [и др.]. – СПб.: Наука, 2002. – 319 с.
4. Interaction of *Mycoplasma genitalium* with host cells: evidence for nuclear localization / P.M. Ueno [et al.] // J. Microbiology. – 2008. – Vol. 154. – P. 3033-3041.
5. Diagnostic assessment of *Mycoplasma genitalium* in culture-positive women / J. Baseman [et al.] // J. Clin. Microbiol.

– 2004. – Vol. 42. – P. 203-211.

6. Dworkin, M. The Prokaryotes / M. Dworkin, S. Razin // The Genus Mycoplasma and Related Genera. – 2006. – Vol. 4. – P. 853-854.

7. Marshall, A.J. The phagocytosis of mycoplasmas / A.J. Marshall, R.J. Miles, L. Richards // J. Med. Microbiol. – 1995. – Vol. 43. – P. 239-250.

8. Razin, S. Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells / S. Razin // Biosci. Rep. – 1999. – Vol. 19, N 5. – P. 367-372.

9. Herrmann, R. Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma genitalium: a comparison of two closely related bacterial species / R. Herrmann, B. Reiner // Curr. Opin. Microbiol. – 1998. – Vol. 1, N 5. – P. 572-579.

Поступила 04.09.2012

## CULTURAL, MORPHOLOGICAL, MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF THE STRAIN *MYCOPLASMA GENITALIUM* ISOLATED FROM THE PATIENTS WITH REPRODUCTIVE DISORDERS

Rubanik L.V.<sup>1</sup>, Astashonok A.N.<sup>1</sup>, Shishporenok J.A.<sup>1</sup>,  
Rudenkova T.V.<sup>2</sup>, Kvacheva Z.B.<sup>1</sup>, Poleshchuk N.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Republican Research & Practical Centre for Epidemiology and Microbiology;

<sup>2</sup>Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Scraping material isolated from the urethra and cervix of 23 patients with reproductive disorders to detect *Mycoplasma genitalium* have been studied. Combined selective growth medium allowed to identify and accumulate two strains of the pathogen (MG-9, MG-20) in the titers of the 10<sup>4</sup> and 10<sup>3</sup> CFU/ml. Comparative analysis with the standard medium ("*Mycoplasma genitalium*", Russia) revealed no differences in the growth nature of the analyzed strains. Strain of the M genitalium MG-9, which had a high titer at the prior accumulation have been included in the Vero cell culture. Using electron microscopy analysis morphological characteristics of the agent have been done and ultrastructural features of specific changes which were detected in the cells have been described. Modified culture medium is promising for the selection, storage and study of the strains M. genitalium circulating in the territory of the Republic of Belarus.

**Keywords:** *Mycoplasma genitalium*, growth medium, electron microscopy

## ИЗУЧЕНИЕ ПЕРЕСТРОЕК В ГЕНАХ *MYCOPLASMA GENITALIUM* ПРИ МОНО- И МИКСТ-ИНФЕКЦИЯХ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА

Руденкова Т.В., Костюк С.А., Бадыгина Н.А., Полуян О.С., Глинкина Т.В.

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

**Резюме.** Патогенность возбудителя – это основное свойство любого инфекционного агента, которое генетически детерминировано и зависит от наличия в геноме микроорганизма конкретных генов. Молекулы адгезии, являются косвенными факторами патогенности, обеспечивают прикрепление возбудителя к эпителиальным клеткам. У *Mycoplasma genitalium* гены mg191 и mg192, входят в состав MgPa оперона, и кодируют белки цитоадгезии P140 и P110, которые необходимы для образования и функционирования органеллы прикрепления возбудителя. Использование метода секвенирующей ПЦР для анализа нуклеотидной последовательности генов mg191 и mg192 *Mycoplasma genitalium*, позволило выявить наличие нуклеотидных замен и точно определить их локализацию в данных генах.

**Ключевые слова:** *Mycoplasma genitalium*, нуклеотидная замена, секвенирующая ПЦР.

**Введение.** В соответствии с современной классификацией микоплазмы относятся к классу *Mollicutes*, порядку *Mycoplasmatales*, семейству *Mycoplasmataceas*, включающему в себя два рода *Mycoplasma* и *Ureaplasma* [1].

Поражение урогенитального тракта человека связано как правило с 3 видами *Mollicutes*: *Ureaplasma urealyticum* (*Ur. urealyticum*), *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*), *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) [2]. При этом *Ur. urealyticum* и *M. hominis* хорошо растут на специальных питательных средах и легко идентифицируются, а *M. genitalium* является трудно культивируемым видом, для обнаружения которого требуется применение методов основанных на идентификации генетического материала возбудителя (полимеразная цепная реакция (ПЦР)) [2, 3].

Урогенитальные микоплазмы передаются преимущественно половым путем. При анализе их распространенности важную роль играют возраст начала половой жизни, сексуальная активность, число половых партнеров и т.п. [4-6].

Патогенность возбудителя, являющуюся основным свойством любого инфекционного агента, можно определить, как потенциальную способность микроорганизма вызывать развитие инфекционного процесса [2, 4]. Патогенность – генетически детерминированный признак, который определяет образование факторов вирулентности, в зависимости от наличия в геноме микроорганизма конкретных генов.

Факторы вирулентности в свою очередь являются фенотипическим выражением патогенного генотипа, и могут проявляться прямыми токсическими факторами и косвенными (потенциальными) факторами патогенности.

К прямым токсическим факторам патогенности относят образование инвазинов, агрессивных, экзотоксинов, эндотоксинов, ферментов-токсинов, аллергенов и других веществ, которые оказывают неблагоприятное воздействие на клетки макроорганизма. К косвенным (потенциальным) - относят факторы патогенности, которые обеспечивают адгезию, колонизацию и персистенцию микроорганизма в пределах макроорганизма [2, 4-6].

Молекулы адгезии обеспечивают прикрепление мико-уреаплазм к эпителиальным клеткам и поэтому являются одними их основных факторов вирулентности данных возбудителей. Адгезины связываются с определенными структурами на поверхности клетки хозяина, при чем возможность связывания для данной молекулы адгезина и сила взаимодействия определяются в значительной степени структурой адгезинов. В связи с этим различные мутации в генах адгезинов могут привести к конформационным изменениям молекул адгезии микоплазм, что может являться причиной как ослабления взаимодействия микроорганизмов с клетками хозяина, так и определять формирование конформационно более подходящей структуры для взаимодействия с молекулярными комплексами на поверхности клетки хозяина [4-6].

*M. genitalium* прикрепляется к клеткам с использованием комплексной структуры, известной как органелла прикрепления (attachment organelle). Данная структура состоит из цитоадгезинов и белков цитоадгезии. Белки цитоадгезии P140 и P110 кодируются генами mg191 и mg192, входящими в состав MgPa оперона, и необходимы для образования и функционирования органеллы прикрепления. Молекулы P140 и P110 обеспечивают целостность органеллы и также образование кластеров цитоадгезинов и взаимодействие данной системы с поверхностью клетки. Мутации в генах mg191 и mg192 могут приводить к изменениям в продуктах данных генов и к изменениям адгезивных свойств *M. genitalium* к поверхности клетки [7-9].

**Цель исследования:** изучить нуклеотидные последовательности генов mg191 и mg192 *M. genitalium* при моно- и микст-инфекциях урогенитального тракта с применением секвенирующей ПЦР.

**Материалы и методы.** Для проведения исследования были отобраны 5 образцов содержащих ДНК *M. genitalium*. ДНК возбудителя выделяли сорбентным методом («ДНК-сорб-В» ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ). Для выявления особенностей генетического статуса *M. genitalium* при моно- и микст-инфицировании и установления возможной связи между характером инфицирования и структурными изменениями в системе факторов па-

тогенности данного микроорганизма было проведено исследование 2 клинических изолятов *M. genitalium* при моно-инфицировании, и 3 клинических изолятов *M. genitalium* при микст-инфицировании на наличие мутаций.

В качестве референсного образца использовали нуклеотидную последовательность штамма G-37 *M. genitalium* (ATCC 33530) (GenBank). В качестве исследуемых были выбраны гены, продукты которых являются ключевыми для цитоадгезии возбудителя, а именно mg191 и mg192.

Для амплификации специфических фрагментов генов использовались праймеры:

M.g.P140f- 5'- GGTACCTCTTTCACCATGTGCGCCC -3' (forward)

M.g.P140r- 5'- GAATTCGGTTAAAGAGAAAATAACCACC -3' (reverse),  
специфический фрагмент в 1 kb.

M.g.P110f- 5'- GGTACCAAGCGAAATTGGGGGAAGGG -3' (forward)

M.g.P110r- 5'- GTCGACATCCTCTTTGACAAGGAAGG -3' (reverse),  
специфический фрагмент в 1 kb.

С использованием специфических пар праймеров проводили амплификацию специфических участков ДНК *M. genitalium*. Для проведения амплификации был оптимизирован состав амплификационной смеси и программа амплификации. В каждую пробирку объемом 0,5 мл добавляли 30 мкл амплификационной смеси: 5 мкл деионизированной воды, 20 мкл Taq PCR Master Mix (QIAGEN) и 5 мкл смеси, содержащей 25 рмоль/мкл каждого праймера. Добавляли 25 мкл минерального масла. Под слой масла вносили 10 мкл анализируемого образца, а в пробирку отрицательного контроля 10 мкл деионизированной воды. Амплификацию проводили с использованием термоциклера «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия) по следующей программе: 95 °С — 10 мин; 45 циклов — 95 °С — 15 с, 55 °С — 8 с, 72 °С — 12 с.

Полученные ампликоны разгоняли электрофорезом в 1,5% агарозном геле, содержащем 1% бромистый этидий в течение 30 мин при напряжении 10 В/см для оценки результатов амплификации.

Далее амплифицированные фрагменты ДНК подвергали очистке с использованием набора PCR Gel Extraction kit (QIAGEN), а затем проводили секвенирующую ПЦР с использованием набора BigDye Terminator v3.1 (Applied biosystems). Полученные фрагменты ДНК подвергали очистке с использованием DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN) и последующему электрофорезу на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied biosystems).

Данные о нуклеотидной последовательности образцов анализировали с использованием нуклеотид-нуклеотид BLAST поисковой системы ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html)) для идентификации принадлежности той или иной последовательности к определенному гену.

**Результаты и их обсуждение.** Из пяти клинических образцов *M. genitalium* была успешно выделена и проамплифицирована ДНК с использованием специфических пар праймеров, что было подтверждено при анализе полученных ампликонов с использованием горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле.

Далее проводили секвенирующую ПЦР для определения последовательности нуклеотидов и сравнивали ее последовательностью референсного штамма G-37 *M. genitalium*.

Проведенный анализ полученных в ходе исследования результатов, позволил установить, что в образцах с моно-инфекциями в гене mg191 *M. genitalium* нуклеотидных замен не было обнаружено. В гене mg192 *M. genitalium* при моноинфекциях в 50% (n=1) случаев была выявлена единичная нуклеотидная замена. Во всех образцах с микст-инфекциями в генах mg191 и mg192 *M. genitalium* были выявлены нуклеотидные замены от единичной замены нуклеотида в гене mg191 в 33,33% (n=1) случаев, до замены трех нуклеотидов в генах mg191 и mg192 в 66,67% (n=2) случаев (таблица 1).

Таблица 1 — Результаты анализа молекулярно-генетического исследования образцов *M. genitalium* на наличие мутаций при моно- и микст-инфекциях

ген	Характер инфицирования	Общее кол-во образцов, n	Кол-во образцов, в которых определены замены, % (n)	Кол-во образцов с 1 заменой, % (n)	Кол-во образцов с 2 заменами, % (n)	Кол-во образцов с 3 заменами, % (n)
mg191	моноинфекция	2	—	—	—	—
	микст-инфекция	3	100% (3)	33,33% (1)	—	66,67% (2)
mg192	моноинфекция	2	50% (1)	50% (1)	—	—
	микст-инфекция	3	100% (3)	—	33,33% (1)	66,67% (2)

Использование непараметрических методов статистического анализа позволило установить достоверное увеличение частоты ( $p < 0,05$ ) нуклеотидных замен в генах *M. genitalium* при микст-инфекциях в сравнении с моно-инфекциями.

В ходе анализа полученных с использованием метода секвенирующей ПЦР нуклеотидных последовательностей и их сравнения с последовательностью референсного штамма G-37 *M. genitalium* было установлено, что в образце 2- моноинфекция единичная нуклеотидная замена находилась в гене mg192 в положении 187 (G→A). В образце 3-микст-инфекция были обнаружены три нуклеотидные замены в гене mg191 в положениях 145 (A→G), 217 (C→T), 325 (G→A), а также две нуклеотидные замены в гене mg192 в положениях 117 (T→C), 169 (T→C). В образце 4-микст-инфекция в гене mg191 была выявлена единичная нуклеотидная замена в положении 325 (G→A), и три нуклеотидные замены в гене mg192 в положениях 169 (T→C), 203 (C→T) и 216 (A→G). В образце 5-микст-инфекция были обнаружены три нуклеотидные замены в гене mg191 в положениях 145 (A→G), 217 (C→T), 243 (C→T), и три нуклеотидные замены в гене mg192 в положениях 74 (C→T), 169 (T→C), 187 (G→A) (табл. 2).

Таблица 2 — Анализ нуклеотидных замен в образцах *M. genitalium* в сравнении с референсным штаммом

Образец <i>M. genitalium</i>	Нуклеотидная замена									
	в mg191 гене				в mg192 гене					
	145	217	243	325	74	117	169	187	203	216
<i>M. genitalium</i> G-37	A	C	C	G	C	T	T	G	C	A
1-моно	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2-моно	—	—	—	—	—	—	—	A	—	—
3-микс	G	T	—	A	—	C	C	—	—	—
4-микст	—	—	—	A	—	—	C	—	T	G
5-микст	G	T	T	—	T	—	C	A	—	—

**Заключение.** Использование метода секвенирующей ПЦР для анализа нуклеотидной последовательности генов mg191 и mg192 *M. genitalium*, позволило выявить наличие нуклеотидных замен и точно определить их локализацию в данных генах, контролирующих формирование факторов патогенности возбудителя, а именно его способность к цитоадгезии. В ходе исследования биологического материала пациентов с моно- и микст-инфекциями, было установлено, что степень генетической вариабельности *M. genitalium* при микст-инфекциях достоверно выше, чем в случаях моноинфекций, что можно рассматривать как подтвержде-

ние изменений генома патологических агентов в случаях когда они находятся в составе ассоциации, что возможно приводит в конечном итоге и к фенотипическим изменениям возбудителя.

Дальнейшие исследования в области реорганизации генома *M. genitalium* могут существенно помочь в установлении влияния нуклеотидных замен на структуру и функции конечных продуктов этих генов, а также внести вклад в определение механизмов лежащих в основе изменений как генетических, так и фенотипических свойств возбудителя, способствующих формированию персистентных форм инфекционного процесса.

#### Литература

1. Определитель бактерий Берджи: в 2-х т. / под ред. Дж. Хулта [и др.]; пер. с англ. под ред. Г.А. Заварзина. – М.: Наука – 2001.
2. Микоплазмы. Молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика / С.Н. Борхсениус [и др.]. – СПб.: Наука, 2002. – 319 с.
3. Немченко, О.И. Урогенитальный микоплазмоз (обзор литературы) / О.И. Немченко, Е.В. Уварова // *Consilium Medicum*. – 2007. – № 1. – С. 45-51.
4. Костюк, С.А. Ассоциированные урогенитальные инфекции в акушерстве и гинекологии: современный взгляд на проблему / С.А. Костюк, О.К. Кулага. – Минск: Змицер Колас, 2008. – 544 с.
5. Липова, Е.В. Инфекции мочеполовых путей, ассоциированные с микоплазмами. Клиническая дерматовенерология: руководство для врачей / Е.В. Липова, Э.В. Баткаев; под ред. Ю.К. Скрипкина, Ю.С. Бутова. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2009. – 560 с.
6. A. Uuskula, A. Genital mycoplasmas, including *Mycoplasma genitalium*, as sexually transmitted agents / A. Uuskula, P.K. Kohl // *Int. J. STD AIDS*. – 2002. – Vol. 13, N 2. – P. 79-85.
7. Глик, Б. Молекулярная биотехнология: принципы и применение: пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак; под ред. Н.К. Янковского. – М.: Мир, 2002. – 590 с.
8. *Mycoplasma genitalium* P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development / R. Burgos [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2006. – Vol. 188, N 24. – P. 8627-8637.
9. Sequence-based typing of *Mycoplasma genitalium* reveals sexual transmission / S.V. Hjorth [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – P. 2078-2083.

Поступила 23.07.2012

## STUDY OF *MYCOPLASMA GENITALIUM* GENE REARRANGEMENTS IN UROGENITAL MONO- AND MIXED-INFECTIONS

Rudenkova T.V., Kostyuk S.A., Badygina N.A., Poluyan O.S., Glinkina T.V.

*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus*

Pathogenicity of the causative agent is basic property of any infectious agent which is genetically determined and depends on the genome microorganism-specific genes. Adhesion molecules are indirect pathogenicity factors and provide the pathogen attachment to epithelial cells. *Mycoplasma genitalium* genes mg191 and mg192 are a part MgPa operon and encode proteins cytoadhesion P140 and P110, which are necessary for the formation and functioning of the pathogen attachment organelle. The use of sequencing PCR for *Mycoplasma genitalium* mg191 and mg192 genes analysis, has allowed to reveal the presence of the nucleotide substitutions and pinpoint their location in these genes.

**Keywords:** *Mycoplasma genitalium*, nucleotide replacement, sequencing PCR.

# УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ И НАНОСКОПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИСТООБРАЗОВАНИЯ *BORRELIA BURGdorFERI SENSU STRICTO* В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЕ И КУЛЬТУРЕ АСТРОЦИТОВ

Князева О.Р.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

**Резюме.** Целью данной работы являлось изучение этапов и особенностей цистообразования *Borrelia burgdorferi sensu stricto* в бесклеточной среде и культуре астроцитов. В результате исследований получены модельные системы, позволяющие изучить цистообразование *Borrelia burgdorferi sensu stricto in vitro*. Проведен ультраструктурный и наноскопический анализ спиралевидных и цистных форм в бесклеточной среде и культуре астроцитов.

**Ключевые слова:** *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, Лайм-боррелиоз, цистообразование, электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия.

**Введение.** Лайм-боррелиоз (болезнь Лайма) — трансмиссивное, природно-очаговое заболевание, имеющее склонность к хроническому и рецидивирующему течению и преимущественному поражению кожи, нервной системы, опорно-двигательного аппарата и сердца. Среди инфекционных заболеваний, передающихся клещами, болезнь Лайма (БЛ) самое частое. Возбудителями БЛ являются несколько видов патогенных для человека боррелий — *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii* [1].

Боррелии в организме человека способны преобразовываться из классических спиралевидных форм в цисты [2-4]. Последние могут длительно сохраняться в различных органах и тканях и активироваться при нарушении иммунологического надзора, стрессовых ситуациях или активации других патогенов ингибирующей активность иммуноцитов. Переход из одного морфотипа в другой способствует выживанию возбудителя, быстрому размножению его в организме человека при наступлении благоприятных условий. Способность *B. burgdorferi* формировать цистные структуры в тканях также приводит к снижению их доступности для иммунной системы организма в связи с перегруппировкой и изменением поверхностных антигенов и как следствие недостаточной выработкой антител. Предпосылки переживания микроорганизмом неблагоприятных условий, механизмы и этапы морфологических преобразований до сих пор остаются недостаточно изученными. Серологические тесты, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и культивирование используют для постановки диагноза болезни Лайма, однако из-за географической вариации между штаммами, а также вариации в их поверхностных антигенных структурах чувствительность и специфичность серологических тестов может снижаться.

Патолого-анатомические исследования выявляют наличие цист в ЦНС у больных погибших от демиелинизирующих заболеваний. Кроме того, ряд исследователей рассматривают нейроборрелиоз как причину целого ряда заболеваний таких как болезнь Альцгеймера, сенильная деменция, менингит, черепная нейропатия, острая радикулонейропатия и т.п. [5]

В последнее время для изучения структуры микроорганизмов широко применяется атомно-силовая и электронная микроскопии дополняющие традиционные методы анализа биологических объектов. Известно, что цисты могут образовываться не только в организме, но и при моделировании *in vitro* [6]. В представленной работе описан оригинальный подход по использованию наноскопического и ультраструктурного анализов для изучения этапов цистообразования и характеристики поверхностной организации различных морфотипов боррелий.

Целью настоящей работы является изучение этапов цистообразования *Borrelia burgdorferi sensu stricto* в бесклеточной среде и культуре астроцитов.

**Материалы и методы.** В работе использовали штамм *Borrelia burgdorferi sensu stricto*,

выделенный из клеща *Ixodes ricinus* в 1996 г. в Гродненской области Республики Беларусь. Спирохеты культивировали при 34 °С в питательной среде BSK-H (модифицированная среда Barbour-Stoenner-Kelly), Sigma A8625, в состав которой входят смесь неорганических солей, аминокислот, витаминов, глюкозы, альбумина, цистеина, кроличей сыворотки, желатина и другие компоненты. Посевная доза составляла 1x10<sup>6</sup> кл/мл. Контроль роста осуществляли на 2, 3, 4, 5, 6 сутки методом темнопольной микроскопии, путем подсчета клеток в поле зрения на микроскопе Biolam (Россия). Типирование проводили с использованием микробиологических (темнопольная микроскопия), иммунологических (с использованием флуорисцирующих антител) и молекулярно-генетических методов (полимеразная цепная реакция).

Особенности морфогенеза изучали методом электронной и атомно-силовой электронной микроскопии.

Для проведения ультраструктурного анализа возбудитель предварительно осаждали путем дробного центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10-15 мин. Супернатант сливали, осадок фиксировали в течение 3 ч. в 2,5% глутаровом альдегиде, приготовленном на 0,2М какодилатном буфере (pH 7,3), постфиксировали 1% раствором четырехоксида осмия в течение 1 ч, обезжизивали в спиртах восходящей концентрации и заключали в аралдит по общепринятой методике [7]. Ультратонкие срезы толщиной 50-150 нм получали на ультратоме *Ultracut E* (Reichert, Австрия), монтировали на медные сеточки с формаваровой подложкой и окрашивали 1%-уранилацетатом и цитратом свинца по методу E.S. Reynolds. Полученные образцы исследовали на микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ.

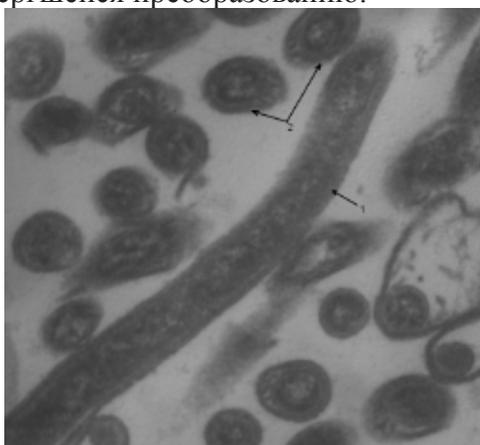
Для проведения атомно-силовой микроскопии использовали пластины свежесколотой слюды (СПМ-1, ТУ 5724-066) стандартной толщины 0,1-0,15 см. Процедуру получения функционализированной слюды осуществляли путем модификации ее поверхности аминогруппами при выдерживании в парах 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭС) (Sigma, США) в течении 20 мин с последующим тщательным промыванием дистиллированной водой и высушиванием в токе азота. На приготовленные подложки наносили аликвоты возбудителя в объеме 40 мкл, инкубировали в течение 12 ч, затем тщательно промывали дистиллированной водой, высушивали и фиксировали в 70% этиловом спирте. Образцы анализировали в контактном или в прерывисто-контактном режимах с помощью микроскопа Nanoscope IIIa (Veeco, США), оборудованного J-сканером. Использовали контактные 100- и 200-мкм кантилеверы «Nanoprobe» (США) из Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> с константами упругости 0,12 и 0,36 Н/м и наконечники «Micromash» (Россия) с константами жесткости 0,38 и 0,58 Н/м, соответственно. Обработку и количественный анализ изображений — построение сечений, вдоль которых анализировали профиль поверхности и определение ключевых параметров шероховатости осуществляли с помощью программного модуля FemtoScan Online.

Для моделирования инфекции *in vitro* использовали культуру клеток глиомы крысы С-6, состоящую из 85-90% астроглиальных клеток и около 10% олигодендроцитов.

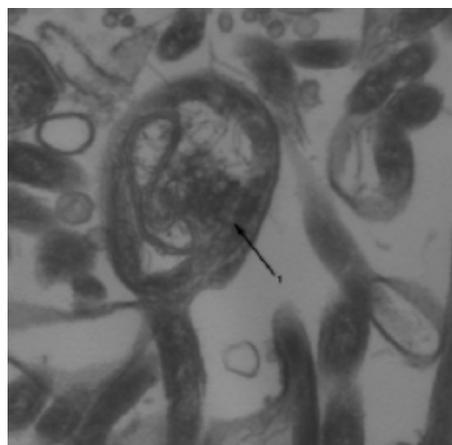
Во флаконы с суточной культурой клеток С-6 вносили 1x10<sup>5</sup> кл/мл *Borrelia burgdorferi*. Затем удаляли инокулят и вносили среду MEM в модификации Дульбеко 1152 с циклогексимидом (2,0 мкг/мл). Инкубировали 120 час при 33 °С. Для исследования морфологии боррелий и культур клеток на каждом пассажном уровне приготовленные препараты окрашивали гематоксилин-эозином и анализировали методом световой микроскопии при увеличении x400, x600, x100. Идентификацию наличия боррелий в пробах осуществляли методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием набора «НИФМ-Лайм-АГ и люминисцентного микроскопа при увеличении x400, x1000 (Japan, NikonE50i). Приготовление препаратов для электронной микроскопии проводили по вышеописанной методике, после предварительного снятия монослоя культуры клеток.

**Результаты и их обсуждение.** Прямая визуальная оценка морфологии в темном поле на ранних сроках культивирования спирохет (1-3 сут.) выявила преимущественно длинные, тонкие подвижные спиралевидные формы боррелий длиной от 20 до 25 мкм. Количество подвижных клеток на 3 сут. составляло 97%. Они совершали активные ротаторные (вокруг своей оси), поступательные, качательные, маятникообразные, контрактильные и движения. Также в поле зрения визуализировались неподвижные клетки, имеющие вытянутую или изогнутую форму. Они имели вид колец, петель, канатов и частичных перекрестов. К 5 сут. количество боррелий имеющих измененную форму и потерявших подвижность возрастало до 30%.

Анализ ультратонких срезов боррелий позволил проследить динамику структурных преобразований предшествующих формированию зрелых цистных форм. На начальном этапе цистообразования клеточная стенка подверглась гиперплазии с образованием баллоновидного расширения на одном из концов возбудителя (рисунки 1 и 2). При этом отмечались фрагментация, втягивание и скручивание протоплазматического цилиндра. Фрагментированные цилиндры формировали укладку под гиперплазированной клеточной стенкой, подвергшейся преобразованию.



1 — продольный срез;  
2 — поперечные срезы. Ув x 80 000  
Рисунок 1 — Спиралевидные формы  
*Borrelia burgdorferi sensu stricto*



1 — образование баллоновидного расширения  
на одном из концов. Ув x 50 000  
Рисунок 2 — *Borrelia burgdorferi sensu stricto*

Созревающие цисты округлялись и приобретали сфероидальную форму. Их окружала электронноплотная трехслойная клеточная стенка, толщиной от 12 до 18 нм (n=26), наружная поверхность которой сглажена, осьмиофобный слой мало различим и в отдельных цистах не просматривался.

Характерной особенностью созревающих цист являлось наличие от 2 до 8 фрагментов протоплазматического цилиндра, располагающегося в подмембранном пространстве цисты (рисунок 3). Каждый из цилиндров был ограничен от содержимого цисты двухслойной цитоплазматической мембраной, с электронно-плотным наружным слоем. Внутри протоплазматического цилиндра наблюдались осьмиофильные гранулярные рибосомоподобные скопления. Нуклеоид сконцентрирован в центре протопласта, просветлен. На продольном срезе базальные тельца не выявлялись. Структурированные осевые фибриллы не просматривались, однако выявлялись гранулярные или нитевидные структуры, располагавшиеся между протоплазматическими цилиндрами. Эти структуры напоминали разрушающиеся фибриллы и визуализировались лишь в некоторых цистах. В отдельных случаях цитоплазматическая мембрана теряла структурированность наружного слоя и имела размытый вид.

Зрелые цисты в отличие от выше описанных имели сферическую форму и уплотненную трехслойную клеточную стенку. Внутри они содержали лишь везикулоподобные, гра-

нуловидные и нитевидные электронно-плотные частицы. Фибриллярный аппарат, базальное тельце, цитоплазматическая мембрана и сформированный протопласт в них отсутствовали (рисунок 4).

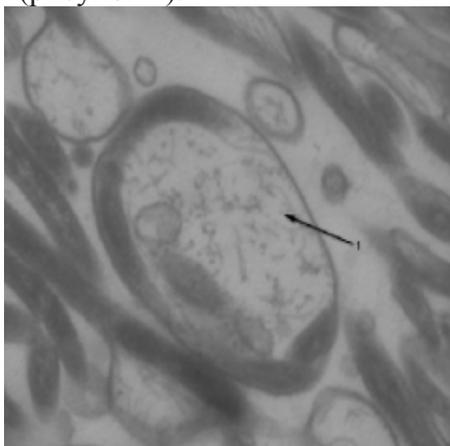


Рисунок 3 — Циста *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (отмечена стрелкой 1)

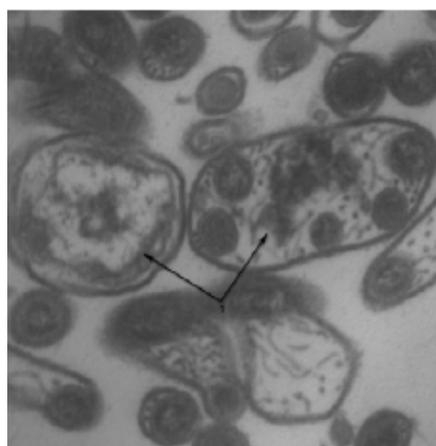


Рисунок 4 — Цисты *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (отмечены стрелками 1)

Наноскопические исследования позволили уточнить поверхностную организацию клеточной стенки. В отличие от электронно-ультраструктурного анализа, в цистах просматривалась хорошо сформированная плотная оболочка. Различия в плотности оболочки объясняются особенностями фиксации при подготовке проб для электронномикроскопических исследований.

При исследовании поверхностной организации возбудителя классической спиралевидной формы обнаруживали структуры как со сглаженной, так и с рельефной поверхностью. Боррелии со сглаженной поверхностью при усилении воздействия зонда с 5,2 Гц до 15,3 Гц сохраняли форму и не изменялись, в то время как структуры с рельефной поверхностью при постепенном увеличении силы воздействия сначала утрачивали рельефные выступы и при достижении силы 15,3 Гц разрушались полностью, что указывало на разницу в плотности клеточной стенки различных морфотипов, даже у спиралевидных форм (рисунок 5).

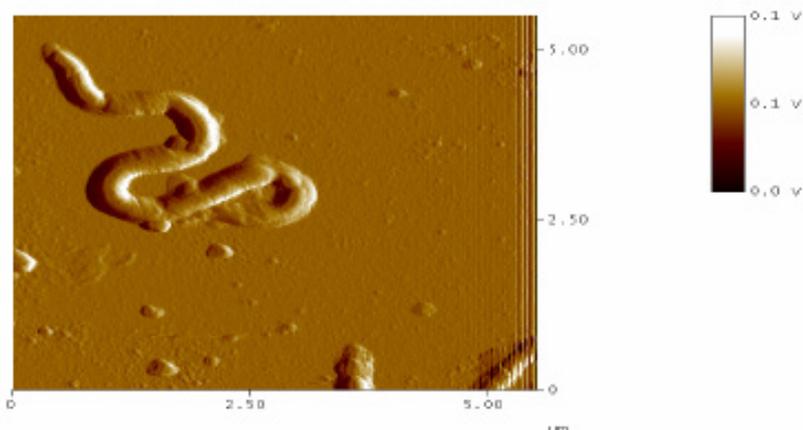


Рисунок 5 — АСМ-фотография классической спиралевидной формы *Borrelia burgdorferi sensu stricto*

Проведенный математический анализ микропрофиля поверхности возбудителя позволил выявить два типа цист. Первый тип — цисты с неоднородной поверхностью,

характеризующейся чередованием выступов и впадин (параметр асимметрии поверхности  $>1,5$ ). Второй тип — цисты с более сглаженной поверхностью (различались средние более ровные участки рельефа с единичными выступами на карте топографии поверхности; параметр асимметрии  $\sim 1,6$ ) (рисунок 6). Дополнительный анализ упругости и жесткости для двух типов инцистированных форм *Borrelia burgdorferi sensu stricto* показал, что для первого типа при воздействии с силой от 12,2 Гц до 15,3 Гц наблюдалась некоторая потеря их «микрорельефа». Но в отличие от спиралевидной формы полного разрушения цисты не происходило. Цисты второго типа при длительном воздействии иглой зондового микроскопа с силой 15,3 Гц не повреждались: число локальных максимумов на их микропрофиле не изменялось и кривые, описывающие сечения вдоль заданных координат, сохраняли колоколообразный вид с преимущественным сохранением средние более ровные участки рельефа. Полученные данные свидетельствуют о том, что эти цист-формы возбудителя имеют более ригидную и структурированную оболочку, что, вероятно, указывает, что цистообразование идет не по пути формирования L-подобных форм, а скорее всего, сопровождается структурно-модификационными изменениями в поверхностном слое *B. burgdorferi*.

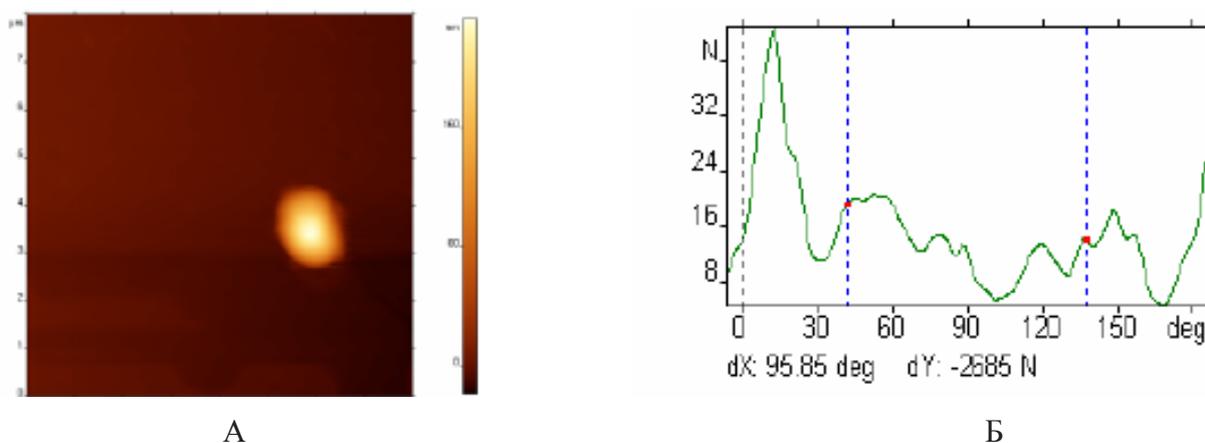


Рисунок 6 — АСМ-фотография инцистированной формы *Borrelia burgdorferi* со сглаженной поверхностью после силового воздействия зондом микроскопа, размер скана — 7:7 мкм (А) и карта микропрофиля поверхности цисты (Б)

Во второй серии экспериментов ставилась задача проследить возможность проникновения боррелий внутрь астроцитов и установить локализацию возбудителя в культуре. После детекции возбудителя, проведенной методом полимеразной цепной реакции и методом непрямой иммунофлуоресценции, *Borrelia burgdorferi* были внесены в культуру астроглиомы. Размножение типичных извитых форм было отмечено к 3 суткам, боррелии располагались в межклеточном пространстве либо прилипали к поверхности клеток. Взаимодействие возбудителя с клетками-мишенями сопровождалось развитием ряда специфических изменений в цитоплазме и ядрах некоторых астроцитов. К наиболее значимым образованиям следует отнести базофильные включения в ядрах и цитоплазме, не характерные в норме для данной клеточной линии.

При ультраструктурном анализе в межклеточном пространстве выявлялись спиралевидные типичные формы боррелий, а также округлые тельца морфологически сходные с образующимися в бесклеточной среде. Отмечалось явление, при котором боррелии пенетрировали мембрану и частично проникали в цитоплазму клеток, при этом возбудитель утрачивал классическую спиралевидную форму. Внутрицитоплазмы клеток визуализировались крупные атипичные вакуолизированные структуры ограниченные мембраной, внутри которых содержались переплетения филоментоподобных и мембраноподобных структур, а

также рибосомоподобных гранул. Кроме того, внутри включений наблюдались отдельные цилиндрические образования, напоминающие остатки фрагментированных вегетативных форм боррелий. Следует отметить, что во внутриклеточных «везикулоподобных» включениях нам не удалось обнаружить зрелые сформированные цисты, выявленные во внеклеточном пространстве (рисунок 7). Очевидно, внутри цитоплазмы клеток процесс переживания боррелией неблагоприятных условий имеет несколько иной механизм, чем это отмечено во внеклеточной среде. Последовательность эволюционно детерминированных структурных перестроек обуславливает уникальный тип сохранения и возможности длительного переживания возбудителя в непермиссивных условиях.

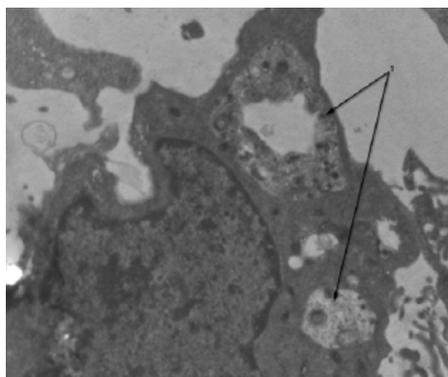


Рисунок 7 — Включения в цитоплазме клеток культуры глиомы крысы при сокультивировании с *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (отмечены стрелками 1)

Таким образом, проведенные комплексные исследования позволили охарактеризовать на субклеточном уровне модификационно-структурные преобразования, ведущие к формированию покоящихся форм *Borrelia burgdorferi*. Полученная модель на наш взгляд в дальнейшем позволит изучить тонкие механизмы взаимодействия *Borrelia burgdorferi* с клеткой, механизмы переживания неблагоприятных условий и хронизации инфекции, а также способы воздействия на разных стадиях его развития.

За помощь в проведении исследований выражаю благодарность заведующей лабораторией биотехнологии культур клеток РНПЦ эпидемиологии и микробиологии кандидату биологических наук Зинаиде Болеславовне Квачевой, моему научному руководителю доктору медицинских наук, профессору Николаю Николаевичу Полещуку, аспиранту РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Андрею Николаевичу Асташонку.

#### Литература

1. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis / G. Baranton [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1992. – Vol. 42, N 3. – P. 378-383.
2. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient / M. Collares-Pereira [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – P. 1316-1318.
3. *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid / E. Diza [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2004. Vol. 10. – P. 1692-1693.
4. MacDonald, A.B. Concurrent neocortical borreliosis and Alzheimer's disease / A.B. MacDonald // Ann. NY Acad. Sci. – 1988. – Vol. 539. – P. 468-470.
5. Wang, G. Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolate from a patient with Lyme borreliosis / G. Wang, A.P. van Dam, J. Dankert // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – P. 3025-3028.
6. Brorson, O. A rapid method for generating cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and their reversal to mobile spirochetes / O. Brorson, S.-H. Brorson // Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 1998. – Vol. 106. – P. 1131-1141.
7. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // J. Cell. Biol. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-212.

Поступила 10.09.2012

# ULTRASTRUCTURAL AND ATOMIC FORCE MICROSCOPY ANALYSIS OF CYST FORMATION OF STRAIN *BORRELIA BURGDORFERI SENSU STRICTO* IN CELL-FREE MEDIA AND ASTROCYTES CULTURE

**Kniazeva O.R.**

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

The aim of the investigation was to study the stages and features in cyst formation of strain *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in a cell-free media and astrocytes culture. The model system of the *Borrelia burgdorferi sensu stricto* cyst formation of a cell-free media and culture of astrocytes in vitro was obtained. The ultrastructural and atomic force microscopy analysis of cyst forms was carried out. Stages of reorganization of structures of an external cover were studied. This model will allow to study further superficial and antigenic transformations causing process of a change of immunogenic and pathogenic properties and mimicry of *Borrelia burgdorferi* and also to study mechanisms of chronic infection formation.

**Keywords:** *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, Lyme disease, cyst formation, electron microscopy, atomic force microscopy.

## АНТИТЕЛА К ФЛАВИВИРУСАМ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМИ ЛИХОРАДКАМИ

**Самойлова Т.И.<sup>1</sup>, Кулакова М.Н.<sup>1</sup>, Корзан А.И.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;*

<sup>2</sup>*Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Брест, Беларусь*

**Резюме.** В статье приведены результаты выявления антител в сыворотках крови пациентов республики с различными недифференцированными лихорадками к вирусам клещевого энцефалита (КЭ) и Западного Нила (ЗН) методом иммуноферментного анализа. Наиболее высокий процент антител класса М (11,1%) и G (22,2%) к вирусу КЭ выявлен в сыворотках крови пациентов Гродненской области, а к вирусу ЗН (19,4%) — в Гомельской области. Полученные результаты свидетельствуют о том, что среди пациентов с различными недифференцированными диагнозами в сезон активности кровососущих членистоногих могут встречаться заболевания арбовирусной этиологии.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, вирус Западного Нила, антитела, иммуноферментный анализ, лихорадки неясной этиологии, Беларусь.

**Введение.** Арбовирусные инфекции привлекают особое внимание медицинской науки и здравоохранения во всем мире в связи с их широким распространением, многообразием симптомов и тяжестью клинического течения [1-8]. Многие арбовирусы, в том числе вирусы клещевого энцефалита (КЭ) и Западного Нила (ЗН), относящиеся к семейству *Flaviviridae*, роду *Flavivirus*, способны вызывать тяжелые заболевания у людей, иногда с эпидемическим распространением. Эпидситуация по КЭ и ЗН в последние годы становится все более напряженной и носит выраженную сезонность — весенне-летнюю и осеннюю. Даже такие известные заболевания как КЭ и ЗН иногда проходят под другими диагнозами (ОРВИ, ОРЗ, лихорадки неясной этиологии, пневмонии, длительный субфебрилитет и др. [9-12].

**Цель исследования:** явилось выявление антител к вирусам КЭ и ЗН в сыворотках крови пациентов с различными недифференцированными диагнозами в эпидсезон.

**Материалы и методы.** Серологически были исследованы 237 образцов сыворотки крови на выявление антител к возбудителям флавивирусных инфекций (КЭ и ЗН), взятых от пациентов с различными недифференцированными диагнозами (лихорадки неясной этиологии, ОРВИ, серозные менингиты неясной этиологии, длительный субфебрилитет и др.) в эпидсезон.

Для выявления антител к антигенам вирусов КЭ и ЗН сыворотки крови исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с применением диагностических коммерческих тест-систем фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия), согласно инструкции производителя.

**Результаты и их обсуждение.** Проведенные исследования 237 сывороток крови пациентов с различными неустановленными диагнозами со всех областей Беларуси и г. Минска позволили выявить антитела к вирусам КЭ и ЗН (табл.).

Таблица — Выявление антител к вирусам КЭ и ЗН в сыворотках крови пациентов в 2011 г.

Области	Кол-во исслед. образцов	Предварительные диагнозы	Выявлены антитела к вирусам:					
			КЭ				ЗН	
			IgM	% пол.	IgG	% пол.	IgG	% пол.
Витебская	31	Лихорадка неясной этиологии, ОРВИ, ОРЗ	1	3,2	2	6,45	2	6,45
Минская	25	Острый бронхит, лихорадка неясной этиологии, ОРВИ	2	8,0	3	12,0	2	8,0
Могилевская	23	Клещевой энцефалит, лихорадка неясной этиологии	2	8,7	3	13,0	2	8,7
Гродненская	27	Лихорадка неясной этиологии	3	11,1	6	22,2	4	14,8
Брестская	52	Лихорадка неясной этиологии	3	5,8	8	15,4	8	15,4
Гомельская	36	ОРЗ, ОРВИ, лихорадка неясной этиологии, энтеровирусная инфекция	1	2,7	4	11,1	7	19,4
г. Минск	43	Лихорадка неясной этиологии, длительный субфебрилитет	3	7,0	7	16,3	4	9,3
<b>Всего</b>	<b>237</b>		<b>15</b>	<b>6,3</b>	<b>33</b>	<b>13,9</b>	<b>29</b>	<b>12,2</b>

Как видно из таблицы, при исследовании сывороток крови на КЭ выявляли антитела класса М (IgM) в 6,3% случаев, а класса G (IgG) — в 13,9% в целом по Республике Беларусь. Известно, что IgM выявляются у больных в первые недели заболевания и свидетельствуют о свежеперенесенном арбовирусном заболевании, в данном случае КЭ. Что касается вируса ЗН, то в этом случае использовали тест-систему для выявления антител только класса G и процент их выявления в сыворотках крови составлял 12,2 по республике.

На рисунке приведены результаты выявления антител в сыворотках крови больных к вирусам КЭ и ЗН в разрезе областей (рисунок).

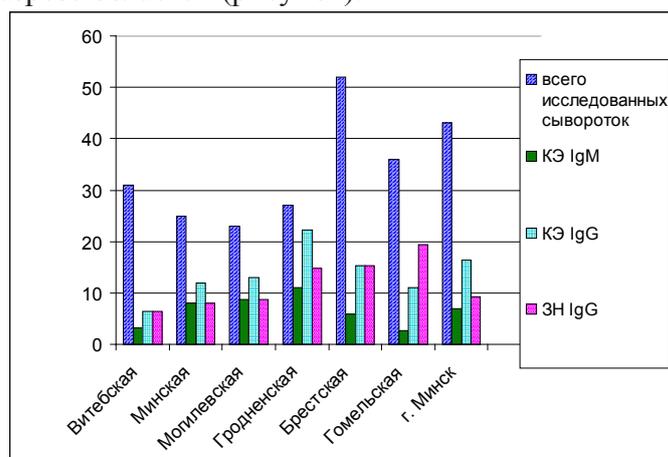


Рисунок — Данные по выявлению антител в сыворотках крови пациентов методом ИФА по областям Республики Беларусь

Как видно из рисунка, наиболее высокий процент IgM и IgG к вирусу КЭ выявлен в сыворотках крови пациентов Гродненской области — 11,1% и 22,2%, соответственно, а IgG

к вирусу ЗН — Гомельской (19,4%). Необходимо также обратить внимание на высокий процент выявления IgM и IgG к вирусу КЭ (7,0% и 16,3% соответственно) у пациентов, проживающих в г. Минске.

Таким образом, на основании проведенных исследований сывороток крови пациентов с различными неустановленными диагнозами выявлены антитела к вирусам КЭ и ЗН. В отдельных областях антитела в высоком проценте случаев к возбудителям наиболее актуальных в республике заболеваний КЭ — по Гродненской (22,2%), Брестской (15,4%) и г. Минску (16,3%) и 19,4% к Западно-Нильскому энцефалиту по Гомельской области. Полученные результаты свидетельствуют о том, что среди пациентов с различными недифференцированными диагнозами в сезон активности кровососущих членистоногих — переносчиков арбовирусных инфекций — могут встречаться заболевания арбовирусной этиологии такие как клещевой и Западно-Нильский энцефалиты.

#### Литература

1. Самойлова Т.И. Изучение циркуляции новых для Беларуси арбовирусов // Принципы и перспективы диагностики новых и вновь появляющихся инфекционных заболеваний: ст. и тез. докл. междунар. науч.-практ. конф., Смолевичи, 27-28 февр. 1997 г. — Минск, 1997. — С. 81-82.
2. Самойлова Т.И. Флюктуация природных очагов клещевого энцефалита в Республике Беларусь / Т.И. Самойлова, Н.П. Мишаева // Принципы и перспективы диагностики новых и вновь появляющихся инфекционных заболеваний: ст. и тез. докл. междунар. науч.-практ. конф., Смолевичи, 27-28 февр. 1997 г. — Минск, 1997. — С. 84.
3. Определение зараженности клещей вирусом Западного Нила в некоторых областях Республики Беларусь / О.Б. Титова, Т.И. Самойлова, Л.А. Большунова [и др.] // Зооантропонозные болезни, меры профилактики и борьбы: материалы междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 23-24 окт. 1997 г. — Минск, 1997. — С. 53-54.
4. Самойлова Т.И. Новые арбовирусы, выявленные на территории Республики Беларусь / Т.И. Самойлова, В.И. Вотяков, Л.П. Титов // Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, клиника, микробиология, вирусология и иммунология): ст. и тез. докл. 1-й итог. науч.-практ. конф. — Минск, 1998. — С. 84-92.
5. Выявление антигена вируса лихорадки Западного Нила в кровососущих комарах на территории Беларуси / Т.И. Самойлова [и др.] // Достижения медицинской науки Беларуси: Рец. науч.-практ. ежегодник. — Минск: БелЦНМИ, 1999. — Вып. 4. — С. 58.
6. Самойлова Т.И. Природные популяции вируса клещевого энцефалита в Беларуси / Т.И. Самойлова, В.И. Вотяков, Л.П. Титов // Инфекция и иммунитет: материалы Респ. науч.-практ. конф., посвящ. 75-летию БелНИИЭМ — Минск: БИТ «Хата», 1999. — С. 400-414.
7. Изоляция, антигенные свойства и биологическая характеристика штаммов вируса Западного Нила в Беларуси / Т.И. Самойлова [и др.] // Профилактика и лечение инфекционных и паразитарных заболеваний: материалы юбил. конф. БелНИИЭМ. — Минск: Наука і тэхніка. — 1995. — С. 116-121.
8. SamoiloVA, T.I. Virologic and serologic investigation of West Nile virus circulation in Belarus/ T.I. SamoiloVA, V.I. VotiaKov, L.P. Titov // Cent. Eur. J. Public Health. — 2003. — Vol. 11. — № 2. — P. 55-62.
9. ВенгероВ, Ю.А. Лихорадка Западного Нила / Ю.А. ВенгероВ, А.Е. ПлатоноВ // Леч. врач. — 2000. — № 10. — С. 56-60.
10. Hubalek, Z. West Nile fever — a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe / Z. Hubalek, J. Halouzka // Emerg. Infect. Dis. — 1999. — Vol. 5, № 5. — P. 643-650.
11. Savage, H.M. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996 with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes / H.M. Savage // Amer. J. Trop. Med. Hyg. — 1999. — Vol. 61. — P. 600-611.
12. Самойлова, Т.И. Современное состояние проблемы арбовирусных инфекций в Республике Беларусь / Т.И. Самойлова // Вест. Уральской гос. мед. академии. — 2010. — Вып. 21. — С. 133-141.

Поступила 24.09.2012

## ANTIBODIES TO FLAVIVIRUSES IN SERUM OF PATIENTS WITH DIFFERENT UNDIFFERENTIATED FEVER

**Samoilova T.I.<sup>1</sup>, Kulakova M.N.<sup>1</sup>, Korzan A.I.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk;

<sup>2</sup>Brest Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Brest, Belarus

The results obtained on the serum antibodies detection in patients with various undifferentiated fevers virus-borne encephalitis (TBE) and West Nile (WN) by enzyme immunoassay have been presented. The highest percentage of class M antibodies (11.1%) and G (22,2%) to TBE virus was

detected in sera of patients in Grodno region, and to the virus WN (19.4%) In the Gomel region. The results suggest that among patients with undifferentiated diagnoses for the period of season activity arthropods could occur arboviral etiology diseases.

**Keywords:** tick-borne encephalitis virus, West Nile virus, antibodies, ELISA, fever of unknown etiology, Belarus.

## ИММУНОДОМИНАНТНЫЕ БЕЛКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЛЕПТОСПИРОЗЕ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ МЕТОДОМ ИММУННОГО БЛОТТИНГА

Капитулец С.П., Ничипорук О.И., Капитулец Н.Н., Фидаров Ф.М.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

**Резюме.** В работе изучен гуморальный IgM и IgG ответ против *Leptospira interrogans* (7 серогрупп) у лабораторных животных при экспериментальном лептоспирозе и определена экспрессия иммунореактивных лептоспирозных антигенов на 7, 14 и 21 день инфекции. Методом иммунного блоттинга показано, что в острой фазе инфекции не зависимо от инфицирующей серогруппы IgM-ответ определяется, главным образом, лептоспирозными белками с молекулярной массой 14 кДа, 25 кДа, 32 кДа и 41/42 кДа. В фазе конвалесценции IgG-ответ характеризуется иммунодоминантными белками р32 и р41/42 и иммунореактивностью к высокомолекулярным белкам р58, р62 и р82. Полученные данные позволяют оптимизировать диагностику лептоспироза в острой фазе и фазе конвалесценции.

**Ключевые слова:** лептоспироз, гуморальный иммунный ответ, лептоспирозные белки, метод иммунного блоттинга.

**Введение.** Лептоспироз — острое инфекционное зооантропонозное заболевание, вызываемое микроорганизмами рода *Leptospira spp.*, протекает у людей с явлениями острой лихорадки, поражением жизненно важных органов и систем [1]. Инфекция по-прежнему занимает ведущее место в структуре природно-очаговых инфекций, представляет серьезную опасность для здоровья человека и сохраняет важное эпидемиологическое значение [2].

Для лабораторной диагностики лептоспироза практическое применение в республике имеют серологические методы: реакция микроагглютинации (РМА), реакция непрямой иммунофлюоресценции (ИРИФ) и иммуноферментный анализ (ИФА). Однако эти методы и разработанные на их основе коммерческие препараты все еще неэффективны при диагностике заболевания, главным образом, вследствие их низкой чувствительности при использовании на ранние сроки инфекции [3].

Индикация противолептоспирозных антител к внешним белкам наружной мембраны лептоспир, так называемым основным мембранным белкам (outer membrane proteins — OMPs), в последние годы стала главным центром исследования гуморального ответа при лептоспирозе [4-7]. Эти антигены, представленные, в основном, липогликопротеинами, сохраняют, как уже установлено, высокую консервативность у всех патогенных лептоспир и проявляют высокую иммунодоминантность для всех млекопитающих, что позволяет использовать их в качестве основных мишеней при диагностике инфекции [4, 5].

Полученные ранее данные свидетельствуют о высоком потенциале метода иммунного блоттинга для быстрой, простой и точной диагностики лептоспироза у больного, как на ранние сроки инфекции, так и у конвалесценто́в и лептоспироносителей [6, 7].

Исходя из вышеизложенного, основной целью работы было изучить гуморальный ответ против иммунореактивных антигенов *Leptospira interrogans* при экспериментальном лептоспирозе *in vivo* методом иммунного блоттинга.

**Материалы и методы.** В работе использовали 7 стандартных диагностических штаммов *L. interrogans*, обладающих широким диапазоном внутригрупповых антигенных связей

(таблица 1). Штаммы возбудителя были получены из НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН РФ (Москва) и поддерживаются в лабораторных условиях путем пересева на жидкую питательную среду Терских, рН 7,2-7,4 [8].

Таблица 1 — Штаммы лептоспир, использованные в работе

Серологическая группа	Серологический вариант	Штамм
Australis	bratislava	Еж № 1
Canicola	canicola	Каширский
Grippotyphosa	grippotyphosa	Москва-5
Hebdomadis	hebdomadis	Свояцек
Icterohaemorrhagiae	copenhageni	М-20
Pomona	pomona	Pomona
Tarassovi	tarassovi	Перепелицин

Белых беспородных мышей массой 25-30 г (по 15 животных на группу) инфицировали 0,5 мл 10-дневных культур каждой из 7 серогрупп лептоспир в концентрации  $2 \times 10^7$ - $2 \times 10^8$  мк.кл/мл, внутрибрюшинно. Контролем служили 5 интактных животных, получавшие аналогичную инъекцию средой Терских с 5% кроличьей сывороткой. Всего в работе использовано 110 мышей. Через 7, 14 и 21 день после инфицирования у 5 мышей каждой из 7 групп под наблюдением забирали кровь с соблюдением требований по гуманному обращению с лабораторными животными, под наркозом, тотально. Кровь интактных животных (контроль) отбирали на 21 день наблюдения. Имунные сыворотки получали общепринятым способом. Титры противолептоспирозных антител в сыворотках определяли в РМА на стекле с гомологичными антигенами по общепринятой методике [8]. Титром антител считалось наивысшее разведение сыворотки, при котором в «темном поле» микроскопа выявляли агглютинацию 25% лептоспир в виде «паучков» и «кос». Диагностически значимым титром при РМА считали 1:100.

Антигенные препараты *L.interrogans* получали из 10-дневных живых культур путем двукратного центрифугирования лептоспирозосодержащей жидкости монокультур при 2 000 об/мин, 15 мин и 10 000 об/мин, 15 мин при комнатной температуре, в роторе JS-24 центрифуги Avanti Centrifuge J-30I (Beckman Coulter, Германия). Полученные осадки отмывали 0,1 М ФСБ, рН 7,2-7,4, дважды, и лизировали трехкратной процедурой «замораживания-оттаивания» с последующей обработкой ультразвуком при 35 кГц и акустической мощности до 100 кВт/см<sup>2</sup> в течение 1 мин, трехкратно. В ряде экспериментов использовали комбинированный антигенный препарат, полученный объединением монокультур лептоспир серогрупп *Canicola*, *Grippotyphosa* и *Icterohaemorrhagiae* в соотношении 1:1:1. Лизаты центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. В надосадочной жидкости (водорастворимая фракция) определяли концентрацию общего белка спектрофотометрически при длине волны 280 нм и рассчитывали по формуле:  $C = (ОП \text{ пробы} - ОП \text{ воды}) \times 3 \times 750 \times \text{разведение образца}$ , где  $C$  — концентрация белка в мкг/мл, ОП пробы - оптическая плотность исследуемого образца, ОП воды - оптическая плотность растворителя (воды). Принимали, что при данной длине волны 1 о.е. соответствует концентрации белка равной 750 мкг/мл.

Из маточный пулов антигенов каждой серогруппы лептоспир отбирали аликвоты по 100 мкл и добавляли по 100 мкл буфера образца (x2), содержащего 0,5 М трис-НСl, 10% глицерин, 10% ДСН, 2,5% меркаптоэтанол, 0,001% бромфеноловый синий. Материал прогревали при 1000С в течение 5 мин и анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) по стандартной методике [9]. Электрофорез белков проводили в недиссо-

цирующих условиях в пластинах «NuPage» (Invitrogen, США), содержащих 12% ПААГ, с использованием прибора для мини-электрофореза «XCell SureLock Mini Cell» («Invitrogen» США). В лунки геля пробы наслаивали в объеме 10 мкл. ЭФ вели при 200В в течение 45 мин, при комнатной температуре до достижения краской нижней границы геля (примерно 1 см). В качестве стандартов молекулярных весов (М.м.) использовали коммерческую смесь маркеров (SigmaMarker Low Range M.W. 6.500-66.000, M3913, Sigma, США).

Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (PVDF, Millipore, Immobilon-P, 0,45 мкм) осуществляли по методу Towbin H. et al. [10] с использованием трис-глицинового буфера с этанолом (9:1) при 150В в течение 1 часа при температуре 40С в приборе для иммуноблота GE 62 (Amersham Biosciences, США). Контроль полноты переноса белков проводили окрашиванием мембраны краской Ponceau S (P7767, Sigma, США).

Блокирование неспецифически связывающих участков мембраны проводили блокирующим буфером (5% раствор сухого молока на ФСБ, pH 7,4) в течение 30 мин при комнатной температуре при постоянном помешивании на качающейся платформе. В качестве первичных антител использовали группоспецифические сыворотки мышей с экспериментальной лептоспирозной инфекцией и сыворотку интактных мышей в рабочем разведении 1:100. Инкубацию мембраны с сыворотками осуществляли в течение 18 часов при 40С. Детекцию иммунореактивных белков проводили с использованием антимишинных IgM- и IgG-антител, меченных пероксидазой хрена (Anti-mouse IgM ( $\mu$ -chain specific) - Peroxidase from goat, A8786, Sigma и Anti-mouse IgG (whole molecule) - Peroxidase from goat, A4416, Sigma), в рабочем разведении 1:1000. Реакцию визуализировали субстратной смесью (раствор диаминобензидина 0,5 мг/мл и перекиси водорода 0,5 мг/мл на ФСБ, pH 7,4) до появления полос желто-коричневого цвета. Реакцию останавливали промыванием мембраны водой. После высушивания мембраны на воздухе проводили учет результатов.

**Результаты и их обсуждение.** Внутрибрюшинное заражение белых беспородных мышей лептоспирами 7 серогрупп в концентрации  $2 \times 10^7$  -  $2 \times 10^8$  мк.кл/мл не приводило к гибели животных. Основными признаками лептоспирозной инфекции у лабораторных животных в острой фазе (7 день инфекции) были взъерошенная шерсть, угнетенное состояние, малоподвижность, отказ от корма, реже одышка и кашель, серозно-слизистые истечения из носа и гнойные выделения из глаз, общее истощение организма. Наиболее выраженные признаки болезни отмечали при заражении мышей серогруппами *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae* и *Pomona*. Наименее патогенными для мышей были возбудители серогрупп *Tarassovi* и *Australis*. Возбудители серогрупп *Canicola* и *Hebdomadis* вызывали умеренные поражения. К 21 дню инфекции (фаза выздоровления или конвалесценции) у мышей всех групп, зараженных разными серогруппами лептоспиром, отмечали спонтанное выздоровление: специфические признаки болезни исчезали, поведение животных не отличалось от контрольных интактных мышей. При этом у 31,4% инфицированных мышей развивалось лептоспиросительство.

Титры противолептоспирозных антител в сыворотках зараженных мышей в РМА с гомологичными серогруппами лептоспир на 7, 14 и 21 день после инфицирования показаны в табл. 2.

Таблица 2 — Гуморальный ответ при экспериментальном лептоспирозе у белых беспородных мышей, инфицированных разными серогруппами возбудителя, на различные сроки инфекции

Серогруппа	Титр антител в РМА			
	7 дн. п.и.	14 дн. п.и.	21 дн. п.и.	Контроль (интактные мыши)
Australis	<1:50	1:50	1:800	0

Canicola	1:50	1:400	1:1600	0
Grippotyphosa	1:50	1:400	1:6400	0
Hebdomadis	<1:50	1:100	1:800	0
Icterohaemorrhagiae	1:100	1:200	1:3200	0
Pomona	<1:50	1:100	1:3200	0
Tarassovi	<1:50	1:50	1:400	0

Примечание: дн. п.и. — дней после инфицирования.

Видно, что тяжесть инфекции у лабораторных животных при заражении соответствующими серогруппами возбудителя, согласуется с эффективностью развития гуморального ответа. Титры противолептоспирозных антител в сыворотках крови зараженных мышей в РМА с гомологичными антигенами составили: на 7 день инфекции — 50-100 (в среднем  $30 \pm 14,8$ ), на 14 день инфекции — 100-400 (в среднем  $185,7 \pm 58,5$ ) и 21 день инфекции — 800-6400 (в среднем  $2340,0 \pm 800,0$ ). В сыворотках контрольных животных противолептоспирозных антител не обнаружено. Учитывая, что диагностический титр при лептоспирозе равен 1:100 [8], чувствительность РМА на 7 сутки инфекции составила 7,7%, на 14 сутки инфекции — только 55,6% и приблизилась к 100% лишь на 21 сутки инфекции.

Динамика гуморального ответа при лептоспирозе у экспериментальных животных на разные сроки инфекции была проанализирована методом иммунного блоттинга, как описано в разделе «Материалы и методы».

В целом, при анализе электрофоретических профилей иммунодоминантных антигенов моно- и комбинированного препаратов в отношении реактивности с противолептоспирозными IgM- и IgG-антителами нами не выявлено существенных серогрупповых различий в гомологичных и гетерологичных сыворотках, полученных от животных на 7, 14 или 21 сутки инфекции (данные не показаны). Основные различия в иммуноблотах сывороток зараженных животных, полученных на разные сроки лептоспирозной инфекции, касались лишь количества выявляемых антигенов (белковых полос) и интенсивности их окрашивания (сигнала). Наличие перекрестных реакций у *L. interrogans* определило в дальнейшем применение комплексного лептоспирозного антигена, приготовленного из серогрупп *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa* и *Canicola*, в котором оптимальное содержание иммуногенных белковых компонентов обеспечило эффективное выявление в иммунных сыворотках специфических (гомологичных и гетерологичных) противолептоспирозных антител.

В таблицах 3 и 4 представлены результаты иммунных блотов с IgM- (IgM-ИБ) и IgG-антителами (IgG-ИБ) при использовании комбинированного антигенного препарата для анализа иммунных сывороток от мышей в острой фазе инфекции (7 дней п.и.), при развитии болезни (14 дней п.и.) и в фазе конвалесценции (21 п.и.).

Таблица 3 — Лептоспирозные белки, реагирующие в IgM-ИБ с иммунными сыворотками лабораторных животных, зараженных лептоспирами серогруппы *Icterohaemorrhagiae*

Белки	Сроки инфекции			Контрольная группа
	7 дн. п.и.	14 дн. п.и.	21 дн. п.и.	
p82	—	—	—	—
p76	—	—	—	—
p70	—	—	—	—
p62	—	—	—	—
p58	—	—	—	—
p48	—	—	—	—
p45	-/+	-/+	-/+	—
p44	-/+	-/+	-/+	—
<b>p41/42</b>	+	++	++	—
p37	-/+	-/+	-/+	—
p32	+	++	++	—
p31	-/+	-/+	-/+	—
<b>p25</b>	+	+	++	—
p20	-/+	-/+	-/+	—
<b>p14</b>	+	+	+	—

Примечание:

1. дн. п.и. — дней после инфицирования;

2. «-» — отсутствует;
3. «-/» — следовые количества;
4. «+» — интенсивность полосы до 25%;
5. «++» — интенсивность полосы 50%;
6. «+++» — интенсивность полосы выше 75%.

Таблица 4 — Лептоспирозные белки, реагирующие в IgG-ИБ с иммунными сыворотками лабораторных животных, зараженных лептоспирами серогруппы *Icterohaemorrhagiae*

Белки	Сроки инфекции			Контрольная группа
	7 дн. п.и.	14 дн. п.и.	21 дн. п.и.	
p82	–	–/+	++	–/+
p76	–	–/+	–/+	–/+
p70	–	–	–/+	–/+
p62	+	+	+++	–
p58	–	–/+	++	–
p48	–	–/+	–/+	–
p45	+	+	+	–/+
p44	–	–/+	–/+	–
<b>p41/42</b>	+	++	+++	–
p37	–	–/+	–/+	–
p32	+	++	+++	–
p31	–	–/+	–/+	–
<b>p25</b>	+	+	+	–
p20	–	–	–/+	–
<b>p14</b>	–	–	–	–

Примечание:

1. дн. п.и. – дней после инфицирования;
2. «-» – отсутствует;
3. «-/» – следовые количества;
4. «+» – интенсивность полосы до 25%;
5. «++» – интенсивность полосы 50%;
6. «+++» – интенсивность полосы выше 75%.

Видно, что в острой фазе лептоспироза в сыворотках мышей на 7 день инфекции IgM-ответ был более выражен для таких белков как p14, p25, p32 и p41/42 с тенденцией к увеличению сигнала в фазе конвалесценции. Наблюдаемый ответ в IgM-ИБ был выше для p32, затем p41/42 и p25, при отсутствии дальнейшего увеличения сигнала для p14.

Напротив, в сыворотках мышей на 14 день инфекции основной IgG-ответ выявлен, главным образом, против мажорных белков p32, p41/42, p45, p58, p62, p76 и p82. Аналогично в сыворотках фазы конвалесценции (21 день инфекции) частота обнаружения этих белков и интенсивность их окрашивания была значительно выше. Выраженное повышение иммунореактивности белков (усиление сигнала на электрофореграмме) рассматривается нами как феномен сероконверсии. Выраженная сероконверсия при IgG-ИБ отмечена для p32 и коррелирует с повышением сигналов к p41/42, p62 и p82 соответственно.

Иммунореактивность лептоспирозных белков p32 и p41/42 является наивысшей как при IgM-ИБ, так и IgG-ИБ. В контрольных сыворотках (здоровые интактные мыши) белковые полосы к этим антигенам отсутствуют. При этом к антигенам p82, p76 и p70 IgG-антитела обнаружены в отдельных сыворотках животных контрольной группы.

Кроме преобладающих иммунодоминантных белков на блотах также выявлены минорные антигенные полосы, которые включали белки p20, p31, p37, p44 и p45 для IgM-ИБ и p20, p25, p31, p37, p44, p45, p48, p70 и p76 для IgG-ИБ.

Таким образом, в работе установлено, что патогенные виды *Leptospira interrogans* обладают значительным количеством иммунореактивных антигенов, преимущественно белковой природы с М.м. от 14 до 82 кДа, которые последовательно экспрессировались при патогенезе инфекции и становились мишенями для гуморального иммунного ответа (табл 5).

Таблица 5 — Иммунодоминантные белки, выявляемые в иммунном блоттинге у лабораторных животных при экспериментальном лептоспирозе

Размер, кДа	Обозначение	Тип	Описание или функция	Локализация
82	p82	?	?	ВМ
76	DnaK	?	шаперон	Ц
62	GroEL	?	шаперон	Ц
58	p58	?	?	ВМ
41/42*	p42			
LipL41	?			
ЛП	?			
?	ВМ			
НМ				
32	LipL32	ЛП	главный наружный мембранный белок	НМ
25	p25	?	?	П
14	p14	?	?	Ц

Примечание:

- \* — комплекс из двух антигенов (белок с М.м. 42 кДа и LipL41), которые экспрессируются всеми патогенными лептоспирами, но не разделяются в одномерном иммунном блоттинге;
- ЛП — липопротеин;
- НМ — наружная мембрана;
- ВМ — внутренняя мембрана;
- Ц — цитоплазма;
- П — периплазма;
- ? — нет данных.

Проведенные исследования указывают, что основными иммунодоминантными белками, выявляемыми при лептоспирозе, являются два с М.м. 32 кДа и 41 кДа, известные как наружные мембранные липополипротеины LipL32 и LipL41 соответственно [4, 5]. Сыворотки экспериментально зараженных животных реагируют с LipL32 и LipL41 чаще, чем с любым другим антигеном, как на ранние, так и на поздние сроки инфекции (таблицы 3 и 4). Наши результаты согласуются с более ранними исследованиями, в которых LipL32 и LipL41 также были идентифицированы как основные иммунореактивные антигены при лептоспирозе [4-7]. Учитывая, что и LipL32, и LipL41 характеризуются у *Leptospira interrogans* высокой консервативностью (98,9% и 97,3% гомологии соответственно) и повышенным уровнем экспрессии при инфекциях, вызванных патогенными лептоспирами [4, 5], диагностика заболевания, основанная на выявлении этих антигенов в иммунном блоттинге, очевидно, будет наиболее эффективной независимо от сроков и инфицирующей серогруппы возбудителя.

**Заключение.** Гуморальный иммунный ответ у лабораторных животных при экспериментальном лептоспирозе в острой фазе характеризуется выработкой преимущественно ранних IgM-антител, главным образом, к лептоспирозным белкам с низкой М.м. от 14 до 45kDa. Выработка IgG-антител против лептоспирозных антигенов отмечается позднее при становлении инфекции в стадии конвалесценции, в основном, против более высокомолекулярных белков с М.м. в диапазоне 31-82 kDa.

Выявление в сыворотках мышей с экспериментальным лептоспирозом комбинации полос р32 с р41/42 и низкомолекулярными антигенами (например, р14, р25), преобладающими в IgM-ИБ, повышает более чем на порядок чувствительность диагностики острого лептоспироза по сравнению с РМА («золотой стандарт»). Комбинация полос мажорных белков р32 и р41/42 с высокомолекулярными белками р58, р62 и р82 при постановке IgG-ИБ определяет верификацию инфекции *in vivo*. Полученные данные позволяют оптимизировать диагностику лептоспироза в ранние сроки инфекции и верифицировать диагноз заболевания у конвалесцентов и лептоспирозоносителей.

#### Литература

1. Levett, P.N. Leptospirosis / P.N. Levett // Clin. Microbiol. Rev. – 2001. – Vol. 14. – P. 296-326.
2. World Health Organization. Leptospirosis worldwide // Wkly. Epidemiol. Rec. – 1999. – Vol. 74. – P. 237-242.
3. Серологическая диагностика лептоспироза: операционные характеристики тестов / С.П. Капитулец [и др.] // Здравоохранение. – 2011 – № 12. – С. 4-8.
4. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection / D.A. Haake [et al.] // Infect. Immun. – 1999. – Vol. 67, N 12. – P. 6572-6582.
5. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection / D.A. Haake [et al.] // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68. – P. 2276-2285.
6. Leptospiral Proteins Recognized during the Humoral Immune Response to Leptospirosis in Humans / H. Guerreiro [et al.] // Infect. Immun. – 2001. – Vol. 69. – P. 4958-4968.
7. Early Diagnosis of leptospirosis by immunoglobulin M immunoblot testing / G. Doungchawee [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. – 2008. – Vol. 15, N 3. – P. 492-498.
8. Инструкция о клинике, диагностике, лечении и профилактике лептоспироза: утв. приказом М-ра здравоохран. Респ. Беларусь 21.03.2006 № 200. – Минск, 2006. – 48 с.
9. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature (London). – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
10. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76. P. 4350-4354.

Поступила 20.08.2012

### IMMUNODOMINANT PROTEINS AT EXPERIMENTAL LEPTOSPIROSIS IN LABORATORY ANIMALS REVEALED BY WESTERN BLOT

**Kapitulets S.P., Nichiporuk O.I., Kapitulets N.N., Fidarov F.M.**

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

The humoral IgM and IgG immune responses to *Leptospira interrogans* (7 serogroups) in laboratory animals have been studied. The expression of immunoreactive leptospiral antigens on 7, 14 and 21 days of infection has been determined. Western blot showed that in the acute phase of infection the IgM-response was determined mainly by leptospiral proteins with a molecular mass of 14 kDa, 25 kDa, 32 kDa and 41/42 kDa. In the convalescent phase IgG-response characterized by immunodominant protein p32 and p41/42 and immunoreactivity to macromolecular proteins p58, p62 and p82. These data allow to optimize the diagnosis of leptospirosis in the acute and convalescent phases.

**Keywords:** leptospirosis, humoral immune response, leptospiral proteins, immunoblotting.

## «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, без установки автоматического переноса, все поля по 25 мм.

3. Объем статьи, включая рисунки, таблицы, библиографический список литературы 5-7 страниц формата А4, научных обзоров – до 12 страниц.

4. Статья должна быть изложена на русском или английском языке для иностранных авторов.

5. Заглавие статьи печатается с выравниванием по центру без точек в конце и включает:

1) НАЗВАНИЕ СТАТЬИ – ПЕЧАТАЕТСЯ ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ БЕЗ СОКРАЩЕНИЙ ЖИРНЫМ ШРИФТОМ;

2) фамилии и инициалы авторов – указываются ниже строчными буквами жирным шрифтом;

3) название учреждения, город, страна – указываются на следующей строке курсивом нежирным шрифтом.

6. После заглавия (на языке текста публикуемого материала) через пустую строку приводится резюме. Текст резюме должен содержать краткую информацию (до 10 строк) о результатах публикуемой работы, отражать, что нового несет в себе работа в сравнении с другими известными по тематике публикациями. После резюме печатаются ключевые слова (не более 5).

7. Текст статьи печатается с обязательным выделением следующих разделов: введение, содержащее краткий обзор литературы по данной проблеме, с указанием нерешенных ранее вопросов, сформулированную и обоснованную Цель исследования; основная часть: материалы и методы исследования, результаты исследования и обсуждение, заключение или выводы; библиографический список (литература). В разделе «материал и методы исследований» обязательно сообщать о соблюдении правил работ с использованием экспериментальных животных (для экспериментальных исследований), а также указать использованные методы статистической обработки данных.

8. Сокращение слов не допускается, кроме общепринятых сокращений химических и математических величин, мер, терминов. В статьях должна быть использована система единиц СИ.

9. Таблицы, графики и диаграммы должны быть тщательно выверены автором и соответствовать цифрам в тексте и располагаться после их первого упоминания. Все таблицы, графики и диаграммы должны иметь названия. Оформление таблиц, графиков и диаграмм должно соответствовать требованиям ВАК Республики Беларусь. Каждая таблица должна иметь краткий заголовок, который состоит из слова «Таблица», ее порядкового номера и названия, отделенного от номера знаком тире. Заголовок следует помещать над таблицей слева, без абзацного отступа. Использование страниц альбомного формата не допускается.

10. Иллюстрации (фотографии, графики, рисунки, схемы) должны быть высокого качества и выполнены в цветах, хорошо различимых при черно-белой печати. Количество графического материала должно быть минимальным и пронумеровано последовательно арабскими цифрами. В подписях к микрофотографиям указываются увеличение (окуляр, объектив) и метод окраски материала. Графики, выполненные в табличном редакторе Excel, должны быть внедрены в документ с возможностью их дальнейшего редактирования, не следует удалять из файла Excel страницы с исходными данными для графика. Графики должны быть выполнены на белом фоне. Пояснительные данные помещают под фотографией, графиком, рисунком, схемой, а со следующей строки – слово "Рисунок", номер и наименование иллюстрации, отделяя знаком тире номер от наименования. Точку в конце нумерации и наименований иллюстраций не ставят. Не допускается перенос слов в наименовании рисунка. Использование страниц альбомного формата не допускается.

11. В конце каждой оригинальной статьи должен быть приложен библиографический список литературы (не более 10), 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  
Телефоны: (+375-17) 263 64 68; 237 69 79  
Факс: (+375-17) 267 30 93  
Электронная почта: rrcem@belriem.by или belriem@gmail.com  
<http://www.belriem.by/>

## СОДЕРЖАНИЕ

<i>Горбунов В.А., Гаевский И.В., Федоров Ю.Е., Филонюк В.А., Карабан И.А.</i> <i>Шмелева Н.П., Петкевич А.С., Азарова И.А.</i>	
ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ И ИТОГИ НАУЧНО-ПРИКЛАДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ.....	3
<i>Горбунов В.А., Филонюк В.А., Шмелева Н.П., Павлова Н.И., Лапушкина Т.Н.,</i> <i>Игнатъев Г.М., Петкевич А.С., Кукарко Т.М., Мелюх У.</i>	
ГОСУДАРСТВЕННАЯ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ ПРОГРАММА «ИНФЕКЦИИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ».	
ИТОГИ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ ЗА 2011-2012 гг.....	18
<b>ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ</b> .....	28
<i>Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В.</i>	
«НЕУПРАВЛЯЕМАЯ» НОРОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ И ПУТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЕЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА.....	28
<i>Гудков В.Г., Виринская А.С., Чистенко Г.Н., Фисенко Е.Г., Карабан И.А., Ключарева А.А.,</i> <i>Плотникова К.Ю., Новацкая Ю.В., Малякко Д.В., Запольская В.В., Сенчук В.В.</i>	
ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ В РАЗРАБОТКЕ И ВНЕДРЕНИИ СИСТЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА, СРЕДСТВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ, ЭКСТРЕННОЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ И ЭТИОТРОПНОГО ЛЕЧЕНИЯ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В БЕЛАРУСИ .....	33
<i>Гудков В.Г., Плотникова К.Ю., Новацкая Ю.В., Виринская А.С., Клюйко Н.Л., Зайцева Л.В.</i>	
РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПОПУЛЯЦИИ РОТАВИРУСОВ.....	36
<i>Коломиец Н.Д., Тонко О.В., Ханенко О.Н., Шмелева Н.Д., Левшина Н.Н.,</i> <i>Фисенко Е.Г., Гудкова Е.И., Скороход Г.А.</i>	
СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ МОНИТОРИНГУ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ.....	40
<i>Мамчиц Л.П.</i>	
СОЦИАЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ.....	43
<i>Семейко Г.В., Самойлович Е.О., Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А.</i>	
ГЕНОТИПИРОВАНИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСОВ КОРИ, ВЫЯВЛЕННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2004-2011 гг. ....	49
<i>Довжук И.А., Ильяшева Е.В., Глебо Л.В., Рудая Л.Н.</i>	
ОБ ОСОБЕННОСТЯХ РАЗВИТИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ.....	54
<i>Русанович А.В., Коломиец Н.Д., Наройчик Л.К.</i>	
РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ И ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ (ИППП) У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ.....	57
<i>Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л.</i>	
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫХ ГЕПАТИТОВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА.....	60
<i>Самойлова Т.И., Залевская О.С., Карпук Л.И., Кулакова М.Н., Зинкевич Н.А.,</i> <i>Яшкова С.Е., Веденьков А.Л.</i>	
ИЗУЧЕНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСИ ЗА 2009-2011 гг. ....	63
<i>Самойлова Т.И., Азарова И.А., Цвирко Л.С., Кулакова М.Н., Залевская О.С.,</i> <i>Яшкова С.Е., Веденьков А.Л.</i>	
ИНФИЦИРОВАННОСТЬ КРОВОСОСУЩИХ КОМАРОВ И МОШЕК ВИРУСОМ ЗАПАДНОГО НИЛА В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ БЕЛАРУСИ .....	66
<i>Подгаева В.А., Голубев Д.Н., Шулев П.Л.</i>	
ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ И РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ НА УРАЛЕ НА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПО ТУБЕРКУЛЕЗУ .....	70
<i>Голубкова А.А., Дорогина Ю.В., Шашина Н.И., Корначев А.С.</i>	
ТИСК-ВЕКТОРНЫЕ ИНФЕКЦИИ (КЛЕЩЕВОЙ ВИРУСНЫЙ ЭНЦЕФАЛИТ И ИКСОДОВЫЕ КЛЕЩЕВЫЕ БОРРЕЛИОЗЫ) В УСЛОВИЯХ МЕГАПОЛИСА. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА .....	77

<i>Цвирко Л.С., Мишаева Н.П., Самойлова Т.И., Азарова И.А.</i> ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫЕ ИНФЕКЦИИ БЕЛОРУССКОГО ПОЛЕСЬЯ.....	83
<i>Корзан А.И.</i> РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ БИОГЕЛЬМИНТОЗАМИ РЫБ (ОПИСТОРХОЗОМ И ДИФИЛЛОБОТРИОЗАМИ) СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ .....	88
<b>СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ, ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА .....</b>	<b>93</b>
<i>Аканина Д.С., Гребенникова Т.В., Плетенева Т.В.</i> РАЗРАБОТКА СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ГРИППА А ПОДТИПА H5N1 МЕТОДОМ ПЦР И ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ.....	93
<i>Кареткина Г.Н.</i> ГРИПП И ОРВИ: СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ.....	96
<i>Сивец Н.В., Бабенко А.С., Шмелева Н.П., Грибкова Н.В.</i> АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКЦИИ ВИРУСНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ.....	99
<i>Сергиенко Е.Н., Германенко И.Г.</i> КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ГРИППА А (H1N1-2009) У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ.....	102
<i>Ермолович М.А.</i> ЛАБОРАТОРНАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ ЭКЗАНТЕМНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ .....	109
<i>Самойлович Е.О., Ясинская Л.И., Шанько Г.Г., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю., Астапов А.А., Булдык Е.А., Лисицкая Т.И., Збаровский Д.К.</i> ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ ВЯЛЫХ ПАРАЛИЧЕЙ С ВЫДЕЛЕНИЕМ ВАКЦИННОГО ПОЛИОВИРУСА .....	114
<i>Самойлович Е.О., Германенко И.Г., Шиманович В.П., Семейко Г.В., Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А., Лисицкая Т.И., Ластовка А.А.</i> КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА И ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ.....	119
<i>Манькин А.А., Ежов В.В., Данилейко Ю.К., Салюк В.А., Дымковец В.П., Гущина Е.А., Лисицын Ф.В.</i> УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭПИТЕЛИЯ ШЕЙКИ МАТКИ ПАЦИЕНТОК, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСАМИ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 И 18 ТИПОВ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ МЕТОДОМ КОНТАКТНОЙ ТЕРМОЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ.....	124
<i>Спиридович В.И., Кастусик С.В., Кудин А.П.</i> ЛЕЧЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА У ДЕТЕЙ: ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ И ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ .....	127
<i>Борисов И.М., Шаповалова Т.Г.</i> ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО АЛГОРИТМА ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИОННО-ТОКСИЧЕСКОГО ШОКА ПРИ ПНЕВМОНИИ.....	132
<i>Суханов Д.С., Артюшкова Е.Б., Дудка В.Т.</i> ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕМАКСОЛА ИС-АДЕНОЗИЛ-L-МЕТИОНИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ ОСНОВНОГО РЯДА В СОЧЕТАНИИ С АЛКОГОЛЕМ. ....	136
<i>Суханов Д.С., Виноградова Т.И., Павлова М.В.</i> ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ РЕМАКСОЛА И АДЕМЕТИОНИНА ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ ОСНОВНОГО РЯДА .....	141
<i>Вишневский А.А., Бурлаков С.В., Олейник В.В.</i> ПРИЧИНЫ РАННИХ И ПОЗДНИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО СПОНДИЛИТА.....	146
<i>Еремин В.Ф., Гасич Е.Л., Сосинович С.В., Ильенкова В.С., Ерамова И., Карпов И.А.</i> ПЕРВИЧНАЯ И ПРИОБРЕТЕННАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ/СПИД В БЕЛАРУСИ .....	152

<i>Решетнева Е.В., Соловьева Н.С., Макаровский А.Н., Олейник В.В., Вишневецкий А.А.</i> ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО СПОНДИЛИТА У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ.....	158
<i>Матиевская Н.В.</i> ГЕПАТОТОКСИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ .....	162
<i>Гасич Е.Л., Еремин В.Ф., Сосинович С.В., Яговдик-Тележная Е.Н., Руммо О.О., Щерба А.Е.</i> ДЕТЕКЦИЯ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В К ЛАМИВУДИНУ И АДЕФОВИРУ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В .....	166
<i>Фомина Е.Г., Счеслёнок Е.П., Школина Т.В., Фомин Д.И., Владыко А.С.</i> ПОЛУЧЕНИЕ И АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА, ВКЛЮЧАЮЩЕГО АНТИГЕНЗНАЧИМЫЕ ФРАГМЕНТЫ НЕСТРУКТУРНОГО NS3–БЕЛКА ВИРУСА ГЕПАТИТА С.....	170
<i>Гулинская О.В., Цыркунов В.М.</i> ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С.....	175
<i>Окулич В.К., Прудников А.Р. Корнилов А.В., Сосинович Д.Г., Савкина Ю.Г., Гончарова А.И.</i> ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЭЛАСТАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПАНКРЕАТИТОМ.....	179
<i>Амвросьева Т.В., Богош З.Ф., Поклонская Н.В., Вайханская Т.Г.</i> ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ ПРИ ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ КАК ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ФАКТОРЫ ЭТИОПАТОГЕНЕЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ .....	183
<i>Асташонок А.Н.</i> ИММОБИЛИЗАЦИЯ <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> НА НАНОКОМПОЗИТНЫЕ СЕНСОРНЫЕ ПОКРЫТИЯ ИЗ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ПРОТИВОХЛАМИДИЙНЫХ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG: НАНОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	188
<i>Дейкун Д.А., Рубаник Л.В., Асташонок А.Н., Князева О.Р., Ермолович М.А., Полецук Н.Н., Талако Т.М., Варонько И.А., Сорока Н.Ф.</i> ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ И ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИТЕЛ В ВЫПОТАХ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РЕВМАТОИДНЫХ АРТРИТАХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ХЛАМИДИЙНОЙ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ .....	193
<i>Костюк С.А., Бадыгина Н.А., Гаврусев А.А., Кулага О.К., Полуян О.С., Руденкова Т.В.</i> ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ПОЛОВЫХ ПАРТНЕРОВ .....	197
<i>Зубрицкий М.Г., Недзьведь М.К.</i> ЧАСТОТА ЭКСПРЕССИИ ВИРУСНЫХ АНТИГЕНОВ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОДВЗДОШНОЙ КИШКИ (НА МАТЕРИАЛЕ БИОПСИЙ).....	202
<i>Капитулец С.П., Ничипорук О.И., Капитулец Н.Н., Кравченко Л.М.</i> «ГОРЯЧИЕ ТОЧКИ» АГРЕГАЦИИ В АМИЛОИДНЫХ БЕЛКАХ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ БОЛЕЗНЯХ .....	206
<i>Кудин А.П., Маржало Е.Ю.</i> КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ЭТИОТРОПНОЕ ЛЕЧЕНИЕ МЕНИНГИТА, ВЫЗВАННОГО В-ГЕМОЛИТИЧЕСКИМ СТРЕПТОКОККОМ ГРУППЫ «В», У ДЕТЕЙ.....	215
<i>Ханенко О.Н.</i> ПРОФИЛАКТИКА ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ОЖГОВОЙ ТРАВМОЙ В УСЛОВИЯХ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ОТДЕЛЕНИЙ БОЛЬНИЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ .....	221
<i>Титов Л. П., Горбунов В. А., Ермакова Т. С., Пыж А.Э</i> ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К КАРБАПЕНЕМАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ.....	225
<i>Ханенко О.Н., Тонко О.В., Левшина Н.Н., Римжа М.И.</i> ВИДОВОЙ СОСТАВ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ МИКРОФЛОРЫ ОЖГОВЫХ РАН У ДЕТЕЙ.....	230

<i>Шилин В.Е., Окулич В.К., Чередняк А.Н., Мацкевич Е.Л.</i> КОМПЛЕКСНАЯ АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ И ДРУГИХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ .....	235
<i>Счеслёнок Е.П., Семижон П.А., Школина Т.В., Фомина Е.Г., Винокурова Н.В., Карпенко Г.А., Владыко А.С.</i> ПОЛУЧЕНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ НУКЛЕОКАПСИДНЫЙ БЕЛОК ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА В ПЕРМИССИВНОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК <i>E. COLI</i> .....	240
<i>Тапальский Д.В., Бойцова Н.Ю., Ярмоленко М.А., Рогачев А.А., Ситник А.А.</i> БИОСОВМЕСТИМЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПОКРЫТИЯ С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА .....	246
<i>Отрашевская Е.В., Лыско К.А.</i> РОЛЬ ПРЕПАРАТОВ-БАКТЕРИОФАГОВ В ЭЛИМИНАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ .....	253
<b>ИММУННЫЕ АСПЕКТЫ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ИХ ИММУНОПРОФИЛАКТИКА .....</b>	<b>256</b>
<i>Титов Л.П.</i> МИКРО-РНК: НОВЫЙ КЛАСС РЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ ИММУННОГО ОТВЕТА И ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА .....	256
<i>Самойлович Е.О., Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А., Семейко Г.В.</i> ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ К КРАСНУХЕ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2011 г. ....	261
<i>Шиманович В.П., Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А.</i> ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА И ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКИМ ПАРОТИТОМ .....	265
<i>Отрашевская Е.В., Букин Е.К., Рубин С., Игнатъев Г.М.</i> ХАРАКТЕРИСТИКА АТТЕНУИРОВАННОГО ЖИВОГО ВАКЦИННОГО ШТАММА ВИРУСА ПАРОТИТА «ЛЕНИНГРАД-3»: НЕЙРОВИРУЛЕНТНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ .....	269
<i>Шмелева Н.Д.</i> ОРГАНИЗАЦИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫМИ РЕАКЦИЯМИ И ПРОФИЛАКТИКА ПОСТИНЪЕКЦИОННЫХ АБСЦЕССОВ .....	271
<i>Гончаров А.Е., Кошелев С.В., Романова И.В., Квакухо В.А., Титов Л.П., Путырский Л.А.</i> АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ И Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, В ПРОЦЕССЕ АУТОИММУНОТЕРАПИИ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ .....	276
<i>Полуян О.С., Костюк С.А.</i> ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ РАЗВИТИЯ И ТЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И НЕВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СУСТАВОВ .....	281
<i>Окулич В.К., Сенькович С.А., Савкина Ю.Г., Прищепенко В.А., Яцыно М.В., Гончарова А.И.</i> СПЕКТР ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G У ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В РЕАКЦИЯХ С ХРОМОГЕННЫМИ СУБСТРАТАМИ .....	289
<i>Плотников Ф.В., Окулич В.К., Сенькович С.А., Кабанова А.А.</i> ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ К РАЗРУШЕНИЮ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДНОГО МАТРИКСА БИОПЛЕНОК .....	294
<i>Рубаник Л.В., Асташонок А.Н., Шишпоренок Ю.А., Руденкова Т.В., Квачева З.Б., Полещук Н.Н.</i> КУЛЬТУРАЛЬНАЯ, МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА <i>Mycoplasma genitalium</i> , ВЫДЕЛЕННОГО ОТ ЛИЦ С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ .....	298

<i>Руденкова Т.В., Костюк С.А., Бадыгина Н.А., Полуян О.С., Глинкина Т.В.</i> ИЗУЧЕНИЕ ПЕРЕСТРОЕК В ГЕНАХ <i>Mycoplasma genitalium</i> ПРИ МОНО- И МИКСТ-ИНФЕКЦИЯХ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА .....	303
<i>Князева О.Р.</i> УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ И НАНОСКОПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИСТООБРАЗОВАНИЯ <i>VORRELLIA BURGDORFERI SENSU STRICTO</i> В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЕ И КУЛЬТУРЕ АСТРОЦИТОВ .....	308
<i>Самойлова Т.И., Кулакова М.Н., Корзан А.И.</i> АНТИТЕЛА К ФЛАВИВИРУСАМ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМИ ЛИХОРАДКАМИ .....	314
<i>Капитулец С.П., Ничипорук О.И., Капитулец Н.Н., Фидаров Ф.М.</i> ИММУНОДОМИНАНТНЫЕ БЕЛКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЛЕПТОСПИРОЗЕ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ МЕТОДОМ ИММУННОГО БЛОТТИНГА .....	317
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ .....	324
СОДЕРЖАНИЕ .....	326

НАУЧНОЕ ИЗДАНИЕ

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ  
ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА**

**Сборник научных трудов  
выпуск 5**

Главный редактор: член-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. Л.П. Титов

Ответственный редактор: д-р мед. наук, проф. А.С. Владыко  
Редакторы: И.А. Азарова, Т.А. Аблова

Ответственный за выпуск: О.С. Капранова  
Корректор: Т.Н. Беленова  
Компьютерная верстка: И.Ф. Малько

Уч.-изд. л. 31,10.  
Тираж 200 экз.

Государственное учреждение  
«Республиканская научная медицинская библиотека»  
ЛИ № 02330/0548510 от 16.06.2009.  
ул. Фабрициуса, 28, 220007, г. Минск  
Тел./факс +375 (17) 216-23-33  
E-mail: [med@med.by](mailto:med@med.by)  
<http://www.med.by>

