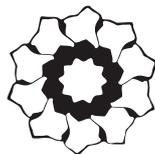


**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ  
ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**



ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной»

**СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ  
В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ  
ЗА АКТУАЛЬНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ**

**МАТЕРИАЛЫ ВСЕРОССИЙСКОЙ  
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ,  
посвященной 95-летию со дня рождения  
академика РАМН И.Н. БЛОХИНОЙ**

(25 мая 2016г., г. Нижний Новгород)

г. Нижний Новгород  
**2016**

УДК 616.9:614.4.002  
ББК 55

**Б63 «СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА АКТУАЛЬНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ»**// Материалы Всероссийской научно-практической конференции (25 мая 2016 г., г. Нижний Новгород). Под ред. д.м.н., проф. Е.И. Ефимова – Н. Новгород: Типография «Растр-НН», 2016. 308 с.

**Редакционная коллегия:**

д.м.н., профессор Е.И. Ефимов  
д.б.н., профессор Г.И. Григорьева,  
к.м.н. Н.Н. Глухов  
к.б.н, в.н.с. Е.Н. Филатова  
ведущий инженер В.В. Королева

Представлены материалы традиционной Всероссийской научно-практической конференции «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями», организуемой ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора. Участие в формировании материалов сборника приняли ведущие ученые и специалисты научных и практических учреждений Роспотребнадзора, Центров по профилактике и борьбе со СПИД и других организаций из разных регионов страны. В материалах сборника отражены результаты научных исследований по вопросам эпидемиологии актуальных инфекций, в том числе с применением ГИС - технологий, молекулярной эпидемиологии; достижения в области диагностики, молекулярно-генетических и молекулярно-биологических исследований патогенов бактериальной и вирусной природы; в изучении иммунных механизмов защиты, создании и совершенствовании профилактических и диагностических препаратов, средств обеспечения биологической безопасности; общей и популяционной экологии микроорганизмов различных биосистем, различные аспекты биотехнологии иммунобиологических препаратов. Материалы конференции будут полезны как научным, так и практическим работникам службы Роспотребнадзора и других ведомств, участвующих в создании противоэпидемической защиты населения, а также эпидемиологам, микробиологам, вирусологам, иммунологам, биотехнологам, работающим в разных областях науки и практического здравоохранения.

Материалы публикаций представлены в авторской редакции.

**ISBN**

© ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, 2016



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ  
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ  
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
(РОСПОТРЕБНАДЗОР)

П Р И К А З

07.04.2016

№ 252

Москва

О проведении Всероссийской  
научно-практической конференции  
"Современные технологии в  
эпидемиологическом надзоре  
за актуальными инфекциями"

В целях совершенствования научного обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и в связи с 95-летием со дня рождения академика И.Н. Блохиной п р и к а з ы в а ю:

1. Провести 25 мая 2016 года в г. Нижнем Новгороде на базе ФБУН ННИИЭМ им. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора Всероссийскую научно-практическую конференцию "Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями", посвященную 95-летию со дня рождения академика И.Н. Блохиной (далее - конференция).

2. Утвердить перечень основных вопросов, планируемых для рассмотрения на конференции (Приложение № 1).

3. Утвердить состав организационного комитета конференции (Приложение № 2).

4. Директору ФБУН ННИИЭМ им. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора Е.И. Ефимову:

4.1. Обеспечить выполнение необходимых мероприятий по подготовке и проведению конференции, размещению участников.

4.2. Представить отчет по итогам проведения конференции в срок до 10 июня 2016 года.

5. Руководителям территориальных органов Роспотребнадзора, главным врачам федеральных бюджетных учреждений здравоохранения – центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, директорам научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора командировать специалистов для участия в работе конференции в соответствии с распределением мест (Приложение № 3).

6. Оплату командировочных расходов произвести по месту работы командируемых.

7. Контроль за исполнением настоящего приказа возложить на заместителя руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека И.В. Брагину.

Руководитель



  
А.Ю.Попова



## *Уважаемые коллеги!*

В апреле 2016 года исполняется 95 лет со дня рождения Ирины Николаевны Блохиной – известного российского микробиолога и иммунолога, действительного члена Российской академии медицинских наук, видного организатора здравоохранения, педагога, государственного и общественного деятеля, бессменного директора Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии в течение 44 лет - с 1955 по 1999 годы.

Под руководством И.Н. Блохиной Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии стал крупным многопрофильным научно-исследовательским и производственным центром, широко известным в нашей стране и за ее пределами.

Обладая талантом пытливого, целеустремленного исследователя с широким научным кругозором, Ирина Николаевна уделяла особое внимание решению задач практического здравоохранения, созданию и производству новых профилактических и лечебных иммунобиологических препаратов, активно используя в работе Института достижения фундаментальных научных дисциплин и внедряя современные молекулярно-биологические, биотехнологические, микробиологические и иммунологические методы исследования.

Ирина Николаевна Блохина - незаурядный ученый и замечательный человек, бескорыстно веровавший в преобразующую силу науки, создатель известной научной школы, требовательный, но неизменно доброжелательный и отзывчивый руководитель, заслуженно пользовалась любовью и уважением коллег, друзей, многочисленных учеников и земляков-нижегородцев.

Заслуги И.Н. Блохиной перед наукой и здравоохранением были отмечены высокими государственными наградами, а в 1984 году за создание и внедрение в производство антистафилококковых иммунных препаратов ей была присуждена Государственная премия СССР. Не случайно 24 августа 1999 года Нижегородскому НИИ эпидемиологии и микробиологии было присвоено имя академика И.Н. Блохиной.

На конференции «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями», посвященной 95-летию Ирины Николаевны, будут обсуждены такие актуальные вопросы, как совершенствование эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями, внедрение информационных технологий и прогнозно-моделирующих систем в изучение актуальных инфекций, разработка современных методов и алгоритмов идентификации патогенных микроорганизмов с использованием молекулярно-биологических методов, применение новых подходов к созданию эффективных и безопасных вакцин и оценке качества иммунопрофилактики, создание инновационных технологий производства препаратов для лабораторной диагностики, лечения и профилактики инфекций, разработка методов и средств противоэпидемической защиты населения.

Уверена, что конференция, собравшая специалистов из разных регионов России, пройдет в созидательной и творческой атмосфере, а обмен опытом и полученные новые знания, несомненно, будут полезны всем ее участникам для использования в их научно-исследовательской и практической деятельности.

Желаю всем плодотворной работы и дальнейших творческих достижений в деле охраны здоровья людей.

Руководитель Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека,  
Главный государственный санитарный  
врач Российской Федерации,  
доктор медицинских наук, профессор



А.Ю.Попова



**Ирина Николаевна Блохина**  
**1921-1999**

## Оглавление

Королева В.В., Григорьева Г.И. К 95-летию академика РАМН И.Н. Блохиной ..... 10

### Раздел 1. Совершенствование эпидемиологического надзора за актуальными инфекциями и оценка эпидемиологического риска

Архангельская И.В., Монахова Е.В., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Демидова Г.В. Характеристика штаммов <i>Vibrio cholerae</i> non O1/non O139, вызвавших заболевания людей в Республике Калмыкия.....	21
Байдакова Е.В. Структура острых кишечных инфекций на территориях с различным типом водисточников.....	25
Белявцева Л.И., Цапко Н.В., Давыдова Н.А. Аспекты сезонного участия блох сусликов в эпизоотическом процессе в природных очагах чумы на территории Северо-Кавказского Федерального округа.....	30
Белявцева Л.И., Цапко Н.В., Давыдова Н.А. К оценке роли блох горного суслика в поддержании эпизоотического процесса на территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы.....	32
Белявцева Л.И., Цапко Н.В., Давыдова Н.А. Основные мероприятия эпизоотологического мониторинга популяций блох горного суслика на территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы .....	34
Бутакова Л.В., Троценко О.Е., Сапега Е.Ю. Применение статистических методов прогнозирования в анализе заболеваемости энтеровирусной инфекцией на территории Дальневосточного Федерального округа Российской Федерации .....	36
Голицына Л.Н., Зверев В.В., Сашина Т.А., Кашников А.Ю., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Распространение эпидемического варианта вируса ECHO30 E30H/2013RU-1 в Российской Федерации в 2014-2015 гг.....	41
Епифанова Н.В., Галиничева Е.К., Зверев В.В., Кашников А.Ю., Новикова Н.А. Видовое и типовое разнообразие аденовирусов, выявляемых у детей с острой кишечной инфекцией.....	43
Ершов В.И. Природно-очаговые инфекции с трансмиссивным механизмом передачи в Приволжском федеральном округе (ПФО) в 2015 году.....	48
Кузоватова Е.Е., Альтова Е.Е. Репродуктивное поведение ВИЧ-позитивных женщин и организация профилактики перинатальной передачи ВИЧ в ПФО в 2010-2015 гг .....	49
Низоленко Л.Ф., Бачинский А.Г. Универсальная модель эпидемий. Оценка эффективности вакцинации против гриппа.....	55
Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н. Информативность эпидемиологически значимых параметров относительно риска заболевания туляреимией в Приволжском Федеральном округе .....	61
Лapidус А.Ю. Новые инфекции: «зал ожидания» или начало эпидемического пути .....	65
Леонтьева С.А., Брагина Е.А., Катин А.А. К вопросу о сочетанности микст-носительства ДНК/РНК возбудителей клещевых инфекций в клещах <i>Ixodes persulcatus</i> р.с.к. в природных очагах западной части Западной Сибири.....	66
Матвеев А.В., Цыганова М.И., Мохонова Е.В., Талаева М.В., Никитина З.И., Коптелова В.Н. Вакцинация против сезонного гриппа и аутоиммунный гомеостаз у вакцинированных лиц.....	69
Моргачева Я.В., Горшков А. С., Саухат С. Р., Рындич А. А., Солтанова О. М., Суладзе А. Г. Новая программа для ЭВМ в области эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией.....	73
Патяшина М.А., Авдонина Л.Г., Трофимова М.В., Балабанова Л.А., Замалиева М.А. Оценка эпидемиологических рисков внешних и внутренних биологических угроз при проведении массового мероприятия с международным участием.....	77
Пекло Г.Н., Степанова Т.Ф., Смирнова С.С. Состояние проблемы трихинеллеза в Приволжском Федеральном округе.....	78

<b>Полянина А.В., Быстрова Т.Н., Карувваккат О.С., Княгина О.Н.</b> Этиологическая структура острых вирусных гепатитов в Нижегородской области в современный период.....	87
<b>Сашина Т.А., Морозова О.В., Новикова Н.А.</b> Генетическая структура нижегородской популяции ротавируса в 2012-2015 гг.....	92
<b>Солнцев Л.А.</b> Систематизация и организация хранения данных по заболеваемости в субъектах ПФО в рамках работ по проекту «Электронный эпидемиологический атлас ПФО».....	98
<b>Тотменин А.В., Зырянова Д.П., Астахова Е.М., Ивлев В.В., Гашникова М.П., Поздняков П.И., Москалева Н.В., Айкин С.С., Булатова Т.Н., Гашникова Н.М.</b> Особенности эпидемии ВИЧ-инфекции в Кемеровской области: доминирование CRF63_02A1 и высокий уровень распространенности уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1.....	101
<b>Устюжанин А.В., Алимов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г.</b> Новые подходы в оценке эпидемической значимости штаммов неполиомиелитных энтеровирусов по данным молекулярно-генетического мониторинга их циркуляции на территории мегаполиса.....	106
<b>Хуторянина И.В., Хроменкова Е.П.</b> Некоторые аспекты санитарно-паразитологического мониторинга на юге России.....	111
<b>Шамсутдинов А.Ф., Тюрин Ю.А., Бойко В.А., Трифонов В.А.</b> Новые трансмиссивные инфекции: заражённость <i>Ehrlichia chaffeensis</i> и <i>Anaplasma phagocytophilum</i> клещей <i>Ixodes ricinus</i> и <i>Dermacentor reticulatus</i> в пригородных лесах г. Казани.....	115

## **Раздел 2. Современные средства диагностики, лечения и профилактики инфекционных заболеваний: от разработки до производства**

<b>Абрамова Е.Г., Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Савицкая Л.В., Генералов С.В., Селезнева А.Г., Жулидов И.М., Комиссаров А.В.</b> Разработка стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности антирабического иммуноглобулина.....	116
<b>Александина Н.В., Моисеева О.В.</b> Влияние лактоглобулина на чувствительность к бактериофагам условно-патогенных микроорганизмов и сальмонелл, выделенных от детей с ОКИ и дисбиозами.....	118
<b>Белова И.В., Точилина А.Г., Соловьева И.В., Иванова Т.П., Жирнов В.А.</b> Возможности использования масс-спектрометрии для решения текущих практических задач лабораторной службы ЛПУ и Роспотребнадзора.....	120
<b>Борискина Е.В., Беляева Е.В., Ермолина Г.Б., Никифоров В.А.</b> Факторы биологической агрессии бактерий, изолированных от пациентов ИСМП.....	126
<b>Вакарина А.А., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф.</b> Количественная оценка литической активности бактериофагов.....	130
<b>Ванькова О.Е., Бруснигина Н.Ф., Григорьева Г.И.</b> Различные подходы к генотипированию цитомегалловирусов.....	136
<b>Василенко Е.И., Курилова А.А., Ковтун Ю.С., Катунина Л.С.</b> К вопросу о питательных средах для непрерывного культивирования микроорганизмов.....	140
<b>Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Галичева А.Л.</b> Характеристика бактериофагов, пригодных для идентификации холерных вибрионов.....	145
<b>Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Савицкая Л.В., Лобовикова О.А., Никифоров А.К., Гаврилова Ю.К.</b> Разработка программы для ЭВМ для расчета результатов реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах.....	147
<b>Евдокимова В.В., Алексеева Л. П.</b> Моноклональные пероксидазные конъюгаты и метод прямого dot-иммуноферментного анализа в диагностике холеры.....	149
<b>Зимин А.А., Ашина Н.В., Назипова Н.Н.</b> Вариабельность антигенов бактериофагов Т4-типа - компонентов терапевтических препаратов.....	153
<b>Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Мишанькин Б.Н., Филиппенко А.В., Беспалова И.А., Галичева А.Л.</b> Экспериментальные подходы к разработке противохолерных вакцин.....	159

<b>Катунина Л.С., Курилова А.А., Ковтун Ю.С., Василенко Е.И., Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е.</b> Технологические аспекты приготовления живой чумной вакцины.....	164
<b>Колесникова Е.А., Бруснигина Н.Ф., Ефимов Е.И.</b> Результаты многолетнего мониторинга антибиотикорезистентности генитальных микоплазм, выделенных у женщин и мужчин с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта.....	166
<b>Князев Д.И., Сахарнов Н.А., Цветкова В.Д., Солнцев Л.А., Бруснигина Н.Ф., Уткин О.В.</b> Разработка ДНК-микрочипа для мультиплексного анализа экспрессии мРНК основных участников апоптоз-ассоциированного сигналинга.....	173
<b>Крестова И.Е., Игнатова Н.И.</b> Влияние фильтратов бульонных культур <i>Staphylococcus aureus</i> на формирование биопленки бактериями <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	179
<b>Курилова А.А., Ковтун Ю.С., Катунина Л.С., Василенко Е.И.</b> О современных тенденциях в производстве чумных вакцин.....	181
<b>Лисовская С.А., Халдеева Е.В., Глушко Н.И.</b> Исследование количества формирования биопленок, клиническими штаммами грибов <i>Candida albicans</i> , в целях прогнозирования тяжести хронических форм кандидозов.....	186
<b>Матузкова А.Н., Суладзе А.Г., Саухат С.Р.</b> Опыт проведения антиретровирусной терапии больных ВИЧ-инфекцией в г. Ростов-на-Дону.....	190
<b>Махова М.А., Бруснигина Н.Ф., Черневская О.М., Орлова К.А., Ванькова О.Е., Скобло Л.Е., Барышева Н.Н., Кленина Н.Н.</b> Молекулярно-генетические методы в диагностике герпесвирусных инфекций у детей.....	194
<b>Овчинникова М.В., Абрамова Е.Г., Сырова Н.А., Исяева М.Н., Киреев М.Н.</b> Определение специфической активности противохолерного энтерсорбента <i>in vitro</i> в дот-иммуноанализе.....	199
<b>Перфилова К.М., Неумоина Н.В., Шутова И.В., Ларионова Т.В., Трошина Т.А., Неумоина М.В., Ефимова Е.И., Орлова К.А.</b> Исследование <i>Caq A</i> гена и специфического иммунного ответа при хеликобактерной инфекции.....	202
<b>Полтавченко А.Г., Нечитайло О.В.</b> Автономный набор для мультиплексного дот-иммуноанализа.....	207
<b>Сенина Т.В., Жога Л.К., Илюхин Е.В., Шубникова Е.В.</b> Селективная питательная среда для выделения возбудителя сапа.....	211
<b>Точилина А.Г., Белова И.В., Соловьева И.В., Ефимов Е.И., Горлова И.С., Иванова Т.П., Жирнов В.А.</b> Подтверждение видовой принадлежности производственного штамма <i>Lactobacillus fermentum</i> 90 ТС-4 с использованием полногеномного секвенирования.....	213
<b>Федотов В.Д., Самойлова О.Ю.</b> Оценка микрофлоры свободно отделяемой мокроты у пациентов с ХОБЛ профессиональной этиологии.....	219
<b>Шишканова Л.В., Головченко Н.В., Криворотова Е.Ю.</b> Актуальные аспекты лабораторной диагностики паразитарных болезней.....	221
<b>Холматов К.И., Антонычева М.В., Белоусов А.Д., Вахрушина Н.И., Астафьева С.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В.</b> Валидация технологических процессов приготовления питательных сред, используемых в производстве вакцин.....	228
<b>Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Никифоров А.К., Феськова А.С.</b> Особенности предрегистрационных испытаний медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i> особо опасных инфекций.....	232
<b>Щипелева И.А., Марковская Е.И.</b> Биологическая безопасность и антибиотикорезистентность. Оценка перспектив совершенствования антибактериальной терапии чумы.....	236

### **Раздел 3. Иммунология инфекционного процесса**

<b>Григорьева С.А., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б., Кальгина Г.А., Курлаева Л.В., Фадеева Н.В.</b> Регулирующее влияние цитокинов на иммунный ответ у пациентов с хронической стадией иксодового клещевого боррелиоза.....	241
--	-----

<b>Воронина Е.В., Талаева М.В., Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е.</b> Экспрессия Vcl-6 в Т-хелперах, созревающих с В-лимфоцитами.....	243
<b>Костюченко М.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Санникова И.В., Дейнека Д.А.</b> Особенности экспрессии маркеров апоптоза на лимфоцитах крови у больных бруцеллезом.....	249
<b>Кропотов В.С.</b> Стимуляция клеточного звена иммунного ответа белком E7 вируса папилломы человека.....	252
<b>Курлаева Л.В., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б., Кальгина Г.А., Григорьева С.А., Фадеева Н.В.</b> Уровень цитокинов у больных хроническим боррелиозом, хроническим приобретенным токсоплазмозом и их сочетание.....	255
<b>Лукова О.А., Заславская М.И.</b> Влияние цитокинов на адгезивные взаимодействия эпителиальных клеток слизистых оболочек с <i>Candida albicans</i> in vitro.....	258
<b>Махрова Т.В.</b> Влияние сывороточных факторов на адгезивную активность <i>Candida albicans</i> в реакциях с буккальными эпителиоцитами.....	259
<b>Петрова О.А., Стоянова Н.А., Любимова Н.Е.</b> Изучение некоторых про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных лептоспирозом.....	262
<b>Саркисян Н.С., Ковалевич Н.И., Галяс В.А., Пономаренко Д.Г.</b> Показатели системы гемостаза у больных острым бруцеллезом.....	265
<b>Саркисян Н.С., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Костюченко М.В.</b> Патологические изменения в иммунном статусе у больных бруцеллезом с различной степенью лимфоцит-зависимой специфической сенсibilизации.....	268
<b>Талаева М.В., Воронина Е.В., Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е.</b> Экспрессия репрессора транскрипции Vcl-6 в дендритных клетках.....	270
<b>Филатова Е.Н., Анисенкова Е.В., Преснякова Н.Б., Сычева Т.Д., Кулова Е.А., Уткин О.В.</b> Восприимчивость к апоптозу DR6+ наивных Т-лимфоцитов здоровых детей и детей с острым инфекционным мононуклеозом.....	275

#### **Раздел 4. Биологическая безопасность и биозащита, эффективность дезинфекционных и стерилизационных мероприятий**

<b>Баязитова Л.Т., Миронов М.М., Тюпкина О.Ф., Чазова Т.А.</b> Оценка антимикробного действия рабочих поверхностей хирургического мехатронного комплекса «Робот».....	282
<b>Веркина Л.М., Писанов Р.В., Иванов С.А., Головин С.Н.</b> Новый метод оценки эффективности СВЧ-обеззараживания медицинских отходов.....	283
<b>Говорунов И.Г., Ерёмченко Е.Н., Тюрин Е.А.</b> Информационное обеспечение опасного биологического объекта.....	284
<b>Квашнина Д.В.</b> Критический анализ применения хлоргексидина как кожного антисептика.....	289
<b>Кряжев Д.В.</b> К вопросу об уровне микогенной контаминации больничных зданий и подходах к ее нормированию на примере одного из многопрофильных медицинских учреждений Нижнего Новгорода.....	293
<b>Посоюзных О.В., Катаева Л.В.</b> Способ количественной оценки бактерицидной активности дезинфицирующих средств.....	298
<b>Чекан Л.В., Шабалин Ю.А., Тюрин Е.А.</b> Влияние современных моющих средств на концентрацию рабочих растворов перекиси водорода.....	302

## К 95-летию академика РАМН И.Н. Блохиной

Чем бережнее относимся мы к вчерашнему, тем больше у сегодняшней молодежи чувства долга и ответственности перед настоящим.

И.Н. Блохина

Люди уходят, но остаётся память о них. Юбилейные даты заставляют нас подводить итоги каждой человеческой жизни, заново переосмысливать прожитое и сделанное, и с благодарностью вспоминать людей, оставивших глубокий след в истории своими делами и поступками.

21 апреля 2016 года исполнилось 95 лет со дня рождения Ирины Николаевны Блохиной. Можно много говорить об этом уникальном человеке, перечисляя её заслуги, степени, звания награды: действительный член Российской академии медицинских наук, доктор медицинских наук, профессор, лауреат Государственной премии СССР, Почётный гражданин города Нижнего Новгорода, выдающийся учёный, создавший своё направление в науке, автор более 150 публикаций (в том числе 6 монографий), на протяжении 44 лет - директор Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии, который теперь носит её имя. Но главное – это то, что люди, которым посчастливилось по жизни встречаться, работать, общаться с Ириной Николаевной, хранят светлую память о ней как о замечательном человеке и учителе.

Что можно ещё написать о человеке, о котором уже написано так много, разными людьми и в разных изданиях? Имея возможность воспользоваться сохранившимися в музее института материалами, статьями, в основном интервью, о различных вехах жизни Ирины Николаевны, мы решили попробовать собрать эссе из некоторых газетных публикаций, а также конспектов двух ее выступлений, отражающих эпоху, в которой она жила и в которой она своим трудом оставила яркий след...

Итак, слово Ирине Николаевне:

*«Я родилась и выросла в семье врача, влюбленного в свою профессию. Одно из ярких воспоминаний моей юности - крупная фигура отца в белом халате в коридоре родильного дома, неподалеку от входа в комнату новорожденных. С широкой, доброй, немного лукавой улыбкой он говорит мне - студентке первого курса медицинского института: «Ты только послушай, какая музыка!». По коридору звонко и требовательно разносится многоголосое «уа-а-а». А за окном весна, талый снег, яркое солнце, радостное щебетанье птиц...*

*Помогать рождению новой жизни, чувствовать всю радость жизни, беречь ее от страданий, которых можно избежать, от преждевременной старости, от преждевременной смерти - этому призванию служат многие поколения медиков. Для любого из нас насильственная смерть, искусственно причиненные страдания - извращенность и преступление. К сожалению, мне и моим товарищам рано пришлось с этим встретиться - в студенческие годы.*

*Нашему поколению не нужно рассказывать, что такое фашизм. Мы никогда не забудем всего, что пережили, призыв Юлиуса Фучека: «Люди, будьте бдительны!» - живет в наших сердцах. Эта бдительность как никогда нужна сегодня, когда решается вопрос о производстве и размещении в странах Западной Европы нового смертоносного оружия нейтронной бомбы.*

*Как депутат Верховного Совета СССР\*, я горжусь тем, что в Конституции моей Родины принципы миролюбивой внешней политики зафиксированы специальной статьей. Я хорошо знаю, какое горячее одобрение этой политики высказывают мои избиратели, как и все советские люди. Но вопросы мира на Земле не решаются односторонне, они требуют единодушных усилий парламентариев и правительств разных стран. Нет такого народа, который не хотел бы мира, и мы обязаны выполнять волю народов и не вовлекать их в беду вопреки этой воле.*

*Те, кто хочет навязать человечеству нейтронную бомбу, любят порассуждать о правах*

---

\*- Ирина Николаевна Блохина с 1974г избиралась депутатом Верховного Совета СССР 3-х созывов.

человека. Но разве право на жизнь не самое первое, не самое неотъемлемое право человека? Что может быть более священным, чем жизнь их детей для миллионов матерей, населяющих необъятную нашу планету?

*Я не акушер-гинеколог, как мой отец, моей узкой специальностью стала микробиология - очень добрая и очень щедрая наука. Скольких страшных эпидемий не стало на Земле, сколько видов промышленности родилось с помощью этой науки. Но ее возможности далеко еще не исчерпаны.*

*Микробы - наши друзья и помощники при решении самых острых проблем, которые волнуют человечество. Они встают на страже охраны внешней среды от загрязнения. Свойство очищать - разлагать все ненужное - заложено в них самой природой, наша задача только умело использовать эту естественную закономерность. Природа наделила микробный мир и неистощимой способностью к синтезу, отсюда огромные возможности использования нашей науки в решении проблемы питания. Мы очень хотим, чтобы рука об руку вместе с нами во имя добрых дел на Земле работали и физики. У них в этом отношении огромные возможности. Но если достижения науки обращаются в орудие насилия, в орудие истребления жизни - это кощунство.*

*Развитие микробиологии в XX веке шло рука об руку с развитием генетики - науки о наследственности. Больших вершин достигли знания в этой области. Те, кто хоть сколько-нибудь близок к ним, хорошо понимает, что может сулить людям нейтронное оружие в дополнение к непосредственному сиюминутному уничтожению всего живого. Его неизбежными последствиями будут длительные воздействия на наследственность поколений. Болезни крови, злокачественные опухоли с юношеских, с детских лет, преждевременные смерти, рождение неполноценных детей, вырождение... Нечего сказать - «блестящие итоги» развития научно-технического прогресса. Хочется верить в то, что у народов мира XX века достаточно реализма и чувства ответственности перед будущими поколениями Земли, чтобы не допустить этого безумия. Закончить мне хочется словами одного из величайших деятелей XIX столетия, основателя нашей микробиологической науки, французского ученого Луи Пастера: «Верю, что знания и мир победят невежество и войну!».*

В 1979 году Ирина Николаевна была избрана действительным членом академии медицинских наук СССР. Принимая поздравления с этим событием, она ответила: «... своими успехами я обязана коллективу нашего института, многим медикам области. Основное направление нашей научной работы – это изучение физиологии микроорганизмов, их взаимодействия с человеческим организмом. Мы стараемся вскрыть естественные механизмы защиты от инфекционных заболеваний, понять и попытаться воспроизвести те защитные факторы, которыми природа наградила человека. На этой основе разработано большинство наших препаратов, например, представители, так называемой, нормальной микрофлоры: колибактерин, лактобактерин, бифидумбактерин.... Не вторгаться в человеческий организм, особенно в организм ребенка, с чем-то глубоко ему чуждым, а лишь усилить, восстановить его природные защитные силы – вот один из основных принципов нашей научной работы... Достижения фундаментальной науки мы стремимся доводить до конкретного применения на практике. Вот, например, изучение структуры нуклеиновых кислот методом геносистематики привело к тому, что институт стал центром, который оказывает помощь при классификации и идентификации микроорганизмов в неясных для микробиологов случаях» (газета «Горьковская правда», 1980).

23 апреля 1981 г. газета «Ленинская смена» (г. Горький) поздравила с 60-летним юбилеем Ирину Николаевну, которая рассказала о своем пути к призванию следующее: «Мне кажется, что путь в науку – да и вообще к любому делу – лежит не только через горы учебников. Наверное, будь другим мое окружение, те люди, среди которых я выросла, другой была бы и я сама, иначе сложилась бы моя жизнь.

*У нас был хороший дом - открытый для всех. Нам, детям, никогда не приходило в голову, что родители могут стеснять наших друзей, все мы жили интересами друг друга. С самого начала так было заведено: тем, что касается дела, делились со всеми. Свои сомнения никто не скрывал – мы уважали эти сомнения, если кому-то из нас нужно было что-то для себя выяснить, другие времени*

на это не жалели. С самого начала меня окружали люди увлеченные, не прощающие себе слабости воли. Учительница Ольга Федоровна Крылова, очень дорогой для меня человек, внушила мне: «Слова «не могу» нет, бывает только слово «не хочу». Чтобы достигнуть чего-нибудь в любом деле, нужно забыть, что есть «не могу», нельзя пасовать перед тем, что не получается, нельзя походить вокруг дела и забросить его. Эти истины, мне кажется, не нужно доказывать. Их просто надо однажды усвоить: нельзя, и все тут.

То же самое было потом и в школе. Сейчас, взрослым умом, я понимаю, что нас конечно же воспитывали. Но мы сами этого как-то не замечали, казалось, что нам предоставлена полная свобода. Вокруг были мудрые люди, они не вольницу нам подарили, а самостоятельность.

А позднее, когда я стала на кафедре мединститута заниматься микробиологией, опять рядом были люди, которые помогли мне определиться не только как исследователю, но прежде всего как человеку. Микробиология – на редкость увлекательная наука. Ну, просто дух захватывает от того, что узнаешь! Я и потом, долгие годы, когда уже работала в институте, каждый день сгорала от любопытства и нетерпения: прибегала в лабораторию ни свет, ни заря посмотреть, что же вышло из моего опыта.

Так вот, не было в микробиологии ничего такого, что бы меня не увлекало. А Клавдия Ивановна Сучкова, одна из моих учителей, умеряла мой пыл. Она примерно так говорила: узоры инея на стекле тоже интересно изучать, но кому от этого польза? Она учила главные свои силы собрать на таком деле, у которого есть практическая ценность, которое если не сегодня, то завтра поможет людям, будет им служить.

Слова Ивана Петровича Павлова: «Наука требует от человека всей его жизни», - это мудрые слова, которые познаешь только собственным опытом.

А наука, - наука дала мне огромное счастье. Результат появляется не сразу, приходится ждать, иногда – несколько часов, иногда – годы. Ожидание – что же там, в конце опыта, тот миг, когда тайна еще существует, но вот-вот откроется – это самое прекрасное, этому стоит посвятить жизнь!»

8 Марта 1984 года «Медицинская газета» опубликовала интервью с Ириной Николаевной Блохиной в связи с её избранием депутатом Верховного Совета СССР в третий раз: «Это было и остается для меня большой честью. Когда мне впервые сообщили о решении рабочих одного из горьковских предприятий выдвинуть меня кандидатом в депутаты, я в первую минуту не могла толком ничего сказать. Поверите ли – испугалась. Как тридцать лет назад в кабинете министра: ведь такая огромная ответственность! Так же переживала, когда избрали меня председателем Комиссии по здравоохранению и социальному обеспечению Совета Союза Верховного Совета СССР...

Когда-то институт начинался с небольшой Пастеровской станции. В годы войны в городе возник крупный центр по производству ряда препаратов. Это стало мощным импульсом к расширению тематики научной деятельности института, привлечению новых кадров, возникновению производственных цехов. 14 лет руководила институтом профессор А.Н. Мешалова, доброжелательное внимание и ясный ум которой определили мою научную судьбу».

А вот комментарии к фоторепортажу «Медицинской газеты» от 14 ноября 1986 года из рабочего кабинета директора института «День депутата: масштабы будней»:

«Это рабочее утро у академика АМН СССР Ирины Николаевны Блохиной началось на строительной площадке. Для депутата Верховного Совета СССР, директора Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии заботы строительные – среди самых важных. Расширяется база института, оснащаются лаборатории, но особенно много новостроек по наказам избирателей – жителей Нижегородского, Советского, Приокского районов. Молодые матери знают, сколько сил и настойчивости понадобилось Ирине Николаевне, чтобы открылись лучшая в городе детская поликлиника с бассейном, молочная кухня. Доля ее стараний вложена и в строительство автоматической телефонной станции, новых школ и детских садов, жилых домов в микрорайоне Верхние Печоры. Так что со строителями депутат Блохина может разговаривать вполне профессионально и убедительно.

Более тридцати лет руководит Ирина Николаевна институтом, и забот все прибавляется.

*Растут объем и уровень научных исследований, совершенствуется клиническая база. По инициативе Блохиной при НИИ создана клиника, где ежегодно более полутора тысяч больных проходят лечение в стационаре, более двух с половиной тысяч получают консультативную помощь. В клинике занимаются актуальными проблемами лечения вирусных гепатитов, применяют новые препараты, создаваемые в институте...*

*...Дорога каждая минута рабочего дня, но Ирина Николаевна словно и не спешит, доброжелательно, не торопя выслушивает собеседника, отвечает на телефонные звонки. Обратился по телефону больной, которому тут же было назначено время консультации.*

*Рабочий день Ирины Николаевны расписан по минутам. Провела Ученый совет, потом побывала в одном из подразделений института – необходимо обсудить освоение новых технологий.*

*Учеников у профессора Блохиной множество: около тридцати кандидатов наук выросло в стенах института, защищены четыре докторские диссертации. И если она отлучается по депутатским делам, то уверена: сбой в работе не будет, всегда можно положиться на коллег.*

*В кабинет входят члены Общества охраны природы – требуется помощь депутата: возможно положение с уникальным заказником, земли которого облюбовали для себя промышленные предприятия Арзамаса.*

*Ирина Николаевна – коренная волжанка, она любит родную нижегородскую землю. Здесь выросла, здесь начинала работать медсестрой, постигала непростую науку милосердия, прошла школу общественной работы, училась слушать и понимать людей...*

*В университете Блохина на общественных началах руководит кафедрой молекулярной биологии, оплату за лекции более десяти лет перечисляет в Фонд мира.*

*Каждая встреча с молодежью – радость для нее не только как для педагога.*

*Ирину Николаевну часто просят рассказать и о работе Комитета советских женщин, членом которого она является, и о зарубежных поездках, и о заботах депутатских.*

*О большой и очень важной части деятельности Ирины Николаевны как общественного деятеля свидетельствует текст её выступления на заседании Горьковского отделения Комитета советских женщин в 1969 году:*

#### *«ДОРОГИЕ ТОВАРИЩИ!*

*В связи с работой в Комитете Советских женщин я имела возможность близко встретиться с замечательной советской женщиной, с первой женщиной в мире, познавшей путь в космос - Валентиной Владимировной Николаевой-Терешковой - председателем Комитета Советских женщин.*

*Валентина Владимировна просила меня передать большой сердечный привет нашим горьковчанкам и выразить уверенность в том, что женщины города, богатого революционными традициями и трудовыми успехами, будут в первых рядах борцов за права, свободу и счастье женщин всего мира.*

*У женщин Земли разные судьбы. У женщин Земли разного цвета кожа, разный язык, разный обычай жизни. Но в груди каждой женщины бьется сердце матери, и поэтому женщины Земли хорошо понимают друг друга. В сердце каждой из нас отзывается острой болью горе вьетнамских матерей, утрата детских жизней, растерзанных и потопленных в крови.*

*Вот почему на улицах Осло и других городов Норвегии женщины продают горсточки риса, как напоминание о рисовых полях далекой южной страны, которые американские агрессоры сжигают напалмом. Полученные от продажи этих горсточек риса средства идут народу Вьетнама. Женщины Австралии, Канады и многих других стран вяжут и шьют одежду для детей и женщин Вьетнама. Англичанки сдают свою кровь для вьетнамских госпиталей. Тысячи японок, не страшась столкновений с полицией, борются против использования их страны как американской военной базы для агрессии против Вьетнама. Миллионы женщин социалистических стран, наших советских женщин вносят средства в Фонд мира, снаряжают корабли, несущие к берегам Вьетнама реальную помощь и тепло наших душ, которое помогает женщинам Вьетнама упорно стоять и выстоять в борьбе за свою свободу и независимость. Женщины нашего города также вносят свой вклад в помощь детям и женщинам Вьетнама. Мы с Вами ча-*

сто видим на улицах города афиши концертов и спектаклей с короткой пометкой «в фонд мира».

У наших славных сормовичек в последние годы стали традиционными тематические вечера, посвященные борьбе вьетнамского народа за независимость и свободу. Средства, собранные при проведении этих вечеров, направляются женщинам и детям Вьетнама.

В январе-феврале этого года\* прошел ряд митингов во многих медицинских учреждениях города. На митингах выступали женщины-фронтовики, судьба которых в недавнем прошлом была такой близкой сегодняшней судьбе вьетнамских женщин. Средства, собранные медиками, направлены в фонд помощи Вьетнаму. Да и в самой Америке участники движения «Женщины борются за мир!» пикетируют Белый дом, идут в колоннах маршей мира, требуют немедленно вывода американских вооруженных сил с вьетнамской земли. Среди них немало негритенок – женщин нелегкой судьбы, которым в так называемой свободной Америке приходится оплакивать своих детей – юношей и девушек, искалеченных и убитых, только за то, что они хотят работать и учиться наравне с другими. А рядом расцветенный неверными миражными огнями Бродвей, как олицетворение мира продажного, мира фальшивого, выдаваемого за образец, но не сулящего юности ничего, кроме душевного опустошения и растления. Что за свободу несет людям этот хваленый мир, наглядно показывает горький опыт греческого народа.

Вот начало письма одной из узниц афинской Афсалии – молодой гречанки, прошедшей через все ужасы пыток и истязаний: "К вам обращается женщина: если вы получите мое письмо, держите его в своей руке и бейте им в двери, чтобы разбудить спокойных людей». Какое сердце не откликнется гневным протестом в ответ на этот призыв?

И женщины Земли дружно встают на борьбу за права и свободу своих далеких подруг, за жизнь и счастье всех детей. С 14 по 18 июня этого года\* в Хельсинки по инициативе Международной демократической федерации женщин состоится Всемирный конгресс, посвященный роли женщины в современном мире.

Доклад "Женщина и труд" готовят советские женщины, тему «Женщины в общественной жизни» должны разработать мексиканки, над вопросом «Роль женщины в борьбе за национальную независимость и мир» работают женщины Судана. Доклад "Женщина в семье" готовится в Австралии. О солидарности женщин всего мира с борьбой вьетнамского народа расскажут представительницы Демократической республики Вьетнам и Южного Вьетнама.

Восьмое марта этого года женщины всех стран встречают большой подготовительной работой к конгрессу, усилением выражения солидарности с героическим вьетнамским народом, с патриотами Греции, женщинами Азии и Африки. Все новые и новые тысячи женщин в разных странах участвуют сейчас в демонстрациях против войны во Вьетнаме, несут "вахты мира", пикетируют посольства США, собирают средства в помощь вьетнамским женщинам и детям.

Во многих странах разворачивается работа по созданию материального фонда Конгресса.

С огромной надеждой, как на образец подлинно-счастливой судьбы смотрят наши подруги на нас, советских женщин, на женщин социалистических стран. В самом деле, ведь для нас уверенность в завтрашнем дне, свобода и равноправие во всех областях жизни стали настолько обычными, само собой разумеющимися, что мы иногда просто не замечаем того, что имеем, как не замечает человек воздуха, которым привычно дышит каждый день, но без которого не мог бы жить.

Отдадим же все свои силы, таланты, волю, энергию за то, чтобы жизнь всех женщин на Земле была счастливой, а будущее всех детей – светлым и безоблачным!».

Ирина Николаевна Блохина оставила нам, коллегам, ученикам, потомкам, продолжателям ее научных направлений, бесценное наследие своих мыслей, идей, начинаний.

Подлинный подвижник науки Ирина Николаевна Блохина навсегда осталась в сердцах своих учеников настоящим Учёным, Учителем и Человеком!

В.В. Королева  
Г.И. Григорьева

---

\*-1969 год.



В кабинете молодого директора института: С.А. Семичева, И.Н. Блохина, Г.Я. Городисская (1956г.)



В лаборатории биохимии и физиологии микроорганизмов: Я.В. Хейфец, И.Н. Блохина, Г.Я. Городисская, Р.С. Перова (1957 г.)



10-я СЕССИЯ ВЕРХОВНОГО СОВЕТА СССР 9-го СОЗЫВА  
Москва, Кремль, ноябрь 1978 г.



Поздравление с юбилеем института в г. Горьком (зал ТЮЗа): Ю.Н. Христораднов, первый секретарь Горьковского обкома КПСС, вручает И.Н. Блохиной Почетную грамоту Президиума Верховного Совета РСФСР (16.10.1979 г.)



Москва, 21.11.1979: поздравление с юбилеем института



Визит советской парламентской делегации в Индию. Возложение венка на место кремации М. Ганди (декабрь 1981 г.)



Визит советской парламентской делегации в Индию. Встреча в аэропорту (1981г.)



Первомайская демонстрация, 1980г.: И.Н. Блохина среди молодых сотрудников  
(А.И. Воронин, С.Н. Богословский, В.Н. Ложкин, Ш.Х. Абзеев)



Н.С. Захарьевская, И.Н. Блохина  
1955 год



Во время визита делегации Комитета  
советских женщин во Вьетнам и Кампучию  
(1979)



Во время визита делегации Комитета советских женщин во Вьетнам и Кампучию (1979):  
торжественный прием.



Поездка в Австрию (1984) в составе  
делегации Верховного Совета СССР

# РАЗДЕЛ 1. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА АКТУАЛЬНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ И ОЦЕНКА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО РИСКА

## ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ NON O1/NON O139*, ВЫЗВАВШИХ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЛЮДЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ КАЛМЫКИЯ

Архангельская И.В., Монахова Е.В., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Демидова Г.В.  
ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,  
Ростов-на-Дону

Холерные вибрионы не O1/не O139 серогрупп являются обитателями пресных и умеренно-соленых водоемов, а также способны вызывать заболевания у людей, которые попадают в инфекционные стационары с диагнозами: «острая кишечная инфекция(ОКИ)», «гастроэнтерит», «гастроэнтероколит» различной степени тяжести. На территориях Российской Федерации [1-3] ОКИ, вызванные холерными вибрионами неO1/неO139 серогрупп, регистрируются практически ежегодно, в том числе и в Республике Калмыкия, где только с 2000 по 2015 г. от больных было выделено 60 штаммов. Возраст заболевших варьировал от 6 месяцев до 70 лет. Ранее нами была показана крайняя генотипическая изменчивость популяции *Vibrio cholerae non O1/non O139*, выделенных в Ростовской области с 1968 г. по 2015 г., и установлено, что вирулентность клинических штаммов в отсутствие генов ключевого фактора патогенности – холерного токсина (*ctx AB*) может быть связана с экспрессией детерминант других факторов [3]. Целью настоящего исследования явилось серотипирование и ПЦР-генотипирование клинических штаммов *V. cholerae non O1/non O139*, выделенных на территории Республики Калмыкия с 2000 по 2015 г.

### Материалы и методы

Нами были изучены 60 клинических штаммов *V. cholerae non O1/non O139*, выделенных на территории Республики Калмыкия с 2000 по 2015 г. и поступивших в музей живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института. Фенотипические свойства определяли общепринятыми методами; серотипирование проводили с помощью набора сывороток к 80 серогруппам, полученных в Ростовском противочумном институте; ПЦР-типирование – как описано ранее [2] с использованием специфических праймеров для детекции 65 генов и их аллелей. Кластерный анализ и построение дендрограммы проводили по методу UPGMA с использованием авторского программного обеспечения, встроенного в геоинформационную систему «Холера. Штаммы – VNTR» [4]. Способность штаммов к экспрессии системы секреции 6 типа (Т6SS) была изучена на модели *Dictyostelium discoideum* как описано ранее [5].

### Результаты и обсуждение

Все изолированные штаммы *V. cholerae non O1/non O139* были типичны по культурально-морфологическим и биохимическими свойствам. С помощью имеющихся в нашем распоряжении сывороток серогрупповую принадлежность удалось установить у 68,3% штаммов. Выявлены представители 21 серогруппы: O2 – 2 штамма, O3 – 2, O5 – 4, O8 – 3, O19 – 3, O34 – 2, O39 – 2, O50 – 3, O58 – 4, O60 – 2, O78 – 2, O80 – 2; по одному штамму относились к серогруппам O4, O6, O16, O47, O49, O57, O62, O72, O76, O82. Немногочисленность представителей каждой серогруппы не позволяет говорить о доминировании какой-либо из них на данной территории, в тоже время стоит отметить выделение на протяжении ряда лет вибрионов O5 серогруппы (2000, 2002, 2003, 2005 гг.) и O8 (2000 и 2005 гг.).

При ПЦР-генотипировании по наличию/отсутствию генов факторов патогенности/персистенции, входящих в состав кластеров, мобильных элементов либо геномных островов, популяция холерных вибрионов также оказалась крайне неоднородной. У всех культур выявлены гены гемагглютинин/протеазы, протеазы PrtV, коллагеназы, цитотонического фактора Cef, белка наружной мембраны OmpW, *tol*- и *vps*-кластеров (кодирующих факторы персистенции), регуляторных генов *toxR*, *hapR*, транслоконов T6SS, которые, видимо, характерны для всех холерных вибрионов независимо от вирулентности. Установлено отсутствие в геноме всех штаммов профагов CTX (с генами *ctxAB*), pre-CTX и RS1, генов термостабильного, шигаподобного токсинов, прямого термостабильного (TDH) и родственного ему гемолизина (TRH) *V. parahaemolyticus*. Несмотря на отсутствие генов токсин-корегулируемых пилей адгезии *tcpA* и регулятора *toxT*, входящих в состав острова патогенности VPI, у 40 % штаммов определялись по 1-2 других гена этого острова (*tagA*, *top* и *acfB*), что может свидетельствовать о присутствии неполного VPI, утратившего часть генов в результате делеции. Сайт специфической интеграции *attRS* присутствовал у 48 культур. У многих штаммов были выявлены гены острова патогенности VPI-2 и RTX-кластера, ответственного за синтез высокомолекулярного цитотоксина MARTX. У большинства штаммов оба содержали делеции в разных участках (Табл. 1). Ген *cholix*-токсина (*chxA* I типа) – блокатора белкового синтеза, обладающего цитотоксичностью и обуславливающего коагуляционный некроз клеток и гибель экспериментальных животных, обнаружен у 7 штаммов; ген мощного фактора патогенности сериновой протеазы (*VC1649*) – у 24 штаммов; белка наружной мембраны OmpU – у 32 штаммов.

Таблица 1. Результаты ПЦР-детекции генов VPI-2 и RTX-кластера

VPI-2	Число штаммов	RTX	Число штаммов
int+ nanH+ vce+	5	rtxA+ acd-rtxA+ rtxC+	46
int+ nanH+ vce-	23	rtxA+ acd-rtxA- rtxC+	14
int+ nanH- vce-	17		
int- nanH- vce-	9		
int- nanH+ vce-	2		
int+nanoH- vce+	4		

Примечания: *int* – ген интегразы (5'-концевая последовательность VPI-2), *nanH* – нейраминидазы, *vce* – 3'-концевая последовательность VPI-2; *rtxA* – 5'-концевая последовательность гена, *acd-rtxA* – последовательность, кодирующая актин-связывающий домен MARTX, *rtxC* – ген активатора MARTX.

Все штаммы были лишены генов острова пандемичности VSP-I (*tnp0185*, *deo175*, *VC0185*), однако у некоторых выявлены отдельные гены острова пандемичности VSP-II – *pro0490* (у 4 культур), *pro0496* (у 14 культур), *VC502* (у двух культур), а также их сочетаниями (*pVSP-II*, *pro0490* и *pro0496* у двух культур; *pro0490* и *pro0496* у четырех культур). Наличие отдельных генов острова пандемичности VSP-II указывает на родственные связи вибрионов неO1/неO139 серогрупп с представителями биовара Эль Тор, которые практически ежегодно выделяются из водных объектов окружающей среды на территории Республики Калмыкия и, возможно, обмениваются генетической информацией с вибрионами других серогрупп, являющимися обитателями этих водоемов и служащими этиологическими агентами заболевания людей.

По результатам ПЦР-генотипирования методом UPGMA [4] была построена дендрограмма (Рисунок). 60 штаммов образовали 56 генотипов, которые были объединены в 7 кластеров A-G (Табл. 2). Дискриминирующая сила генотипирования  $D=0.997$ , что является высоким показателем (идеал  $D=1$ ).

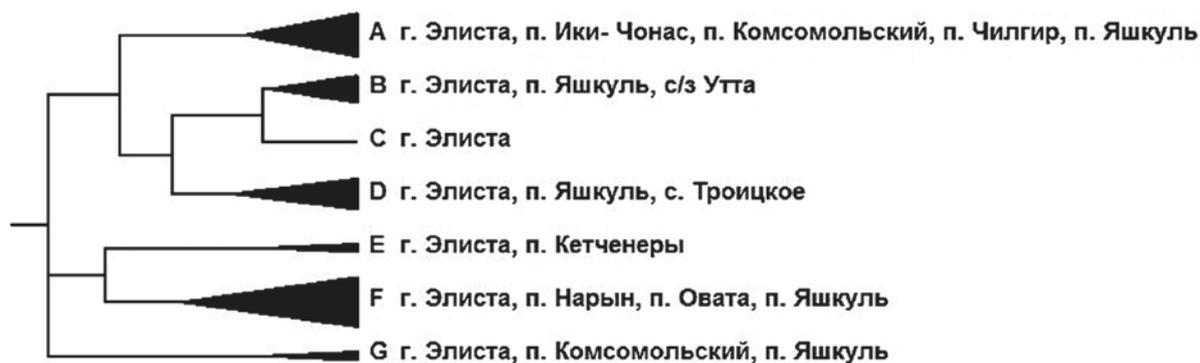


Рисунок. Дендрограмма, построенная на основании кластерного анализа распределения 21 гена (из анализа были исключены гены, которые присутствовали либо отсутствовали у всех без исключения штаммов)

Таблица 2.

Распределение генотипов штаммов *Vibrio cholerae* non O1/non O139, выделенных в разное время на территории республики Калмыкия, по кластерам, представленным на рисунке

Год выделения	кластер число штаммов	A	B	C	D	E	F	G
		2000	16	A3,A7			D3-D10	E3
2001	8	A2,A14			D1,D2,D6		F4,F8,F14	
2002	2	A9					F12	
2003	11	A6,A8, A11	B7,B8,B9			E2	F2F6,F11	
2004	1	A10						
2005	13	A4,A5, A13	B1-6	C1			F5,F13,F16	
2006	5	A8					F1,F3	G1,G2
2007	1	A12						
2014	2					E1		
2015	1	A1						
Всего	60	15	9	1	11	4	17	3

Кластер А представлен 15 культурами, выделенными в разные годы в основном в г. Элисте и имеющими неполный остров VPI-2 (чаще *int<sup>+</sup> nanH<sup>+</sup> vce<sup>-</sup>*), RTX-кластер, а также гены транслоконов системы секреции третьего типа (ТЗСС), что в 80% случаев совпадало с наличием гена ее ключевого эффектора *VopF*, при отсутствии генов *chxA* и сериновой протеазы (*VC1649*).

Кластер В состоял из 9 штаммов из г. Элисты и п. Утта (2003-2005гг.) и характеризовался отсутствием гена *chxA*, острова VPI-2, кластера ТЗСС и присутствием интактного RTX-кластера, последовательности, кодирующей пептидогликан-связывающий домен эффектора Т6SS (*pbd-vgrG3*) и, в 67 % случаев, гена сериновой протеазы (*VC1649*).

Кластер С образован одним штаммом с генотипом *attRS<sup>+</sup> aldA<sup>+</sup> int<sup>+</sup> rtxA<sup>+</sup> acd-rtxA<sup>+</sup> pro0496<sup>+</sup> pbd-vgrG3<sup>+</sup> chxA<sup>+</sup>*.

Особенностью кластера D (11 культур, выделенных в трех населенных пунктах в 2000 и 2001гг.) можно считать наличие только одного гена *int* из острова VPI-2 и отсутствие генов ТЗСС и сериновой протеазы; два штамма из этого кластера содержали гены *chxA* I типа, у четырех штаммов выявлены детерминанты обоих ключевых эффекторов Т6SS (*acd-vgrG1* и *pbd-vgrG3*).

К кластеру Е отнесены четыре культуры с полными островом VPI-2 и интактным RTX-кластером, остальные гены выявлены в разных сочетаниях.

Самый многочисленный кластер F(17 культур) отличался наличием у большинства штаммов гена *acfB*, укороченного VPI-2 (*int<sup>+</sup> nanH<sup>+</sup> vce<sup>-</sup>*) и гена сериновой протеазы (*VC1649*), у трех штаммов обнаружены гены *chxA* I типа.

Кластер G из трех культур, изолированных в 2000 и 2006 годах в трех населенных пунктах был интересен наличием неполного острова персистенции VSP-II, остальные гены, в том числе систем секреции, представлены в различных комбинациях.

При этом каждый кластер почти не содержал полностью идентичных штаммов (за исключением нескольких культур, в том числе изолированных от одного и того же больного в разное время). Следует отметить выявление гена маннозочувствительных пилей *mshA* у двух культур, хотя ранее нами он был обнаружен только у водных штаммов *V. cholerae* non O1/non O139 [3]. Все перечисленные гены практически не встречались в геноме одного штамма, а присутствовали в разных сочетаниях, и ПЦР-генотипы никак не коррелировали с серогрупповой принадлежностью.

Поскольку в геноме ряда штаммов были выявлены не только структурные гены T6SS, но и детерминанты их ключевых эффекторов (актин-связывающего *acd-vgrG1* и пептидогликан-связывающего *pbd-vgrG3*), представляло интерес определить их способность к экспрессии данной системы секреции на обычно используемой в этих целях модели клеточного слизевика *Dictyostelium discoideum*. Однако все без исключения культуры оказались в той или иной мере чувствительны к поеданию этим организмом (*Dictyo<sup>S</sup>*-фенотип). Возможно, это связано с отсутствием у них VPI, поскольку ранее устойчивые (*Dictyo<sup>R</sup>*) штаммы были выявлены нами только среди содержащих этот остров патогенности [5], хотя конкретная роль продуктов входящих в его состав генов в резистентности неизвестна. Кроме того, к проявлению *Dictyo<sup>R</sup>*-фенотипа не приводило и наличие генов каких-либо других факторов патогенности, что указывает на то, что они либо не экспрессируются в использованных условиях эксперимента, либо их продукты не токсичны для *D. discoideum*.

Установленное генетическое разнообразие вибрионов не O1/не O139 серогрупп, циркулирующих на одной территории, подтверждает чрезвычайную пластичность их генома и одновременное существование множества клонов с разными генетическими характеристиками. Такая же картина наблюдалась ранее при изучении популяции штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, циркулирующих и продолжающих инфицировать людей в граничащей с Калмыкией Ростовской области на протяжении более полувека [3]. Их способность вызывать заболевания со сходным клиническим течением обусловлена, по-видимому, целым рядом «взаимозаменяемых» факторов патогенности, наборы генетических детерминант и уровни экспрессии которых могут существенно различаться у разных штаммов, хотя в целом их «наборы» были одинаковы у двух популяций. В то же время выявление больных ОКИ, обусловленных вибрионами не O1/не O139 серогрупп, и постоянное обнаружение их в объектах окружающей среды, а также ежегодное выделение из тех же водных объектов атоксигенных холерных вибрионов O1 серогруппы позволяют сделать вывод о том, что на территории Республики Калмыкия, как и в Ростовской области, сложились благоприятные условия для циркуляции возбудителей и (в определенных случаях) проявления ими патогенных свойств. Этому может способствовать именно генетическая неоднородность популяции, в целом содержащей большой набор генов факторов патогенности и персистенции. Многие из них входят в состав мобильных элементов, поэтому не исключена возможность генетического обмена между представителями разных серогрупп, в том числе и O1. Вероятно, сохранение всех генов в геноме одного штамма было бы невыгодно энергетически, тогда как «распределение» по геномам разных штаммов допускает периодическое формирование наиболее жизнеспособных и обладающих выраженным патогенетическим потенциалом клонов за счет горизонтального переноса генов. Результаты настоящего исследования, использованные для создания базы данных, позволяют составить четкое представление о границах и объеме «резервуара» генов, присутствующих в исследованной популяции на протяжении 16 лет, и в случае последующего выделения на этой территории штаммов с какими-либо новыми генетическими характеристиками говорить об их заносном происхождении.

Изложенное свидетельствует о постоянном наличии в Калмыкии риска возникновения спорадических случаев и локальных вспышек ОКИ, вызываемых *V. cholerae* non O1/non O139, и необходимости совершенствования надзора за ними со стороны санэпидслужб республики.

#### Литература:

1. Кругликов, В.Д. Характеристика штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп, вызвавших заболевания людей в Ростовской области / В.Д. Кругликов, Е.В. Монахова, И.В. Архангельская, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, Е.П. Авдеева, Н.В. Божко, Л.М. Смоликова // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2011. – № 5. – С. 18-22.
2. Ерошенко, Г.А. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогруппы, выделенных от больных в г. Астрахани в 1976-2003гг. / Г.А. Ерошенко, Л.М. Куклева, Н.Ю. Шавина, В.В. Кутырев// Пробл. особо опасных инф. – 2006. – №2 (92). – С.41-44.
3. Архангельская, И.В. Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae* non O1/ non O139, циркулирующих в Ростовской области / И.В. Архангельская, Н.Б. Непомнящая, Е.В. Монахова, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, В.Д. Кругликов // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – №3. – С. 25-27.
4. Водопьянов, А.С. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2007620389. Холера. Штаммы –VNTR / А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, И.Ю. Сучков, Б.Н. Мишанькин. – 2007.
5. Монахова, Е.В. Изучение экспрессии контакт-зависимых систем секреции холерными вибрионами на модели *Dictyostelium discoideum* / Е.В. Монахова, Н.В. Божко// Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2010. – № 4. – С.89-92.

## СТРУКТУРА ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ТЕРРИТОРИЯХ С РАЗЛИЧНЫМ ТИПОМ ВОДОИСТОЧНИКОВ

Байдакова Е.В.

Управление Роспотребнадзора по Архангельской области, ГОУ ВПО Северный государственный медицинский университет, Архангельск

#### Актуальность.

К числу важнейших факторов, характеризующих санитарно-эпидемиологическое благополучие, относится обеспечение населения доброкачественной питьевой водой. За последние десятилетия антропогенное загрязнение поверхностных вод возросло настолько, что существенно нарушило ход естественных процессов в биосфере и значительно снизило возможность самовосстановления гидросферы крупных городов [1].

Исследователям установлены гигиенические показатели качества питьевой воды, оказывающие влияние на заболеваемость. Доказано, что такие показатели, как общее микробное число, содержание железа, мутность, окисляемость и цветность, могут быть использованы в качестве предвестников осложнения эпидемиологической ситуации при кишечных инфекциях с водным путем передачи [2].

Анализ литературных данных показывает, что общий подход к оценке риска, включающий в себя оценку реальной бактериальной нагрузки питьевой воды, инфицируемой патогенными и потенциально-патогенными бактериями с учетом санитарно-гигиенических факторов влияющих на заболеваемость населения ОКИ в настоящее время является актуальной задачей [3].

#### Материалы и методы.

Для исследования были выбраны показатели инфекционной и паразитарной заболеваемости среди совокупного населения Архангельской области по 25 муниципальным городам и районам. В качестве материалов использовались данные ежемесячного эпидемиологического мониторинга за инфекционной и паразитарной заболеваемостью за период 1994 – 2014 годы в зависимости от начала регистрации нозологии.

Для анализа выбраны следующие инфекции и инвазии с возможным водным путем реализации эпидемического процесса: дизентерия, сальмонеллез, лептоспироз, острый вирусный гепатит А, аскаридоз и ротавирусная инфекция (21-летний период наблюдения), лямблиоз и энтеро-

биоз (19-летний период наблюдения) энтеровирусная инфекция (9-летний период наблюдения) и норовирусная инфекция (6-летний период наблюдения). Для оценки структуры использовались экстенсивные показатели исследуемых нозологий. Для наглядной оценки распространенности нозоформ, вызываемых различными возбудителями, способ передачи которых может быть обусловлен водным фактором, все территории были разделены на 3 группы: территории с поверхностными источниками централизованного водоснабжения, территории с подземными источниками централизованного водоснабжения и территории обеспеченные централизованным водоснабжением из смешанных водоисточников.

Группа территорий с поверхностными источниками централизованного водоснабжения включает 7 муниципальных образований области: города Архангельск, Северодвинск, Новодвинск, Котлас, Коряжма, а так же Онежский район, включая город Онегу и Приморский район. В качестве источников питьевого водоснабжения на данных территориях используется вода открытых водоемов – рек.

Девять муниципальных образований области относятся к группе территорий с подземными источниками централизованного водоснабжения: Вилегодский, Виноградовский, Каргопольский, Красноборский, Лешуконский, Мезенский, Плесецкий, Шенкурский районы и город Мирный.

В третьей группе территорий обеспеченных централизованным водоснабжением из смешанных водоисточников отнесены девять муниципальных образований области: Вельский, Верхнетоемский, Коношский, Котласский, Ленский, Няндомский, Пинежский, Устьянский и Холмогорский районы.

#### **Результаты.**

Анализ многолетней динамики удельного веса неудовлетворительных по микробиологическим критериям проб воды поверхностных водоемов первой категории водопользования показал, что в структуру несоответствий значительный вклад вносят такие микробиологические показатели как: содержание термотолерантных колиморфных бактерий – 687 нестандартных проб или 40,0%, содержание общих колиморфных бактерий – 355 проб или 20,7% и содержание колифагов 134 пробы или 7,8%. В целом, наблюдается снижение удельного веса неудовлетворительных проб по микробиологическим показателям 24,8% в 2014 году к 45,6% в 2005 году, однако, в структуре прослеживается тенденция к значительному увеличению удельного веса нестандартных проб по содержанию термотолерантных колиморфных бактерий 94,9% в 2014 году к уровню 2009 года – 80,7%.

Из 330 исследований воды поверхностных водоисточников 73 не соответствовали санитарно-эпидемиологическим требованиям по микробиологическим показателям. Удельный вес нестандартных проб питьевой воды из поверхностных водоемов составил 22,1 %. Тогда как показатель удельного веса нестандартных проб по микробиологическим показателям воды подземных водоисточников области составляет 3,5% (20 из 573 исследований). Проведенный анализ качества воды поверхностных водоемов позволил определить процент неудовлетворительных проб по микробиологическим показателям в слудящих муниципальных образованиях области: город Архангельск – 41,9 %, город Коряжма – 29,6 %, город Котлас – 28,0 %, город Новодвинск – 18,2 %, Верхнетоемский район – 30,0 %, Вельский район – 29,6 %, Устьянский район – 14,3 %, Приморский район – 12,5 %, Котласский район – 11,1 %.

Анализ качества воды подземных водоисточников выявил следующие территории области с наиболее неудовлетворительными микробиологическими показателями питьевой воды: Устьянский район – 25,9%, Вилегодский район – 17,6%, Лешуконский район – 9,1%, Приморский район – 8,0%, Каргопольский район – 5,9%, Котласский район – 4,9%.

Для сравнения экстенсивных показателей в динамике среди всего населения Архангельской области, были выделены шестилетние периоды регистрации. В связи с тем, что годы начала регистрации некоторых ОКИ отставали от общей регистрации, так регистрации энтеровирусной инфекции началась только с 2006 года, норовирусной с 2008 года, временные промежутки были разделены на три шестилетних временных отрезка, что бы пронаблюдать каким же образом

происходило изменение ранговых мест той или иной ОКИ в различные промежутки времени. Результаты оценки экстенсивных показателей представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Общая структура острых кишечных инфекций, зарегистрированных на территории Архангельской области

	1997-2002			2003-2008			2009-2014		
	абс. знач.	уд. вес, (%)	РАНГ	абс. знач.	уд. вес, (%)	РАНГ	абс. знач.	уд. вес, (%)	РАНГ
Сальмонеллезы	5426	28,2	2	3870	25,8	2	2681	20,3	2
Острый вирусный гепатит А	1331	6,9	3	2432	16,2	4	107	0,8	6
Лептоспироз	59	0,3	5	82	0,5	6	32	0,2	7
Дизентерия	11288	58,8	1	4694	31,3	1	857	6,5	3
Ротавирусная инфекция	1105	5,8	4	3491	23,3	3	8661	65,5	1
Энтеровирусная инфекция	-	-	-	409	2,7	5	409	3,1	5
Норовирусная инфекция	-	-	-	0	0,0	7	469	3,5	4

Так если, с 1997 по 2008 ОКИ, вызванные возбудителями дизентерии, занимали первой ранговое место, то в период 2006 – 2014 годы шигеллезы уступили первое место ОКИ, вызванным ротавирусной инфекцией. Неизменным остается положения сальмонеллезной инфекции: на протяжении всего периода регистрации удельный вес данной инфекции в структуре всех установленных ОКИ занимает второе ранговое место. Существенным образом снижается ранговое значение экстенсивного показателя острого вирусного гепатита А: с 3 места в период 1997 – 2002 гг. до 6 рангового места в период 2009 – 2014 гг. и лептоспироза с 5 рангового места в период 1997 – 2002 гг. до 7 в период 2009 – 2014 гг.

При сравнении трех групп территорий, разделенных в зависимости от типа водоисточника установлено, что первые четыре ранговых места во всех группах занимают такие нозологии, как: энтеробиоз, ротавирусная инфекция, лямблиоз и сальмонеллезы соответственно (Таблица 2). На территориях имеющих смешанные или только подземные источники централизованного водоснабжения 5 ранговое место занимает аскаридоз, тогда как на территориях с поверхностными источниками централизованного водоснабжения данной инвазии отведено 8 ранговое место. Вместе с тем, на территориях с поверхностным источником водоснабжения удельный вес дизентерий занимает 5 ранговую позицию в структуре всех описываемых нозологий, для оставшихся двух групп территорий – 6 ранговое место. Также, на территориях с поверхностными водоисточниками более высокий ранг занимает норовирусная инфекция (6 ранговое место), в отличие от территорий с подземными и смешанным источниками водоснабжения, где удельному весу ОКИ, вызванных вирусом Норволк, отведено 8 ранговое место. Энтеровирусная инфекция занимает 7 ранговое место во всех территориальных группах. Не отличается распределение 9 и 10 ранговых мест во всех территориальных группах их занимает острый вирусный гепатит А и лептоспирозная инфекция.

#### **Заключение.**

Качество питьевой воды по микробиологическим показателям в подземных водоисточниках значительно лучше, чем качество питьевой воды поверхностных водоисточников Архангельской

области. Ранжирование территорий по микробиологическим показателям качества воды поверхностных водоемов позволило выявить наиболее неудовлетворительные территории области: города Архангельск, Новодвинск, Северодвинск, Котлас и Коряжма, а так же Верхнетоемский, Вельский, Приморский, Котласский и Устьянский районы. В качестве неблагоприятных территорий используемых для питьевого водоснабжения подземные источники можно отметить: Устьянский, Вилегодский, Лешуконский, Приморский, Каргопольский и Котласский районы.

В общей структуре острых кишечных инфекций на протяжении двадцатилетнего периода наблюдения наибольший удельный вес приобретает ротавирусная и норовирусная инфекция, вымещающая с первого рангового места дизентерии и острый вирусный гепатит А. При анализе территориального распределения экстенсивных показателей заболеваемости инвазиями и инфекциями, с возможным водным путем реализации механизма передачи, выявлены незначительные различия, для изучения которых необходим более глубокий и детальный статистический анализ.

#### Литература:

1. Якунин, А.В. Оценка загрязнения предприятиями – водопользователями реки Москвы в черте города: автореф. дисс. ... канд. техн. наук: 25.00.36 / Якунин Андрей Викторович. – М., 2002. – 23 с.
2. Наркайтис Л.И. Разработка системы оценки и анализа предвестников осложнения эпидемиологической ситуации при кишечных инфекциях, связанных с водным фактором: автореф. дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.30 / Наркайтис Лидия Игоревна. – Саратов, 2010. – 75 с.
3. Загайнова А.В., Рахманин Ю.А. Разработка подходов к оценке риска возникновения бактериальных кишечных инфекций, распространяемых водным путем //Мир науки, культуры, образования.- 2011. № 4-2. С. 268-273.
4. Руководство по обеспечению качества питьевой воды, 3-е (настоящее) издание - Режим доступа: [www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/ru/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/ru/).
5. Санитарные правила и нормы СанПиН 2.1.5.980-00 «2.1.5. Водоотведение населенных мест, санитарная охрана водных объектов. Гигиенические требования к охране поверхностных вод» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 22 июня 2000 г.) - М., 2000. - 18 с.

Таблица 2

Структура инфекций и инвазий, передающихся водным путем на территориях с различными источниками водоснабжения

2009-2014	на территориях с подземными источниками централизованного водоснабжения			на территориях с поверхностными источниками централизованного водоснабжения			на территориях с подземными и поверхностными источниками централизованного водоснабжения		
	абсолютные значения	удельный вес, (%)	РАНГ	абсолютные значения	удельный вес, (%)	РАНГ	абсолютные значения	удельный вес, (%)	РАНГ
Сальмонеллезы	239	3,7	4	2131	7,0	4	311	3,1	4
Острый вирусный гепатит А	8	0,12	9	92	0,3	9	7	0,1	9
Аскаридоз	165	2,6	5	320	1,055	8	275	2,7	5
Легтоспироз	4	0,06	10	26	0,1	10	2	0,02	10
Лямблиоз	456	7,1	3	4432	14,6	3	846	8,4	3
Энтеробиоз	4710	72,9	1	14089	46,5	1	7275	72,6	1
Дизентерия	35	0,5	6	681	2,2	5	141	1,4	6
Ротавирусная инфекция	807	12,5	2	6783	22,4	2	1071	10,7	2
Энтеровирусная инфекция	23	0,4	7	321	1,059	7	65	0,6	7
Норовирусная инфекция	17	0,3	8	423	1,4	6	29	0,3	8

## АСПЕКТЫ СЕЗОННОГО УЧАСТИЯ БЛОХ СУСЛИКОВ В ЭПИЗООТИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ЧУМЫ НА ТЕРРИТОРИИ СЕВЕРО-КАВКАЗСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА

Белявцева Л.И., Цапко Н.В., Давыдова Н.А.

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь

На большей части энзоотичной по чуме территории Северо-Кавказского Федерального округа в эпизоотическом процессе в качестве носителей и переносчиков возбудителя инфекции принимают участие суслики и их блохи. В Восточном Предкавказье на малом суслике паразитируют блохи пяти видов: *Neopsylla setosa setosa* Wagn., 1898; *Citellophilus tesquorum ciscaucasicus* Ioff, 1936; *Frontopsylla (Scalonnola) semura* Wagn. et Ioff, 1926; *Oropsylla idahoensis ilovaiskii* (Wagn. et Ioff, 1926); *Stenophthalmus (Euctenophthalmus) orientalis* Wagn., 1898. В Приэльбрусье, на горном суслике – блохи семи видов: *C. t. elbrusensis* Goncharov, 2011; *N. s. setosa*; *F. semura*; *O. i. ilovaiskii*; *Ct. orientalis*; *Ct. (Medioctenophthalmus) golovi golovi* Ioff et Tifl., 1930 и *Rhadinopsylla (Ralipsylla) li* Arg., 1941.

Зараженными возбудителем чумы находили имаго блох всех этих паразитов, однако основными переносчиками возбудителя в Восточном Предкавказье являются имаго *N. s. setosa* и *C. t. ciscaucasicus*, в Приэльбрусье – *C. t. elbrusensis* (*N. s. setosa* обитает только в восточной части Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы, где является дополнительным переносчиком). Случайными переносчиками в период обострения эпизоотической ситуации могут быть малочисленные как в Восточном Предкавказье так и Приэльбрусье блохи *F. semura* и *O. i. ilovaiskii*, а также эндемик высокогорий *R. li* [1].

Количественные и качественные показатели состояния популяций блох всех видов (такие как численность и возрастной состав имаго, состав по фазам развития, алиментарная и генеративная активность паразитов) значительно изменяются в течение года. Вследствие этого наиболее эффективное участие в эпизоотическом процессе, как блох являющихся основными переносчиками возбудителя чумы, так и блох других видов (способных к трансмиссии возбудителя чумы) возможно только в определенные фенологические периоды.

На момент выхода малого и горного сусликов из зимней спячки популяции блох, паразитирующих в их поселениях, представлены только имаго [2, 3]. Большинство среди них молодые особи, вышедшие из коконов или перед залеганием сусликов в спячку или весной в период активизации зверьков. Меньшую часть имаго составляют старые блохи, питавшиеся и размножавшиеся в предшествующем году. Алиментарная активность старых блох значительно выше, чем молодых, особенно в условиях низких температур ранней весны. В случае протекания в предшествующем году эпизоотии чумы, среди имаго, переживших зиму питавшимися, могут быть зараженные особи, пережившие зимний период в необитаемых (после гибели хозяев) гнездах. Контакт переносчиков с сусликами (весьма активными и подвижными в период гона) может привести к возникновению эпизоотии.

В этот период в эпизоотическом процессе в качестве случайных переносчиков возбудителя чумы могут принять участие блохи *F. semura* и *O. i. ilovaiskii* [2, 3]. На стадии имаго они существуют короткое время весной (2-3 месяца). В поселениях малого суслика имаго этих видов полностью исчезают к началу лета. В поселениях горного суслика единичные особи встречаются и летом.

В периоды беременности и выкармливания молодняка самками сусликов блохи, перезимовавшие на стадиях имаго и «имаго в коконе» стареют, и отмирают. Показатели численность блох снижаются. В гнездах, где зверьки постоянно живут в этот период (особенно в выводковых), происходит накопление паразитов, на преимагинальных фазах развития. Сусликам в этот период характерна привязанность к своим гнездам. Активность эпизоотического процесса снижается, эпизоотии носят локальный характер.

Начало выхода из коконов имаго 1-ой генерации у *C. t. ciscaucasicus* и *C. t. elbrusensis* совпадает по времени с расселением молодых зверьков. Повышение численности паразитов; широкий

разнос их по территории расселяющимися зверьками; повышение контактов грызунов с зараженными блохами, сохранившимися в норах, ставшими необитаемыми после гибели от чумы хозяев; повышение паразитарных контактов, как среди сусликов, так и между сусликами и грызунами других видов способствует развитию эпизоотического процесса. Пик активности эпизоотий в природных очагах чумы сусликового типа в Восточном Предкавказье и в Приэльбрусье совпадает с периодом расселения молодых зверьков и синхронным с ним периодом выхода из коконов имаго *C. t. ciscaucasicus* и *C. t. elbrusensis* 1-ой генерации [3, 4].

В Предкавказье период размножения особей 1-ой генерации *C. t. ciscaucasicus* продолжается до залегания малых сусликов в летне-осеннюю спячку, а преимагинальное развитие особей 2-ой генерации совпадает с периодом летне-осенней спячки малых сусликов, практически все они зимуют на стадии «имаго в коконе». В Приэльбрусье период размножения имаго *C. t. elbrusensis* 1-ой генерации продолжительнее (до середины сентября). Это обусловлено длительным сроком активной жизни горных сусликов. Молодые имаго *C. t. elbrusensis* 2-ой генерации начинают выходить из коконов в период обновления хозяевами зимовочных гнезд, при этом часть из них успевает приступить и к паразитированию. В случае протекания в это время эпизоотии чумы они имеют возможность заразиться, питаясь на больных сусликах.

У блох *N. s. setosa* (и в Предкавказье и в Приэльбрусье) отмечены основная и дополнительная генерации. Большинство особей основной генерации зимуют в коконах, однако часть имаго успевают выйти из коконов летом. Размножаясь, они дают начало дополнительной генерации. Поддержание непрерывного эпизоотического процесса на энзоотичных по чуме территориях Восточного Предкавказья возможно только совместным участием в нем блох *N. s. setosa* и *C. t. ciscaucasicus*, при котором имаго этих видов (вследствие различий их годовых циклов и фенологии) дополняют участие друг друга в эпизоотическом процессе. Что особенно важно в периоды сезонной депрессии численность имаго, наблюдаемые в популяциях этих паразитов.

Период подготовки популяций блох к зимнему гонотрофическому покою характеризуется постепенным снижением генеративной активности паразитов, затуханием эпизоотий среди сусликов. Во время периода зимнего гонотрофического покоя имаго блох характеризуются большой продолжительностью жизни. Заразившиеся в период эпизоотий имаго *C. t. ciscaucasicus* и *N. s. setosa* являются хранителями возбудителя чумы в течение зимнего межэпизоотического сезона [2, 3].

Блохи *R. li* в небольшом количестве обнаружены только высокогорьях Приэльбрусья. Экология и эпизоотологическое значение блох этого вида в очаге практически не изучена. Ввиду малочисленности паразита и ограниченности его ареала, эпизоотологическое значение *R. li* в очаге невелико.

#### Литература:

1. Природная очаговость чумы на Кавказе / А.И. Дятлов [и др.]. – Ставрополь, 2001. – 345с.
2. Белявцева, Л.И. Эпизоотологическая характеристика основных сезонных явлений в жизни блох горного суслика / Л.И. Белявцева // Журнал инфекционной патологии. – 2009. – Т.16, №3. – С. 70-71.
3. Белявцева, Л. И. Синхронность фенологии блох сусликов с фенологией их хозяев и проявлением эпизоотической активности природных очагов чумы Северного Кавказа / Л. И. Белявцева, Н. В. Цапко, Н. А. Давыдова // Материалы международной конференция «Фундаментальные и прикладные аспекты изучения паразитических членистоногих в XXI веке», памяти чл.-корр. РАН Ю.С. Балашова (г. Санкт-Петербург, 21-25 октября 2013 г.). – СПб.: ЗИН РАН, 2013. - С. 31-33.
4. Белявцева, Л.И. Динамика основных феноявлений в популяции блох *Citellophillus tesquorum ciscaucasicus* (Ioff, 1936) в природных очагах чумы Восточного Предкавказья и Приэльбрусья / Л.И. Белявцева // Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней: тезисы докладов международной научно-практической конференции (14-15 мая 2009 г., Новосибирск, Россия). - Новосибирск: Изд-во «ЦЭРИС», 2009. – С. 62-65.

## К ОЦЕНКЕ РОЛИ БЛОХ ГОРНОГО СУСЛИКА В ПОДДЕРЖАНИИ ЭПИЗООТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА НА ТЕРРИТОРИИ ЦЕНТРАЛЬНО-КАВКАЗСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА ЧУМЫ

Белявцева Л.И., Цапко Н.В., Давыдова Н.А.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь

Роль отдельных видов блох в поддержании эпизоотического процесса в природном очаге чумы оценивается по совокупности сведений, полученных при изучении образа жизни паразитов в природе, дополнив их результатами экспериментов в лаборатории. Наиболее значимыми показателями являются: способность имаго блох к заражению, хранению возбудителя чумы и передаче его здоровым зверькам; обитание вида в зоне природной очаговости чумы и паразитирование на основных ее носителях; наличие имаго блох в популяции в течение всего года; достаточно большая продолжительность жизни имаго; достаточно высокий уровень численности имаго блох в периоды повышения эпизоотической активности в очаге.

Исходя из вышеперечисленных показателей только один вид блох (из семи, паразитирующих на горном суслике (основном носителе возбудителя чумы в очаге) – *Citellophilus tesquorum elbrusensis* (Goncharov, 2011) полностью отвечает критериям для основного переносчика возбудителя чумы [1] на территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага.

В силу способности имаго блох этого вида к заражению, хранению возбудителя чумы и передаче его здоровым зверькам, особенностей распространения по ареалу хозяина, годового жизненного цикла, сезонных динамик численности и гонотрофической активности имаго *C. t. elbrusensis* способен самостоятельно, без участия других переносчиков, обеспечить постоянную циркуляцию возбудителя в очаге.

Обитает *C. t. elbrusensis* по всему ареалу горного суслика и является его специфическим паразитом; связано это с достаточно широким диапазоном гидротермических условий, пригодных как для метаморфоза, так и существования имаго этого паразита.

По всему ареалу хозяина *C. t. elbrusensis* доминирует среди блох других видов. В гнездах зверьков их доля среди имаго всех видов блох составляет 51,4-76,5 % [2, 3]. Вследствие достаточно выраженной у имаго *C. t. elbrusensis* приуроченности к шерсти хозяина высока их доля в сборах из шерсти сусликов (от 79,3 до 98,0 %) [3], что определяет ведущее значение блох этого вида в разносе инфекции по территории очага. Для имаго *C. t. elbrusensis* характерна миграционная активность, во входах в норы сусликов они составляют от 75,0 до 93,4 % [3]. Экспериментально доказана для имаго этого паразита способность к образованию блока «преджелудка» (до 23-35% зараженных особей) и передаче возбудителя чумы здоровым животным [4].

Изучение годового цикла *C. t. elbrusensis* показало, что имаго существуют круглогодично [5, 6]. Выход из коконов молодых блох первой генерации совпадает с началом периода повышения эпизоотической активности в очаге. Особи второй (массовой) генерации выходят из коконов и приступают к паразитированию в период подготовки зверьками гнезд к зимней спячке. Зараженные при питании на больных сусликах они являются хранителями возбудителя чумы в течение зимнего межэпизоотического периода.

Критериям для второстепенного переносчика возбудителя чумы [1] на территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага соответствует *Neopsylla setosa setosa* (Wagn., 1898).

Оценивая способность имаго этого паразита к заражению возбудителем чумы, хранению и передаче его здоровым зверькам В.С. Ващенко (1988) [7], относит блох *N. s. setosa* к категории высокоактивных переносчиков (в то время как *C. tesquorum* – к категории активных переносчиков). Экспериментально доказано, что от 35,8 до 87,5% зараженных возбудителем чумы имаго блох этого вида образуют блок «преджелудка» [8]. Однако по причине ограниченности ареала *N. s. setosa* (обитающего только в восточной части ареала хозяина), блохи этого вида не способны

самостоятельно (без основного переносчика – блох *C. t. elbrusensis*) обеспечить поддержание эпизоотического процесса на всей территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. Вместе с этим в горной степи и субальпийском поясе Восточного Приэльбрусья в гнездах хозяев доля имаго *N. s. setosa* среди блох всех видов достаточно высока и составляет 18,3-17,4% (соответственно) [3]. На этой территории блохи *N. s. setosa* относительно регулярно вовлекаются в эпизоотический процесс, в качестве второстепенного (дополнительного) переносчика [2].

Для имаго *N. s. setosa* характерна выраженная привязанность к гнездам своих хозяев (где они практически все и сосредоточены), в шерсти сусликов и во входах в их норы они единичны. Вследствие этого наиболее значима роль *N. s. setosa* в поддержании микроочаговости чумы, когда питавшиеся на больном суслике (на хозяине норы или на забежавшем в нее зверьке) зараженные блохи не разносятся по поселению, а остаются в гнезде, где произошло их инфицирование, создавая тем самым риск заражения для забегающих в эту нору здоровых сусликов. Однако роль в разносе инфекции по территории очага *N. s. setosa* значительно уступают основному переносчику возбудителя чумы – *C. t. elbrusensis*.

Критериям случайных переносчиков возбудителя чумы [1], которые способны к заражению и передаче возбудителя инфекции, но в силу особенностей распространения, численности, годового жизненного цикла, крайне редко вовлекается в эпизоотический процесс на территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы соответствуют паразитирующие на горном суслике блохи: *Frontopsylla (Scalopola) semura* Wagn. et Ioff, 1926, *Oropsylla idahoensis ilovaiskii* (Wagn. et Ioff, 1926) и *Rhadinopsylla (Ralipsylla) li* Arg., 1941.

В экспериментах единичные зараженные чумой имаго *F. semura* и *O. i. ilovaiskii* оказались способными к блокообразованию и к передаче возбудителя инфекции здоровым животным. Для *F. semura* доказана и «безблоковая» передача возбудителя [9, 10]. Однако учитывая, что имаго блох этих видов в природе встречаются только весной при очень низкой численности (причем *O. i. ilovaiskii* не на всей территории очага), эпизоотологическое значение их невелико. Только в случае возникновения в поселениях сусликов эпизоотий чумы в весенний период, они могут принимать участие в эпизоотическом процессе в качестве случайных переносчиков возбудителя инфекции [5].

Блохи *R. li* на территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы обнаружены только в высокогорьях [2, 3]. Экология этого паразита практически не изучена, экспериментальных исследований возможностей заражения и передачи возбудителя чумы блохами *R. li* из Приэльбрусья не проводилось. Тем не менее, подвиды *R. li*, обитающие в Средней Азии и Сибири выполняют определенную роль в эпизоотических процессах в природных очагах чумы, расположенных в этих регионах.

Ввиду ограниченности ареала (при низкой численности) эпизоотологическое значение *R. li* в очаге невелико.

Практически все питавшиеся на больном чумой суслике имаго блох *Ctenophthalmus (Medioctenophthalmus) golovi golovi* Ioff et Tifl., 1930 и *Ctenophthalmus (Euctenophthalmus) orientalis* Wagn. заражаются. На территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага от них неоднократно выделяли культуры возбудителя этой болезни [2]. Однако переносчиками чумы эти паразиты не являются, поскольку к образованию «чумного блока» и передаче возбудителя здоровым зверькам имаго этих видов не способны. Вместе с этим, учитывая высокую численность имаго *C. g. golovi* и *C. orientalis* на Центральном Кавказе [2, 3], следует считать целесообразным бактериологическое исследование питавшихся блох этих видов с целью выявления эпизоотийных территорий в очаге.

Видовые особенности экологии и фенологии блох, паразитирующих в поселениях горного суслика, различия в способности их имаго к заражению (при питании на больном чумой зверьке), длительному хранению и передаче возбудителя здоровым сусликам определяет особенности участия их в эпизоотическом процессе на территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы.

#### Литература:

1. Природные очаги Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири / Г.Г. Онищенко [и др.]. – М.: Медицина, 2004. – 192 с.
2. Природная очаговость чумы на Кавказе / А.И. Дятлов [и др.]. – Ставрополь, 2001. – 345с.
3. Закономерности распространения блох, обитающих в поселения горного суслика на территории Центрально-Кавказского природного очага чумы / Л.И. Белявцева [и др.] // Горные экосистемы и их компоненты: труды международной конференции. – М.: Т-во научных изданий КМК, 2007. – С. 98- 103.
4. Осипова, С.П. Ороли *Ceratophyllus tesquorum* в поддержании энзоотии чумы на Центральном Кавказе / С.П. Осипова, Ю.М. Елкин, Г.Н. Розанова // Особо опасные инфекции на Кавказе: тез. докл. IV краевой науч.-практ. конф. по природной очаговости, эпидемиологии и профилактике особо опасных инфекционных болезней. - Ставрополь, 1978. - С. 247-250.
5. Белявцева, Л.И. Фенология блох горного суслика в связи с их ролью в эпизоотиях чумы на Центральном Кавказе: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.09 /Л.И. Белявцева. - Ставрополь, 1999. - 22 с.
6. Никульшин, С.В. Основные черты годовых циклов блох (Aphaniptera) горного суслика в Баксанской долине. // Паразитология. – Ленинград, Наука, 1980. – Т. XIV. – С. 134-141.
7. Ващенко, В.С. Блохи – переносчики возбудителей болезней человека и животных / В.С. Ващенко. - Л.: Наука, 1988. - 160 с.
8. Флегонтова, А.А. Активность передачи чумы некоторыми видами блох / А.А. Флегонтова, Л.С. Малафеева // Особо опасные и природноочаговые инфекции. - М., 1962. - С. 27-36.
9. Князева, Т.В. К заражающей способности блох *Frontopsylla semura* Wagn. et Ioff, 1926 / Т.В. Князева, Л.Н. Величко // Эпизоотология и профилактика особо опасных инфекций в антропогенных ландшафтах. – Саратов, 1990. – С. 95-98.
10. Мокриевич, Н.А. К эпизоотологической роли блох *Oropsylla ilovaiskii* в Волго-Уральском пустынном очаге чумы / Н.А. Мокриевич, [и др.] // Эпидемиология и профилактика чумы и холеры. Саратов, 1983. С. 78-82.

## ОСНОВНЫЕ МЕРОПРИЯТИЯ ЭПИЗОТОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПОПУЛЯЦИЙ БЛОХ ГОРНОГО СУСЛИКА НА ТЕРРИТОРИИ ЦЕНТРАЛЬНО-КАВКАЗСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА ЧУМЫ

Белявцева Л.И., Цапко Н.В., Давыдова Н.А.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь

Эколого-эпизоотологический мониторинг состояния популяций блох, переносчиков возбудителя инфекции – раздел эпизоотологического обследования природных очагов чумы, входящего в общую систему эпиднадзора за особо опасными зоонозными инфекциями.

На территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы в поселениях горного суслика *Spermophilus musicus* Menetries, 1832 (основного носителя возбудителя чумы) паразитируют блохи семи видов: *Citellophilus tesquorum elbrusensis* (Goncharov, 2011) [12]; *Neopsylla setosa setosa* (Wagn., 1898), *Frontopsylla (Scalonnola) semura* Wagn. et Ioff, 1926, *Oropsylla idahoensis ilovaiskii* (Wagn. et Ioff, 1926), *Ctenophthalmus (Medioctenophthalmus) golovi golovi* Ioff et Tifl., 1930, *Ctenophthalmus (Euctenophthalmus) orientalis* Wagn., 1898 и *Rhadinopsylla (Ralipsylla) li* Arg., 1941.

Различия климатических условий в местах обитания блох на территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы, в совокупности с видовыми возможностями паразитов к существованию в этих условиях определяют различия распространения, численности и фенологии паразитов [1, 2]. Распространение паразитов по ареалу хозяина неравномерно. В зависимости от того, насколько параметры гидротермических условий в местах обитания сусликов

отвечают условиям, необходимым для успешного существования блох, ареалы отдельных видов этих паразитов могут, как совпадать с ареалами хозяев, так и существенно от них отличаться [1]. Сроки наступления основных фенологических явлений в популяциях блох, обитающих в разных частях ареалов хозяев, а также показатели сезонных динамик: численности и гонотрофической активности паразитов, возрастного состава существенно различаются [2]. Вследствие этого различно и участие блох в эпизоотическом процессе в качестве переносчиков возбудителя чумы на отдельных участках очаговой территории в Приэльбрусье [3, 4].

Таким образом, объективная оценка эпизоотической ситуации на территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы невозможна без регулярных наблюдений за эколого-эпизоотическим состоянием популяций блох на всех участках энзоотичной территории.

Для получения наиболее информативных сведений, позволяющих проследить сезонную динамику количественных и качественных изменений показателей эколого-эпизоотического состояния популяций блох, обследованием целесообразно охватывать основные сезонные периоды в жизни сусликов, с которыми синхронно совпадают и основные феноявления в жизни блох, паразитирующих в их поселениях [3, 4]. Такими являются:

- период гона и начала беременности самок сусликов и совпадающие с ним по времени периоды активизации имаго блох (после зимнего гонотрофического покоя) и вытлада особей, зимовавших на стадии «имаго в коконе»;
- период выкармливания самками сусликов молодняка, в течение которого отмечается период активного размножения блох, переживших зиму на стадиях имаго и «имаго в коконе» и преимагинального развития особей дочерней генерации;
- период расселения молодых зверьков и приуроченный к нему период выхода из коконов особей первой генерации блох *C. t. elbrusensis*;
- период обновления горными сусликами зимовочных гнезд перед залеганием в спячку, (в это время выходят из коконов и приступают к паразитированию молодые имаго *C. t. elbrusensis* второй генерации, более многочисленной, чем первая).

Для каждого из этих периодов необходимо устанавливать видовой состав, количественные и качественные показатели состояния популяций блох, регистрируя: обилие, доминирование паразитов (на зверьках, в норах и гнездах); отмечать физиологическое состояние и возрастной состав имаго.

Для выяснения особенностей образа жизни блох в конкретных климатических условиях мест обитания (что особенно важно для видов, имаго которых являются переносчиками возбудителя чумы в очаге - *C. t. elbrusensis* и *N. s. setosa*) следует регистрировать сроки наступления основных феноявлений в их жизни [3]. Среди них наиболее информативные это: активизация имаго после зимнего гонотрофического покоя; массовый вытлад блох, зимовавших на стадии «имаго в коконе»; начало миграции имаго; появление первых самок с увеличенными ооцитами и массового количества самок со зрелыми ооцитами; появление особей старших возрастных групп и их отмирание; появление массового количества личинок; окончание периода активного размножения; начало периода гонотрофического покоя.

При проведении эпизоотологического обследования, и анализе полученных материалов важно учитывать видовые особенности годовых жизненных циклов блох в климатических условиях конкретных участков очаговой территории (это: число генераций, сроки завершения метаморфоза и массового выхода из коконов имаго каждой из них; сроки их паразитирования, размножения и отмирания), отмечая при этом синхронность сезонных явлений в популяциях паразитов и их хозяев с проявлением эпизоотической активности чумы на обследуемой территории.

Для основного переносчика возбудителя чумы – блох *C. t. elbrusensis* (и дополнительного - *N. s. setosa*, в Восточном Приэльбрусье), важно отмечать такие особенности образа жизни, которые доказывают возможность заражения их имаго (при питании на больных чумой грызунах в период протекания эпизоотий), способность зараженных особей к длительному хранению возбудителя инфекции в своем организме и передачи его здоровым зверькам. Для этого следует регистрировать совпадение сроков массового выхода имаго из коконов с периодом протекания эпизоотий, алиментарную активность переносчиков возбудителя в этот период, продолжительность жизни

имаго и способность зараженных чумой (в период эпизоотии) блох, пережить зимний межэпизоотический сезон [5, 6].

Литература:

1. Закономерности распространения блох, обитающих в поселениях горного суслика на территории Центрально-Кавказского природного очага чумы / Л.И. Белявцева [и др.] // Горные экосистемы и их компоненты: труды международной конференции. – М.: Т-во научных изданий КМК, 2007. – С. 98- 103.

2. Белявцева, Л.И. Фенология блох горного суслика в связи с их ролью в эпизоотиях чумы на Центральном Кавказе: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.09 /Л.И. Белявцева. - Ставрополь, 1999. - 22 с.

3. Белявцева, Л.И. Эпизоотологическая характеристика основных сезонных явлений в жизни блох горного суслика / Л.И. Белявцева // Журнал инфекционной патологии. – 2009. – Т.16, №3. – С. 70-71.

4. Белявцева, Л. И. Синхронность фенологии блох сусликов с фенологией их хозяев и проявлением эпизоотической активности природных очагов чумы Северного Кавказа / Л. И. Белявцева, Н. В. Цапко, Н. А. Давыдова // Материалы международной конференция «Фундаментальные и прикладные аспекты изучения паразитических членистоногих в XXI веке», памяти чл.-корр. РАН Ю.С. Балашова (г. Санкт-Петербург, 21-25 октября 2013 г.). – СПб.: ЗИН РАН, 2013. - С. 31-33.

5. Белявцева, Л.И. Динамика основных феноявлений в популяции блох *Citellophillus tesquorum ciscaucasicus* (Ioff, 1936) в природных очагах чумы Восточного Предкавказья и Приэльбрусья / Л.И. Белявцева // Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней: тезисы докладов международной научно-практической конференции (14-15 мая 2009 г., Новосибирск, Россия). - Новосибирск: Изд-во «ЦЭРИС», 2009. – С. 62-65.

6. Белявцева, Л.И. Динамика основных феноявлений в популяции блох *Neopsylla setosa setosa* (Wagn., 1898) в природных очагах чумы Восточного Предкавказья и Приэльбрусья / Л.И. Белявцева // Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней: тезисы докладов международной научно-практической конференции (14-15 мая 2009 г., Новосибирск, Россия). - Новосибирск: Изд-во «ЦЭРИС», 2009. – С. 65- 67.

## **ПРИМЕНЕНИЕ СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ В АНАЛИЗЕ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Бутакова Л.В., Троценко О.Е., Сапега Е.Ю.**

*ФБУН «Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»  
Роспотребнадзора, Хабаровск*

Прогнозирование инфекционной заболеваемости является одним из важнейших вопросов эпидемиологии, необходимым для рационального планирования профилактических и противоэпидемических мероприятий [1,2,3]. Широкая циркуляция энтеровирусов среди населения Дальневосточного Федерального округа (ДФО), контаминация ими объектов окружающей среды, приграничное расположение отдельных территорий ДФО с Китайской Народной Республикой (КНР) создают благоприятные условия для обострения эпидемиологической ситуации и возникновения вспышечной заболеваемости, в том числе обусловленной трансграничным завозом высокопатогенных штаммов. Анализ заболеваемости энтеровирусной инфекцией (ЭВИ) и составление прогнозов способствуют своевременной разработке административных, лечебно-профилактических и охранных мер по сдерживанию эпидемического процесса.

**Цель исследования:**

Составить прогноз заболеваемости ЭВИ на 2016 год для приграничных с Китайской Народной Республикой (КНР) территорий ДФО – Хабаровского и Приморского краев, Еврейской Автономной области (ЕАО) и Амурской области.

**Материалы и методы:**

Для анализа эпидемиологической обстановки по ЭВИ были использованы данные форм государственного статистического наблюдения №№ 1,2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях», № 23-09 «Сведения о вспышках инфекционных заболеваний», материалы Управлений Роспотребнадзора и Центров гигиены и эпидемиологии субъектов ДФО, научно-аналитические отчеты Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусной инфекции ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора.

Составление прогнозов заболеваемости энтеровирусной инфекцией на будущий год для выбранных территорий осуществлялось с помощью метода краткосрочного прогнозирования [3]. Для этого проводили выравнивание показателей фактической заболеваемости, определяли темпы роста или снижения, средний, минимальный и максимальный прогностические уровни. Выраженность тенденции оценивали по следующим критериям: при темпе роста (снижения) от 0 до  $\pm 1\%$  – заболеваемость стабильная; от  $\pm 1,1$  до  $\pm 5\%$  – тенденция динамики заболеваемости умеренная; от  $\pm 5,1$  и более тенденция выраженная (знак  $\pm$  указывает направленность тенденции).

Для оценки текущей эпидемиологической ситуации во время сезонного подъема заболеваемости энтеровирусной инфекцией использован метод скользящей медианы [6]. По результатам вычислений, проведенных по данной методике, строился график, на который наносили показатели прогностических уровней (минимальный, медианный, максимальный эпидемические пороги) и показатели заболеваемости за текущий анализируемый период. В случае, если текущий уровень заболеваемости оказывался ниже расчетного минимального уровня, то эпидемиологическая ситуация оценивалась как благополучная; выше – как удовлетворительная. При превышении медианного уровня ситуация рассматривалась как неустойчивая, а при превышении максимального уровня – как неудовлетворительная.

**Результаты и обсуждение:**

Дальневосточный Федеральный округ Российской Федерации включает 9 административных образований, из них в 8 ежегодно регистрируется от 500 до 3 тыс. случаев ЭВИ (8,9-54,0 случая на 100 тыс. нас.). В 2015 году в ДФО было зарегистрировано 1858 случаев ЭВИ, показатель заболеваемости составил 29,9 на 100 тыс. населения, что на 2,8 % выше по сравнению с 2014 г., в котором данный показатель был равен 27,1 на 100 тыс. населения.

Анализ проявлений эпидемического процесса ЭВИ в ДФО проводился с учетом приграничного расположения некоторых субъектов (в частности Хабаровский и Приморский края, ЕАО, Амурская область) с КНР, где наблюдается ежегодный подъем заболеваемости ЭВИ с высоким уровнем летальных исходов [4,5]. Большое количество трудовых мигрантов и развитые туристические связи способствуют трансграничному попаданию на территории ДФО штаммов энтеровирусов, к которым у населения отсутствует иммунитет, что в свою очередь ведет к ухудшению эпидемиологической ситуации и возникновению вспышек.

Необходимость своевременного реагирования санитарно-эпидемиологической службы и принятия оперативных мер при напряженной эпидобстановке обуславливает важность составления прогнозов заболеваемости ЭВИ [1,2,3].

В результате проведенных подсчетов (Табл.1.) по методу краткосрочного прогнозирования, описанного в методических рекомендациях под редакцией М.И. Петрухиной и Н.В. Старостиной (2006), установлено, что в 2016 году в Хабаровском крае будет наблюдаться умеренная динамика роста заболеваемости ЭВИ, темп роста составит 1,2 %, средний прогностический уровень заболеваемости ЭВИ – 75,5 на 100 тыс. нас. В то же время заболеваемость серозно-вирусным менингитом (СВМ) будет снижаться, средний показатель заболеваемости СВМ среди совокупного населения края может достигнуть 25,5 случаев на 100 тысяч населения, прогнозируемый темп снижения заболеваемости составит -4,5%, что свидетельствует об относительном благополучии эпидемической ситуации по СВМ.

Таблица 1.

## Краткосрочный прогноз заболеваемости для приграничных с КНР территорий ДФО

Территории	Прогностические показатели заболеваемости в 2016 г. (на 100 тыс.нас.)			Темп роста (%)	Показатель фактической заболеваемости в 2015 году
	Средний	Максимальный	Минимальный		
Хабаровский край	75,5	98,9	41,4	+1,2	105,8
ЕАО	43,1	53,7	36,0	+6,0	61,4
Приморский край	1,7	2,6	1,1	-9,3	1,87
Амурская область	7,3	9,5	5,1	+14,7	3,09

Краткосрочный прогноз заболеваемости также был составлен для тех районов и городов Хабаровского края, в которых ежегодно наблюдаются случаи энтеровирусной инфекции (Табл. 2.). Согласно полученным данным, в 4 районах (Хабаровский, Комсомольский, Амурский и Нанайский) и городе Хабаровске прогнозируется умеренная тенденция к снижению заболеваемости ЭВИ (от -2,2 до -3,5 %), в Солнечном районе – выраженная тенденция к снижению (-15,9%). В г. Комсомольске-на-Амуре ожидается заболеваемость не выше уровня предыдущего года (темп роста составит + 0,1%).

Таблица 2.

## Краткосрочный прогноз заболеваемости для отдельных районов Хабаровского края

территории	Прогностические показатели заболеваемости на 2016 г. (на 100 тыс.нас.)			Темп роста (%)	Показатель фактической заболеваемости в 2015 году
	Средний	Максимальный	минимальный		
г. Хабаровск	75,5	116,7	44,0	-1,9	75,7
Хабаровский район	72,1	146,2	40,3	-3,5	72,9
г. Комсомольск-на-Амуре	112,2	163,1	61,4	+0,1	249,9
Комсомольский район	55,1	86,6	23,6	-2,2	192,5
Амурский район	21,3	41,9	0,7	-5,5	150,4
Нанайский район	87,6	163,5	37,1	-3,3	189,5
Солнечный район	2,8	21,3	5,1	-15,9	169,6
Хабаровский край	75,5	98,9	41,4	+1,2	105,8

В Еврейской Автономной области и Амурской области по результатам краткосрочного прогнозирования будет наблюдаться дальнейший рост заболеваемости энтеровирусной инфекцией с показателями темпа роста +6,0 % и +14,7% соответственно. Максимальные прогностические показатели при этом могут составить 53,7 на 100 тыс. нас. в ЕАО и 9,5 на 100 тыс. нас. в Амурской области. Полученные данные свидетельствуют о необходимости настороженного внимания как эпидемиологов, так и клиницистов, ввиду возможности возникновения вспышечных очагов.

В Приморском крае можно ожидать снижение заболеваемости с выраженной тенденцией до -9,3% и средним прогностическим показателем 1,7 на 100 тыс. нас., что соответствует устойчивой

эпидемиологической ситуации в данном регионе, которая наблюдается с 2009 года.

Не представлялось возможным выполнить прогноз по СВМ для ЕАО, Амурской области и Приморского края в связи с низкими показателями заболеваемости данной клинической формой. Среди населения этих территорий основными формами ЭВИ являются герпангина, малая болезнь и энтеровирусная экзантема.

Доступным и достаточно информативным методом вычисления прогностических уровней является метод скользящей медианы (Рис.1, 2). Он позволяет оценивать текущую эпидемиологическую ситуацию по оперативным данным и незамедлительно принимать соответствующие управленческие решения.

Как видно на рисунке 1, подъем заболеваемости в г. Хабаровске начался на 27 неделе 2015 года и плавно нарастал до 31 недели. На 32 неделе количество заболевших превысило медианный прогностический уровень, что свидетельствовало о возникновении неустойчивой эпидемиологической ситуации в сезон ЭВИ 2015 года, которая оставалась таковой до 43 недели. Наибольшее число заболеваний было зарегистрировано на 34 неделе (88 человек), когда был превышен максимальный эпидемический порог, эпидобстановка расценивалась как неудовлетворительная. Далее заболеваемость снижалась до 37 недели, на 38 неделе возник новый незначительный подъем заболеваемости, вероятно обусловленный началом учебного года и расширением контактов среди лиц школьного возраста. С 39 недели заболеваемость продолжала снижаться, пока не достигла минимального уровня. Длительность подъема заболеваемости ЭВИ в 2015 году составила 16 недель (с 27 недели по 43 неделю). Показатель фактической заболеваемости в 2015 году был равен 75,7 на 100 тыс. нас.

В г. Комсомольске-на-Амуре (Рис.2.) подъем заболеваемости ЭВИ начался с 29 недели 2015 года. Пик заболеваемости отмечен на 32 неделе с числом заболевших 107 человек. Длительность подъема заболеваемости составила 14 недель (с 29 недели по 43 неделю). Текущие показатели заболеваемости значительно превысили максимальный прогностический порог, что свидетельствовало о неудовлетворительной эпидемиологической ситуации, которая была связана с появлением очагов вспышечной заболеваемости СВМ, вызванной циркуляцией высокопатогенного штамма энтеровируса ЕСНО-30. Показатель фактической заболеваемости в г. Комсомольске-на-Амуре в 2015 году был равен 249,9 на 100 тыс. нас. Своевременное проведение комплекса противоэпидемических мероприятий способствовало снижению количества заболеваний после 35 недели.

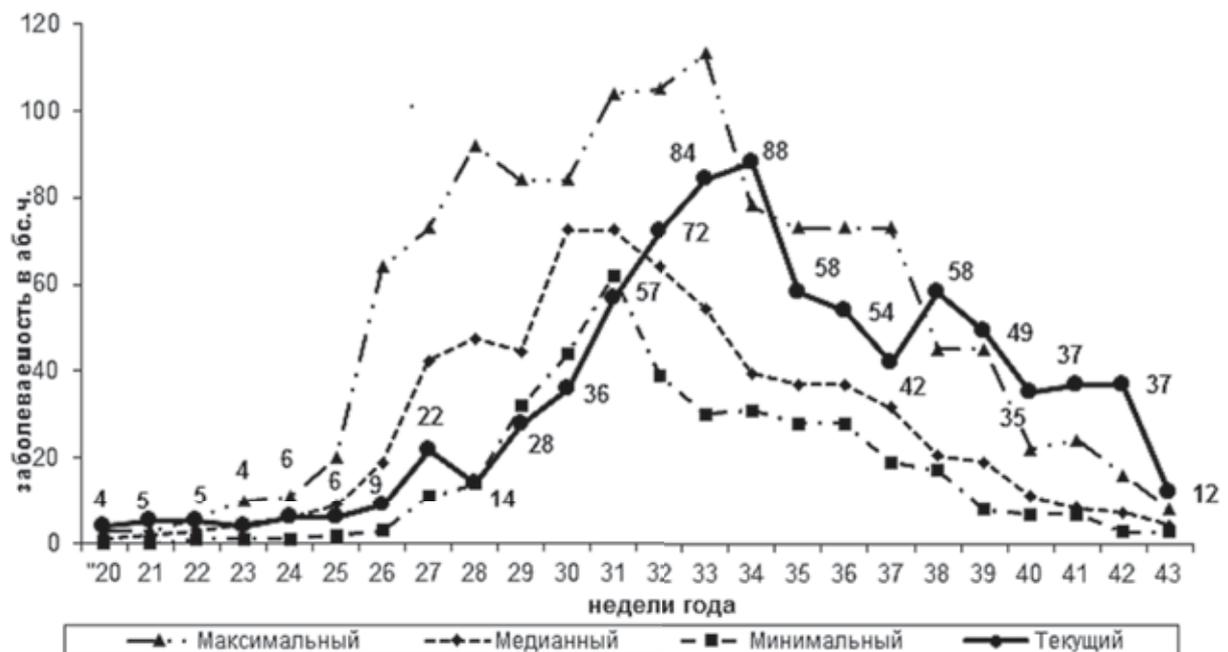


Рис. 1. Текущий и прогностический уровни заболеваемости ЭВИ в г. Хабаровске в 2015 году.

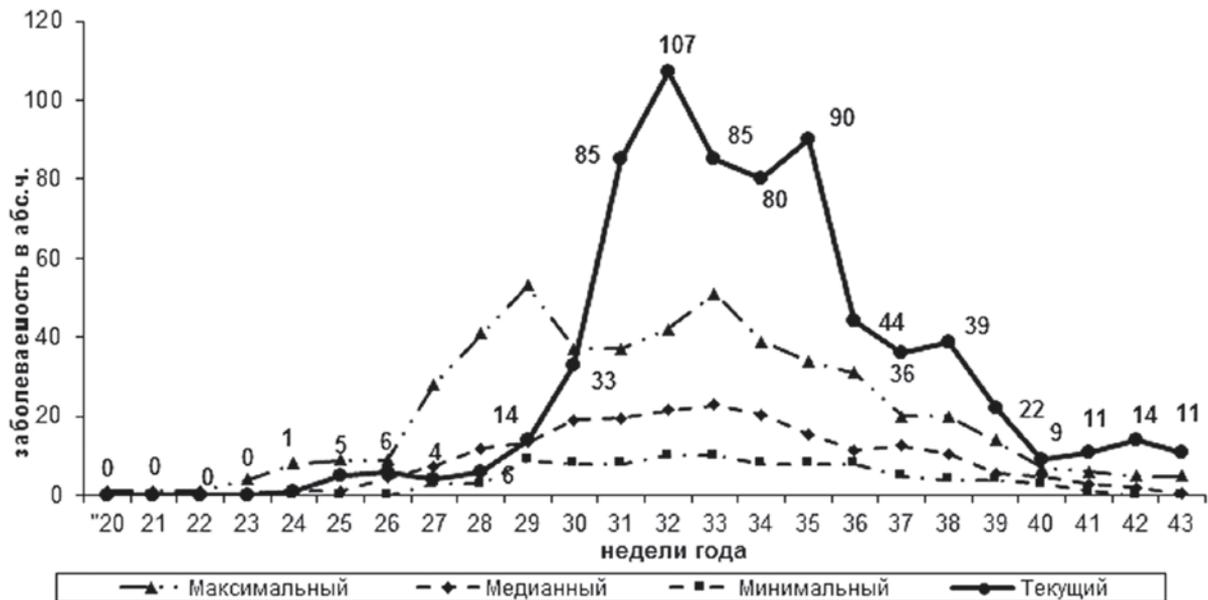


Рис. 2. Текущий и прогностический уровни заболеваемости ЭВИ в г. Комсомольске-на-Амуре в 2015 году.

#### Выводы:

Применение статистических методов прогнозирования в анализе заболеваемости энтеровирусной инфекцией является важной составляющей эпидемиологического надзора и позволяет решать следующие задачи: выявлять тенденции в динамике эпидемического процесса, проводить оценку эпидемиологической ситуации, принимать соответствующие ей управленческие решения по разработке и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, а, в случае необходимости, осуществлять их корректировку.

#### Литература:

1. Савилов, Е.Д. Эпидемиологический анализ: Методы статистической обработки материала / Е.Д. Савилов, В.А. Астафьев, С.Н. Жданова, Е.А. Заруднев. – Новосибирск: Наука-Центр, 2011. – 156 с.
2. Троценко, О.Е. и др. Прогнозирование проявлений эпидемического процесса энтеровирусной инфекции в Дальневосточном Федеральном округе Российской Федерации / О.Е. Троценко, Е.Ю. Сапега, Е.Б.Ежлова [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – №10 (271). – С. 38-43.
3. Петрухина, М.И. Статистические методы в эпидемиологическом анализе / М.И. Петрухина, Н.В. Старостина. – Москва, 2006. – 99с.
4. Троценко, О.Е. и др. Энтеровирусные инфекции на приграничных территориях Российской Федерации и Китайской Народной Республики / О.Е. Троценко, О.П. Курганова, Т.А. Зайцева [и др.] // Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: Материалы международной конференции под ред. А.Ю. Поповой, В.В. Кутырева. – Москва, 2015. – С. 379-383.
5. Троценко, О.Е. Использование научного потенциала в международном сотрудничестве России и Китая по вопросам противодействия эпидемическому распространению энтеровирусных инфекций / О.Е. Троценко, О.П. Курганова, Т.А. Зайцева [и др.] // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2015. - №28. – С. 6-12.
6. Бессмертный, Б.С. Статистические методы в эпидемиологии / Б.С. Бессмертный, М.Н. Ткачева. – М.: Медгиз, 1961. – 106с.

## РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ВАРИАНТА ВИРУСА ЕСНО30 E30h/2013RU-1 В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2014-2015гг.

**Голицына Л.Н., Зверев В.В., Сашина Т.А., Кашников А.Ю., Епифанова Н.В.,  
Новикова Н.А.**

*ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной  
Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

Вирус ЕСНО30 (вид *Enterovirus B*, род *Enterovirus*, сем. *Picornaviridae*) является наиболее частым возбудителем энтеровирусного менингита. На протяжении двух последних десятилетий этот вирус становился причиной вспышек серозного менингита по всему миру. Именно с ним был связан значительный подъем заболеваемости ЭВИ в Российской Федерации в 2013 г. [1, 2].

В 2013 г. вирус ЕСНО30 составил 43,37% типированных в наших исследованиях штаммов неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ) и был выявлен в материале больных энтеровирусной инфекцией, собранном на территории 32-х субъектов Центрального, Южного, Северо-Западного, Приволжского, Сибирского и Уральского федеральных округов РФ [2]. При этом наибольшее распространение возбудитель получил на территории Европейской части России (28 субъектов). Установлено, что подавляющее большинство идентифицированных штаммов вируса ЕСНО30 (97,80 % – 355 штаммов из 31-го субъекта РФ) относилось к генотипу h по классификации J. Bailly с соавторами [3]; доминировавший субтип, проявивший родство с современными китайскими штаммами, был обозначен нами как E30h/2013RU-1. В единичных случаях были идентифицированы вирусы ЕСНО30 генотипов f и a. Далее было показано, что предполагаемый предок эпидемического варианта вируса ЕСНО30 был занесен на территорию РФ, в период 2009-2011 гг., подъему заболеваемости ЭВИ в 2013 г. предшествовала скрытая циркуляция этого вируса [4].

В 2014 г. вирус ЕСНО30 был обнаружен на 12-ти территориях, активность его циркуляции в большинстве субъектов РФ значительно снизилась, за исключением Астраханской области, где наблюдался подъем заболеваемости серозным менингитом. Штаммы вируса ЕСНО30 составили 13,61% (55 штаммов) от всех типированных НПЭВ.

В 2015г. высокая заболеваемость серозным менингитом и энтеровирусной инфекцией на ряде территорий РФ вновь была связана с вирусом ЕСНО30. В отличие от 2013 г., этот вирус был выявлен преимущественно в субъектах Сибирского федерального округа (Алтайский и Красноярский край, Кемеровская, Омская, Томская и Новосибирская области). На Европейской территории России он вызвал подъем заболеваемости серозным менингитом в Удмуртской Республике, на дальнем Востоке – в Комсомольске на Амуре. Следует отметить, что в 2015 г. высокая заболеваемость, обусловленная вирусом ЕСНО30, наблюдалась на тех территориях, где в ближайшем прошлом его циркуляция не фиксировалась. В целом вирус ЕСНО30 был выявлен у больных ЭВИ на территории 16-ти субъектов, его штаммы составили 24,4% (89 штаммов) от всех типированных НПЭВ.

В результате филогенетического анализа было установлено, что все, идентифицированные в 2014 г., и подавляющее большинство (88 из 89 штаммов) – в 2015 г., штаммов вируса ЕСНО30 относились к эпидемическому варианту E30-h/2013RU1 (Рис.). Один из штаммов вируса ЕСНО30, идентифицированных в 2015 г., относился к генотипу f. На дендрограмме видно, что последовательности штаммов вируса ЕСНО30, выявленных в РФ в 2014-2015 гг. сформировали монофилетические кластеры с последовательностями российских штаммов, циркулировавших в 2013 г., отдельно от последовательностей родственных китайских штаммов 2012-2013 гг. Этот факт свидетельствует о том, что штаммы вируса ЕСНО30 генотипа h, идентифицированные в РФ в 2014-2015 гг. являются прямыми потомками российского геноварианта вируса ЕСНО30 – E30h/2013RU-1, вызвавшего подъем заболеваемости в 2013 г.

Таким образом, высокая заболеваемость энтеровирусной инфекцией и серозным менингитом в отдельных субъектах РФ в 2014-2015 гг. была связана с продолжившимся распространением эпидемического варианта вируса E30h/2013RU-1.

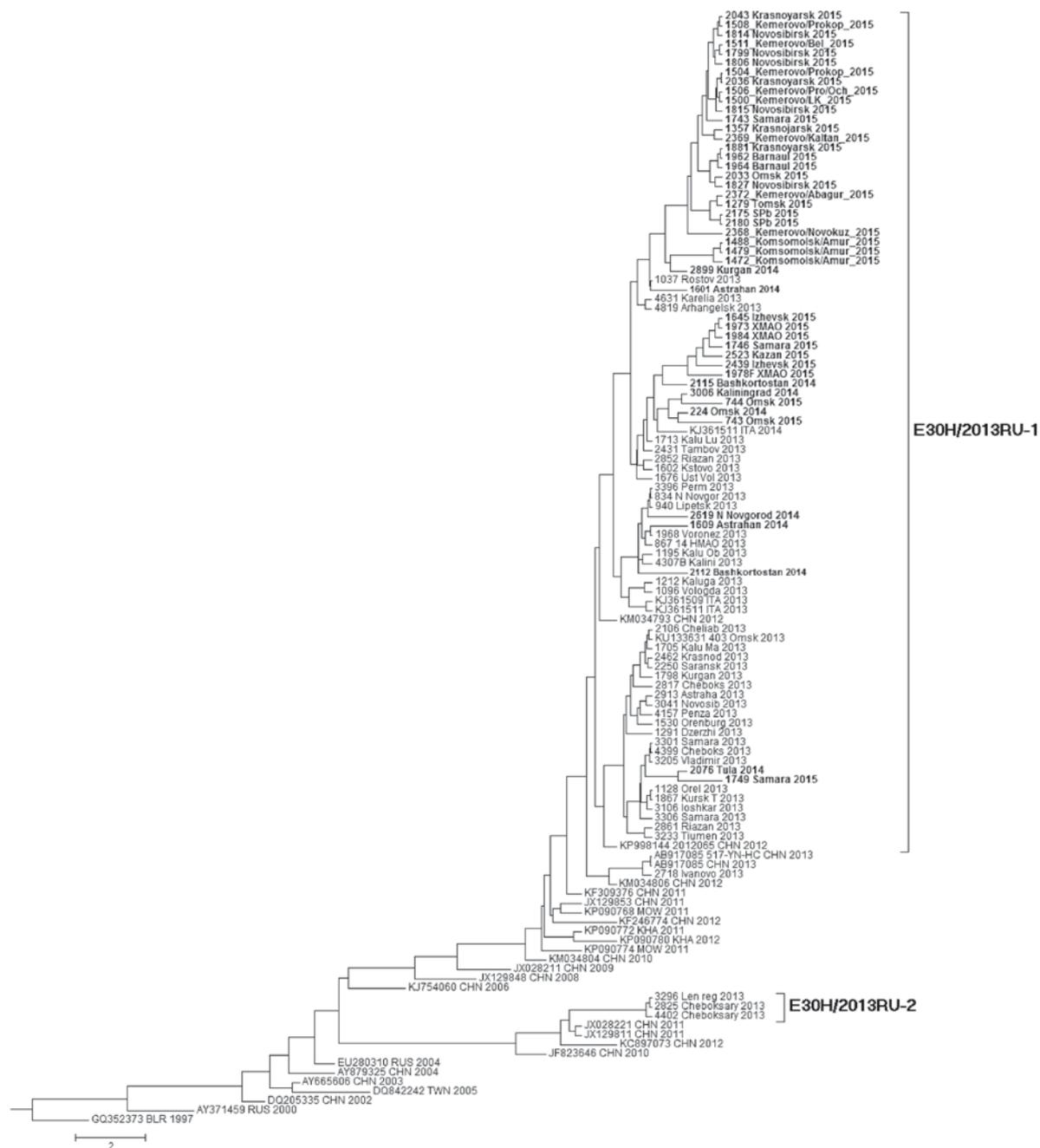


Рисунок. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа частичной (324 н.о.) нуклеотидной последовательности области VP1 генома штаммов вируса ЕСНО30 генотипа h, с использованием алгоритма Markov chain Monte Carlo, представленного в версии Beast v1.8.1. Жирным шрифтом выделены штаммы, идентифицированные в 2014-2015 гг.

#### Литература:

1. Морозова, Н.С. Энтеновирусная (неполио) инфекция в Российской Федерации в сезон 2013 года / Н.С.Морозова, О.П.Чернявская, Ю.М.Михайлова, Н.А.Новикова, Л.Н.Голицына, В.В.Зверев, С.Г.Фомина // Здоровье населения и среда обитания. Ежемесячный информационный бюллетень. - 2014. - N 10(259). - С.34-37
2. Голицына, Л.Н. Молекулярная характеристика эпидемического варианта вируса ЕСНО30-2013 / Л.Н.Голицына, Н.А.Новикова, С.Г.Фомина, О.В.Парфенова, Н.В.Епифанова, В.В.Зверев, Л.Б.Луковникова, О.В.Морозова, Т.А.Сашина, Е.И.Ефимов // Сборник трудов VIII Всероссийской

научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014». Под ред. В.И.Покровского.- М. 2014. - Т.1. - С.416-417.

3. Bailly J.L. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene / J.L. Bailly, A. Mirand, C. Henquell, C. Archimbauda, M. Chambona, F. Charbonnea, O. Traorïa, H. Peigue-Lafeuille // *Infect. Genet. Evol.* - 2009. - Vol. 9. - P. 699-708.

3. Голицына, Л.Н. Эпидемические варианты неполиомиелитных энтеровирусов в России / Л.Н.Голицына, В.В.Зверев, О.В.Парфенова, Н.А.Новикова// *Медицинский альманах* – 2015. - N 5(40). - С. 136-140

## **ВИДОВОЕ И ТИПОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АДЕНОВИРУСОВ, ВЫЯВЛЯЕМЫХ У ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ**

**Епифанова Н.В., Галиничева Е.К., Зверев В.В., Кашников А.Ю., Новикова Н.А.**  
*ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

### **Введение.**

Аденовирусы человека (Human adenoviruses - HAdV) – икосаэдрические, не имеющие оболочки вирусы, геном которых представлен линейной двухцепочечной ДНК, относятся к роду *Mastadenovirus* семейства *Adenoviridae*. В настоящее время HAdV разделяют на семь видов – A, D, C, D, E, F, G, включающих 71 серотип. Принадлежность аденовируса к виду и серотипу, определяемая иммунологическими методами, хорошо коррелирует с особенностями первичной структуры участков генома, кодирующих капсидные белки (гексона, основания пентона и фибриллы), и может быть установлена молекулярно-генетическими методами [1, 2]. Аденовирусная инфекция обуславливает широкий спектр клинических проявлений, одним из которых является воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта. К аденовирусам, ответственным за развитие этой патологии относят, так называемые, «кишечные» аденовирусы вида F (типы 40 и 41), впервые обнаруженные в 1975 году, а также открытый в 2007 году и редко встречающийся аденовирус вида G (тип 52). Однако при изучении острых кишечных инфекций (ОКИ) часто выявляются и аденовирусы других видов (для обзора см. [3]).

В наших предыдущих исследованиях, проведенных в 2009-11 гг. было показано, что HAdV-F идентифицируются только у трети аденовирус-инфицированных больных с ОКИ. В 31,3% случаев у детей обнаруживается инфекция аденовирусами HAdV-C (типы 1 и 2), протекающая с поражением желудочно-кишечного тракта, а также с сочетанным поражением желудочно-кишечного и респираторного трактов [4, 5]. Целью данной работы явилось изучение видового и типового разнообразия аденовирусов, выявляемых у детей, госпитализированных в кишечное отделение одного из детских инфекционных стационаров Нижнего Новгорода в 2011-15 гг.

### **Материалы и методы.**

Материалом для исследования служили образцы фекалий детей с ОКИ. ДНК аденовирусов в фекалиях выявляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием лабораторного варианта постановки реакции с применением универсальных для всех аденовирусов праймеров [1]. Для специфической индикации HAdV-F использовали праймеры, предложенные Xu W. и соавт. [1]. Для обнаружения HAdV-C нами разработаны видоспецифичные праймеры, фланкирующие фрагмент ДНК, соответствующий участку гена белка фибриллы аденовирусов. При амплификации серотипового участка генома для его секвенирования применяли праймеры, фланкирующие гипервариабельный регион 7 (HVR-7) гена гексона аденовируса [2]. Последовательности праймеров, использованных в работе и размеры получаемых продуктов амплификации представлены в таблице (Табл. 1). Использовали реагенты для различных этапов ПЦР-анализа производства ЦНИИЭ (Москва) и ООО «НПФ Синтол» (Москва). Праймеры синтезировали в ООО «НПФ Синтол» (Москва). Продукты амплификации визуализировали мето-

дом электрофореза в агарозном геле. Секвенирование проводили с использованием генетического анализатора Beckman Coulter CEQ8000 («Beckman Coulter», США) и набора реагентов DTCS Quick Start Kit согласно рекомендациям производителя.

Таблица 1.

Праймеры, использованные в работе

Праймер	Последовательность	Полярность	Ген	Размер фрагмента (п.н.)	Ссылка	Примечание
Ad1 Ad2	TTCCCATGGCICAYAACAC* CCCTGGTAKCCRATRTTGTA	+ -	гексон	482	[1]	для выявления аденовирусов
AdF1 AdF2	ACTTAATGCTGACACGGGCAC TAATGTTTGTGTTACTCCGCTC	+ -	фибрилла	541 (тип 40) 586 (тип 41)	[1]	для идентификации HAdV-F
AdC1 AdC2	ATGAARCGCGCMAGACCGTCT GGGGGCCTGATGTTTGCAGGGC	+ -	фибрилла	346	Данное исследование	для идентификации HAdV-C
Ad st1 Ad st2	CTGATGTACTACAACAGCACTG GCAACATGGG GCGTTGCGGTGGTAAATG GGTTTACGTTG TCC	+ -	гексон	608-632 для разных серотипов	[2]	для амплификации серотипового участка генома аденовирусов

\*R: A/G; Y: C/T; K: G/T; W: A/T; S: C/G; M: A/C; N – A/C/G/T; I–A/G/T

Выравнивание нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ осуществляли с помощью программного обеспечения MEGA, версия 6.1 [6]. Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности аденовирусов, имеющиеся в базах данных GenBank. Их номера указаны в названиях изолятов на филогенетическом дереве. Филогенетическое дерево построено методом объединения ближайших соседей (Neighbor-joining) с использованием двухпараметрической модели Kimura. Достоверность топологии филограмм оценивали методом повторных выборок на основании анализа 1000 псевдореплик. На филограмме указывали статистические индексы поддержки более 70.

Электрофорез ампликонов проводили в полиакриамидном геле (ПААГ) в системе буферных растворов Laemmli в 3%-ном концентрирующей и 10%-ном разделяющем гелях [7].

**Полученные результаты.**

При обследовании 4779 детей, госпитализированных в инфекционный стационар с июля 2011 по июнь 2015 гг. аденовирусы были выявлены в 416 случаях, что составило 8,7% от числа обследованных.

Проведена дифференциация выявленных аденовирусов на виды с использованием праймеров, специфических для видов F и C (Табл. 2). Отмечено достоверное увеличение частоты выявления аденовирусов в сезон 2014-15 гг. по сравнению с предыдущими (с 7,7 до 11,1%,  $p < 0,05$ ), причем, как видно из таблицы, - за счет увеличения доли HAdV-C, которая составляла в разные эпидсезоны от 41,8 до 51,2%. Доля HAdV-F колебалась от 15,3 до 29,4%, составив в среднем 20,2% от числа обнаруженных аденовирусов. В небольшом проценте случаев наблюдалась двой-

ное инфицирование аденовирусами видов F и C. Около трети изолятов не типировались используемыми праймерами.

Таблица 2.

Выявление и дифференциация аденовирусов на виды F и C у больных с ОКИ в Нижнем Новгороде в 2011-2015 гг.

Эпид-сезон	Кол-во обследованных больных	Частота обнаружения аденовирусов, %	Доля аденовирусов различных видов, % n=416			
			HAдV-F	HAдV- C	HAдV-F+C	Другие аденовирусы
2011-12	1100	7,2	21,5	41,8	6,3	30,4
2012-13	859	7,9	29,4	48,6	2,9	19,1
2013-14	1285	7,7	23,2	43,4	2,0	31,3
2014-15	1535	11,1	15,3	51,2	0,6	32,9
Всего:	4779	8,7	20,2	47,1	2,4	30,3

Была проведена типовая идентификация ряда изолятов. Для определения серотипа аденовируса вида F был применен метод электрофореза в ПААГ, позволяющий дифференцировать серотипы 40 и 41 на основании размера и, соответственно, скорости миграции в геле ампликонов, полученных с помощью праймеров, специфичных для вида F. Оценка результатов проводилась по расположению фрагментов в геле: HAдV-F40 дают медленномигрирующий ампликон размером 586 пар нуклеотидов (п.н.), HAдV-F41 - быстромигрирующий фрагмент, который за счет делеции в анализируемом участке генома имеет размер 541 п.н.

При типировании 85 изолятов аденовирусов F соотношение HAдV-F41 : HAдV-F40 составило 70,6% : 29,4%.

Для определения серотиповой принадлежности аденовирусов были проведено также прямое секвенирование участка гена генома аденовируса, детерминирующего серотип. Для секвенирования были отобраны 28 изолятов: 10 изолятов вида F (2 – типа 40 и 8 - типа 41), 15 – вида C, и 3 изолята, для которых вид аденовируса не удалось определить с помощью ПЦР. Для всех изолятов были получены ампликоны, соответствующие участку HVR-7 гена гексона, анализ которого, как было показано ранее, позволяет адекватно определить генотип и, соответственно, серотип аденовируса [2, 5].

На основании анализа полученных последовательностей в программе BLAST в сравнении с последовательностями, представленными в базе данных GenBank, подтверждена видовая и типовая принадлежность изолятов HAдV-F-40 и 41, ранее идентифицированных нами с помощью ПЦР и электрофореза ампликонов. Показано также, что изоляты аденовирусов, отнесенные нами на основе видоспецифичной ПЦР к виду C, принадлежат к 1-му (4 изолята), 2-му (9 изолятов), 5-му и 6-му (по одному изоляту) типам.

Изоляты, не относящиеся ни к виду F, ни к виду C, идентифицированы при секвенировании как HAдV-B (тип 7), HAдV-E (тип 4) и HAдV-D (тип 9) – по одному изоляту.

На основе нуклеотидных последовательностей генома аденовирусов, полученных в данном исследовании, построено филогенетическое дерево (Рис.). В филограмму включены также последовательности, полученные в наших предыдущих исследованиях на территории Нижнего Новгорода, и референсные последовательности аденовирусов разных типов из базы данных GenBank. Кластеризация последовательностей в филогенетическом дереве совпадает с видовой и типовой принадлежностью изолятов аденовирусов.

#### **Обсуждение.**

Аденовирусы являются значимыми патогенами в этиологической структуре ОКИ. В большинстве исследований при этиологической расшифровке ОКИ уделяется внимание только выявлению HAдV-F, частота обнаружения которых при спорадической заболеваемости составляет 1-8% в развитых странах и 2-31% в развивающихся [8, 9]. Наличие в фекалиях больных других аденовирусов связывают с длительным бессимптомным выделением их после перенесенной ра-

нее инфекции, и считают не имеющими отношения к данному эпизоду кишечного расстройства [10]. Производимые в настоящее время в России мультиплексные тест-системы для выявления и дифференциации ДНК (РНК) ряда кишечных патогенов содержат в своем составе реагенты, специфически выявляющие аденовирусы F [11].

Однако в работах, в которых у больных ОКИ целенаправленно выявляют все аденовирусы с их дальнейшей дифференциацией, высказывается мнение о том, что роль некишечных аденовирусов в этиологии диарей нельзя исключить [12, 13].

В данном исследовании при обследовании детей, госпитализированных с ОКИ, были выявлены аденовирусы пяти видов (F, C, B, D, E) и девяти серотипов (40, 41, 1, 2, 5, 6, 7, 9, 4). При этом общепризнанные «кишечные» аденовирусы HAdV-F 40 и 41 составили только одну пятую от общего числа выявленных аденовирусов при преобладании, как и в других исследованиях, HAdV-F41 над HAdV-F40 [12, 14]. Аденовирусы вида C, относящиеся к респираторным патогенам, составили большинство выявленных аденовирусов, при превалировании HAdV-C2.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что спектр аденовирусов, выделяемых больными, госпитализированными с острой кишечной инфекции, довольно широк и включает аденовирусы, способные вызвать серьезные внекишечные поражения организма. Это, учитывая высокую контагиозность аденовирусной инфекции, повышает риск распространения в стационарах инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, а также вновь ставит вопрос о роли некишечных аденовирусов в этиологии ОКИ.

#### Литература:

1. Xu, W. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay / W.Xu, M.C.McDonough, D.D.Erdman // *J. Clin. Microbiology*. - 2000. - V. 38. - N 11. - P. 4114-4120.
2. Sarantis, H. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing / H.Sarantis, G.Johnson, M.Brown, M.Petric, R.Tellier // *J. Clin. Microbiol.* - 2004. - V. 42. - N 9. - P. 3963-3969.
3. Епифанова, Н.В. Роль аденовирусов в возникновении острой кишечной инфекции у детей / Н.В.Епифанова, Н.А.Новикова // *Ж. Медиаль (электронный)*. - 2014. - N 2 (12). - С.4 5-47.
4. Епифанова, Н.В. Аденовирусы видов F и C у детей, госпитализированных в кишечное отделение инфекционного стационара / Епифанова Н.В., Новикова Н.А. // *Материалы научно-практической конференции Роспотребнадзора «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения»*. Нижний Новгород, 2012. - С. 42–46.
5. Епифанова, Н.В. Определение серотипа аденовирусов молекулярно-генетическими методами / Н.В.Епифанова, Л.Н.Голицына, Н.А.Новикова, О.В. Парфенова // *Труды третьего съезда военных врачей медико-профилактического профиля вооруженных сил Российской Федерации «Достижения науки и практики в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия вооруженных сил Российской Федерации»*. СПб., 2010. - С. 295–296.
6. Tamura, K.I. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. / K.Tamura, G.Stecher, D.Peterson, A.Filipski, S.Kumar // *Mol. Biol. Evol.* 2013. - V. 30. - N 12 P. 2725-2729.
7. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K.Laemmli // *Nature*. - 1970 - V. 227(5259) - P. 680-685.
8. La Rosa, G. Molecular characterization of adenovirus from clinical samples through analysis of the hexon and fiber genes / G.La Rosa, M.Iaconelli, M.Pourshaban, E.Luca, P.Valentini, S.Sica, S.Manzara, G.Delogu, M.Muscillo // *J. Gen. Virol.* 2011 – V. 92(Pt 2). - P. 412-420.
9. Sanaei Dashti, A., Ghahremani P., Hashempoor T., Karimi A. / A.Sanaei Dashti, P.Ghahremani, T.Hashempoor, A.Karimi // *Molecular Epidemiology of Enteric Adenovirus Gastroenteritis in under-Five-Year-Old Children in Iran. Gastroenterol. Res. Pract.* 2016; 2016:2045697.
10. Filho, E.P. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil / E.P.Filho, N.R.da Costa Faria, A.M.Fialho, R.S.de Assis, M.M.Almeida, M.Rocha, M.Galvao, dos F.B.Santos, M.L.Barreto, J.P.Leite // *J. Med. Microbiol.* 2007. - V. 56. - Pt 3. - P. 313-319.

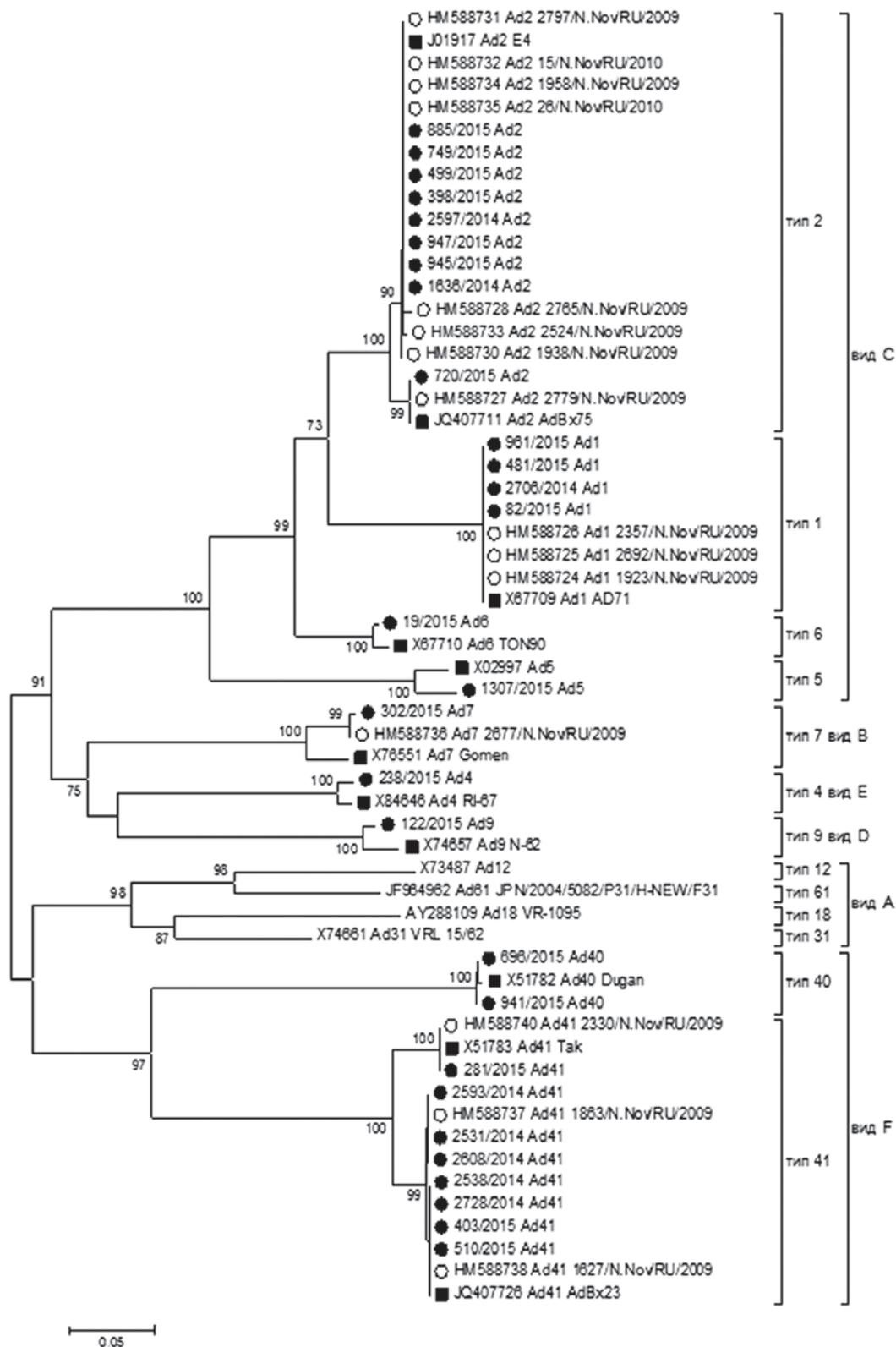


Рис. Филогенетическое дерево на основе нуклеотидных последовательностей гена гексона аденовирусов, выделенных от больных ОКИ в Нижнем Новгороде.

- – типовые штаммы аденовирусов;
- – изоляты, выявленные в данном исследовании;
- – изоляты, выявленные в предыдущих исследованиях.

11. Подколзин, А.Т. Разработка скринингового теста для дифференциальной диагностики острых кишечных инфекций на основе мультиплексной ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации / А.Т.Подколзин, Н.Ю.Абрамычева, Е.Б.Фенске, Р.Л.Битиева, Г.А.Шипулин, О.И.Сагалова, Е.В.Павленко, В.Н.Мазепа, Г.И.Иванова, А.В.Семена, З.Г.Тагирова, В.В.Иванова, В.П.Молочный, В.В.Малеев // Материалы IX съезда Всеросс. научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. М., 2007. Т. 3. С. 73.

12. La Rosa, G, Genetic Diversity of Human Adenovirus in Children with Acute Gastroenteritis, Albania, 2013-2015 / G.La Rosa, S.Della Libera, S.Petricca, M.Iaconelli, D.Donia, P.Saccucci, F.Cenko, G.Xhelilaj, M.Divizia // Biomed. Res. Int. - 2015;2015:142912.

13. Liu, L. Adenoviruses associated with acute diarrhea in children in Beijing, China / L.Liu, Y.Qian, Y.Zhang, J.Deng, L.Jia, H.Dong // PLoS One. 2014 – V. 12. – N 9(2):e88791.

14. Reis, T.A. The role of human adenoviruses type 41 in acute diarrheal disease in Minas Gerais after rotavirus vaccination / T. Reis, A.S.Assis, D.A.do Valle, V.H.Barletta, I.P.de Carvalho, T.L.Rose, S.A.Portes, J.P.Leite, E.da Rosa, M.L.Silva // Braz. J. Microbiol. - 2016 – V. 47. – N 1 – P. 243-250.

## ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫЕ ИНФЕКЦИИ С ТРАНСМИССИВНЫМ МЕХАНИЗМОМ ПЕРЕДАЧИ В ПРИВОЛЖСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ (ПФО) В 2015 ГОДУ

**Ершов В.И.**

*ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

В Российской Федерации традиционными лидерами по заболеваемости целым рядом природно-очаговых инфекций, большинство из которых передается кровососущими паразитами, в последние десятилетия являются территории ПФО.

В 2015 году из группы вирусных геморрагических лихорадок в ПФО зарегистрирована заболеваемость **лихорадкой Денге** (переносчиками являются комары *Aedes aegypti* и *Anopheles*) (10 случаев или  $0,03_{0/00000}$ , из них – 6 случаев в Республике Башкортостан, 2 случая в Республике Татарстан и по 1 случаю – в Нижегородской области и Пермском крае) и **лихорадкой Западного Нила** (в переносе участвуют комары, а также аргасовые и иксодовые клещи) (14 случаев или  $0,05_{0/00000}$ , из них – 10 случаев в Саратовской и 4 случая в Самарской областях).

Несмотря на устойчивую многолетнюю (с 2000 г.) тенденцию к снижению, с 2013 года отмечен рост заболеваемости **клещевым энцефалитом**. В 2014 и 2015 годах зарегистрировано 399 случаев ( $1,34_{0/00000}$ ) и 542 случая ( $1,83_{0/00000}$ ) соответственно (рост на 37,0%). Высокие показатели заболеваемости в 2015 году отмечены в Кировской области –  $11,82_{0/00000}$ , Пермском крае –  $9,49_{0/00000}$ , Удмуртской Республике –  $5,53_{0/00000}$  и Республике Башкортостан –  $1,11_{0/00000}$ . В остальных регионах заболеваемости не отмечено (Республика Мордовия, Самарская область) или она проявилась единичными случаями.

Показатель заболеваемости **клещевым боррелиозом (болезнь Лайма)** в сравнении с 2014 годом вырос на 11,0% (с  $4,00_{0/00000}$  до  $4,42_{0/00000}$ ). Наиболее высокие уровни заболеваемости клещевым боррелиозом отмечены в Республике Удмуртия, Пермском крае, Кировской и Нижегородской областях, где они в 1,7-10,5 раза превысили окружной показатель 2015 года.

Из относительно новых инфекций, в передаче которых участвуют иксодовые клещи, выявленных и описанных в последние три десятилетия, в ПФО в 2015 году зарегистрировано: 53 случая **гранулоцитарного анаплазмоза** ( $0,18_{0/00000}$ ) и 2 случая **моноцитарного эрлихиоза** (показатель менее 0,01).

В округе постоянно наблюдается высокий уровень **укусов клещами**. Так, в 2015 году показатель предыдущего года превышен в 1,17 раза ( $351,3_{0/00000}$ ). В таких условиях специалистам необходимо иметь эпидемиологическую настороженность, принимая во внимание способность клещей

быть источниками и переносчиками до 7 возбудителей инфекций одновременно, учитывать возможность возникновения у укушенного клещом человека не только моно-, но и микст-инфекций.

В 2015 году заболеваемость **туляремией** (переносчиками возбудителей являются иксодовые и гамазовые клещи, слепни, комары, блохи) превысила уровень предыдущего года в 4,5 раза (0,09<sub>0/00000</sub>). Всего было зарегистрировано 27 случаев заболевания, из которых 25 случаев произошло на Кировскую область и 2 случая отмечено в Саратовской области.

За 2015 год на территориях округа зарегистрировано 11 случаев **малярии** (в передаче участвуют комары рода *Anopheles*) (уровень 2014 года). Также осталась на уровне прошлого года регистрация впервые выявленной малярии в РФ (94 случая). В ПФО малярия зарегистрирована в 5 регионах (Республика Башкортостан и Пермский край – по 3 случая, Нижегородская и Пензенская области – по 2 случая, Самарская область – 1 случай).

В 10 регионах ПФО (кроме Республик Башкортостан, Удмуртия и Чувашия, а также Оренбургской области) за 2015 год зарегистрировано 33 случая заболеваний **дирофиляриозом**, гельминтозом, передающимся от больных собак или кошек при укусе комарами. Наибольшее число инвазий отмечено в Саратовской области (8 случаев).

Таким образом, на территориях ПФО имеются условия для передачи и последующего распространения целого ряда трансмиссивных болезней, обусловленных, в большей мере, завозом возбудителей из эндемичных регионов, а также для формирования собственных природных очагов.

## **РЕПРОДУКТИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ВИЧ-ПОЗИТИВНЫХ ЖЕНЩИН И ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ПЕРЕДАЧИ ВИЧ В ПФО В 2010-2015 ГГ.**

**Кузоватова Е.Е., Альтова Е.Е.**

*ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика  
И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

Развитие эпидемии ВИЧ-инфекции в Приволжском федеральном округе характеризуется увеличением общего числа ВИЧ-инфицированных, сохраняющимся положительным темпом прироста числа новых случаев, устойчивой долей женщин среди выявленных пациентов. Большинство женщин находятся в репродуктивном возрасте.

**Целью** работы является анализ репродуктивного поведения ВИЧ-позитивных женщин, зарегистрированных в субъектах ПФО в 2010-2015 гг.

Исследование выполнено по материалам статистических отчетных форм «Проведение профилактических обследований на ВИЧ-инфекцию, гепатиты В и С, организация и проведение лечения больных ВИЧ, включая контроль качества» (форма мониторинга хода выполнения Приоритетного Национального Проекта в сфере здравоохранения) и «Сведения о контингентах больных ВИЧ-инфекцией», предоставленных в Приволжский окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД субъектами ПФО, а также материалов, подготовленных территориальными центрами по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями по нашему запросу.

### **Результаты и обсуждение.**

Согласно данным формы мониторинга ПНП, на 31.12.2015 в округе состояло на диспансерном учете 151 325 ВИЧ-инфицированных. По сравнению с 2014 г. число находившихся на учете возросло почти на 10%. Удельный вес женщин среди находившихся под наблюдением составлял 43,7%. За период 2010-2015 гг. доля женщин оставалась стабильной, составляя немногим более 40% (41 - 44%) от общего числа пациентов, состоящих под наблюдением, за исключением 2011 г. В ряде субъектов ПФО доля женщин к 2015 году приближалась к 50% от общего числа ВИЧ-инфицированных (Республики Мордовия, Марий Эл, Чувашия, Кировская область), а в Оренбургской области женщины составили более половины ВИЧ-позитивных пациентов, нахо-

дившихся на диспансерном учете. За шесть лет под наблюдение взяты 39 026 женщин. Ежегодно возрастает абсолютное число женщин, поступающих под наблюдение, хотя в процентном отношении их доля в 2015 г. была ниже, чем в 2010 г. (39,1% и 44,9% соответственно).

На динамику прироста доли женщин в популяции ВИЧ-инфицированных оказывает влияние путь передачи ВИЧ-инфекции — за изучаемый период отмечалось преобладание полового (гетеросексуального) пути трансмиссии вируса во все годы наблюдения, за исключением 2011 г., когда доминировал парентеральный путь передачи. В 2015 году гетеросексуальный путь передачи составил в целом по округу 60,7% и преобладал на всех территориях, кроме Нижегородской области, наркотический путь передачи в структуре путей заражения составил 37% (в Нижегородской области – 50,8%). (Рис.1).

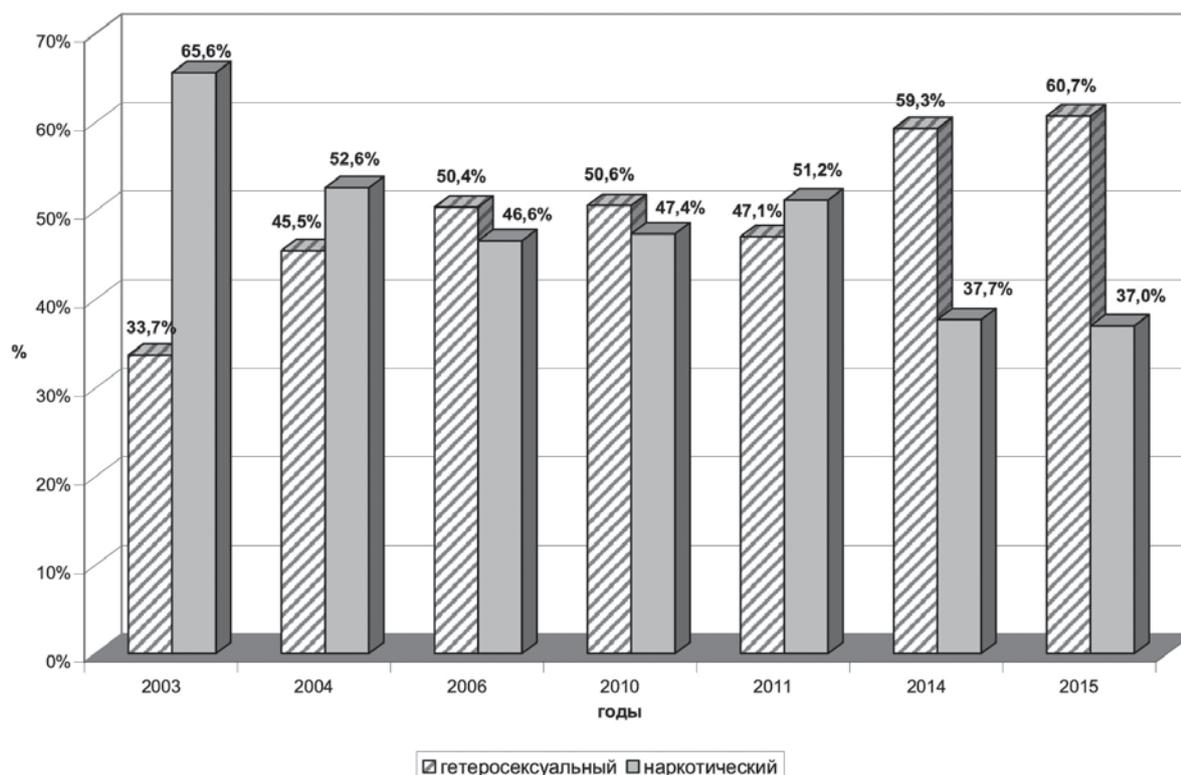


Рис.1. Доля гетеросексуального и наркотического путей в структуре путей передачи ВИЧ среди вновь выявленных пациентов в ПФО

Диаграмма отражает динамику доли гетеросексуального пути передачи в целом в популяции зарегистрированных в ПФО ВИЧ-инфицированных. Работами ряда авторов было показано, что с 2003 г. для женщин в России основной причиной заражения ВИЧ-инфекцией являются незащищенные гетеросексуальные контакты [1].

В нашем исследовании было показано, что доля гетеросексуального пути передачи у женщин значительно (в 2,1 - 1,8 раза) превышает таковую среди мужчин. Однако замечено, что в последние годы мужчины также стали несколько чаще заражаться половым путем. (Рис.2).

За последние пять лет выявление случаев ВИЧ-инфекции сместилось в более старшие возрастные группы как среди мужчин, так и среди женщин, однако в целом на момент регистрации мужчины находятся в более старшем возрасте (старше 30 лет в 2014 году были две трети выявленных мужчин и немногим более половины женщин (53,8%). Вместе с тем, представляет определенную сложность дать характеристику возрастной структуры лиц, в настоящее время состоящих под наблюдением, особенно раздельно в группах мужчин и женщин.

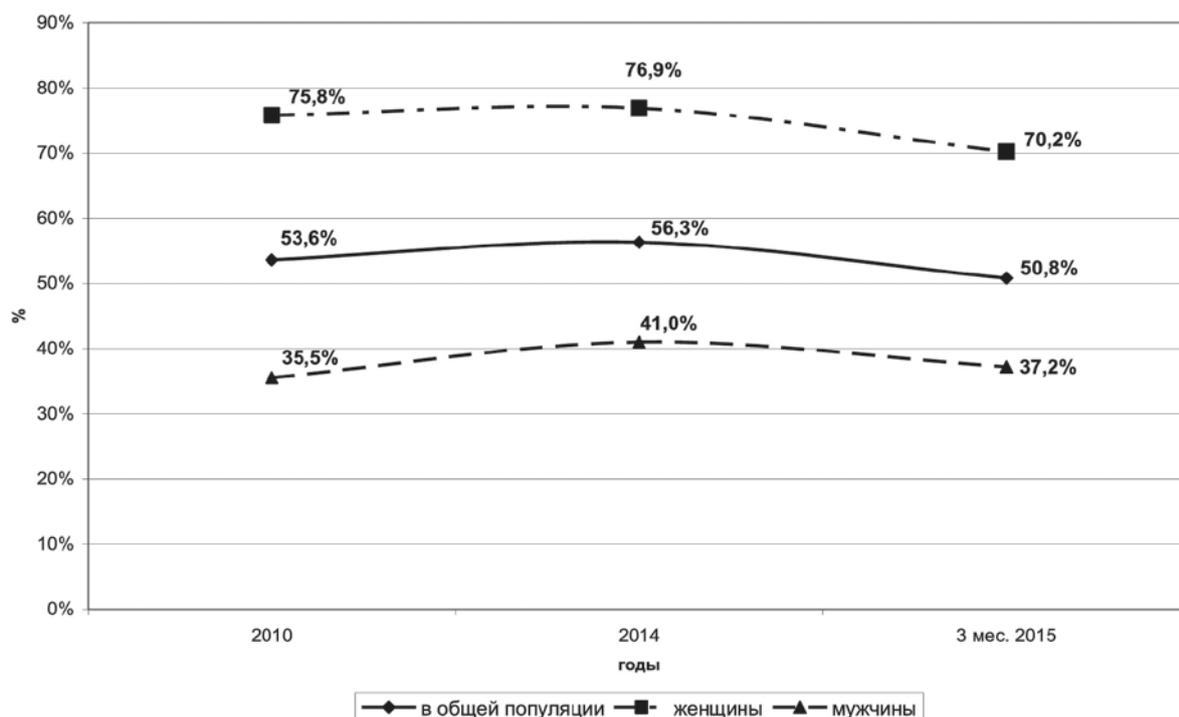


Рис.2. Доля гетеросексуального пути заражения в структуре путей передачи ВИЧ у мужчин и женщин в ПФО, по годам

Информация о дате рождения пациентов есть в базах данных, ведущихся центрами ПБ СПИД и ИЗ, но провести сортировку по всем желаемым критериям является очень трудоемкой задачей. Однако, полагаясь на данные о возрастной структуре ежегодно регистрируемых ВИЧ-позитивных лиц, можно заключить, что основная их часть находится в возрасте от 21 до 40 лет (Табл. 1)

Таблица 1.

Возрастная структура вновь выявленных ВИЧ-инфицированных мужчин и женщин в ПФО (%)

Возраст \ Год	15-17		18-20		21-30		31-40		41-50		51-60		всего
	м	ж	м	ж	м	ж	м	ж	м	ж	м	ж	
2010	0,2	1,2	2,2	6,3	43,2	52,1	39,7	26,8	10,0	8,2	3,2	3,5	0,6
2014	0,2	0,8	1,5	3,4	30,5	39,4	46,4	35,6	15,0	12,7	4,4	5,5	1,2
3 мес. 2015	0,1	0,6	0,9	2,5	26,4	34,9	50,9	40,5	15,2	12,8	4,2	6,2	1,3
Динамика (абс.)	снижение						в	в	в	в	в	в	в
							1,8р.	1,8р.	2,1р.	2,1р.	2,1р.	2,1р.	2,8р.
2015	2,1				30,1		46,0		15,9		4,8		
	возрастание												

Большинство инфицированных ВИЧ женщин находится в репродуктивном возрасте, соответственно возрастает число ВИЧ-позитивных беременностей. В анализируемый период примерно каждая десятая ВИЧ-инфицированная женщина имела завершившуюся беременность (2010-2011 гг. - 11,7%, 2012 г. - 11,4%, 2013 г. - 11,6%, 2014 г. - 10,8%). В 2015 г. число завершившихся беременностей у ВИЧ-позитивных женщин в округе было почти на 40% больше, чем в 2010 г. (5703 и 4092 соответственно). Не во всех случаях беременность заканчивалась родами,

однако все чаще женщины, живущие с ВИЧ, стремятся беременность сохранить. В целом за шестилетний период 65,7% беременностей у ВИЧ-позитивных женщин завершились родами. При этом доля беременных, завершивших беременность родами, за анализируемый период неуклонно возрастала - с 60,5% в 2010 г. до 68,3% в 2015г.

Эта тенденция характерна для большинства субъектов ПФО. В некоторых субъектах округа (Нижегородская, Оренбургская области) в 2014 г. ВИЧ-инфицированные женщины сохраняли три из четырех беременностей. В 2015 г. среднеокружное значение данного показателя (68,3%) было превышено в Пермском крае (69,2%), Республике Мордовия (72,5%), Пензенской (79,2%), Оренбургской (80,1%), Нижегородской (86,5%) областях. Значительно возросло ежегодное число родов и в абсолютных цифрах: в 2015 г. по сравнению с 2010 г. число женщин, завершивших беременность родами, увеличилось в 1,5 раза (3896 и 2539 человек соответственно) (Рис.3).

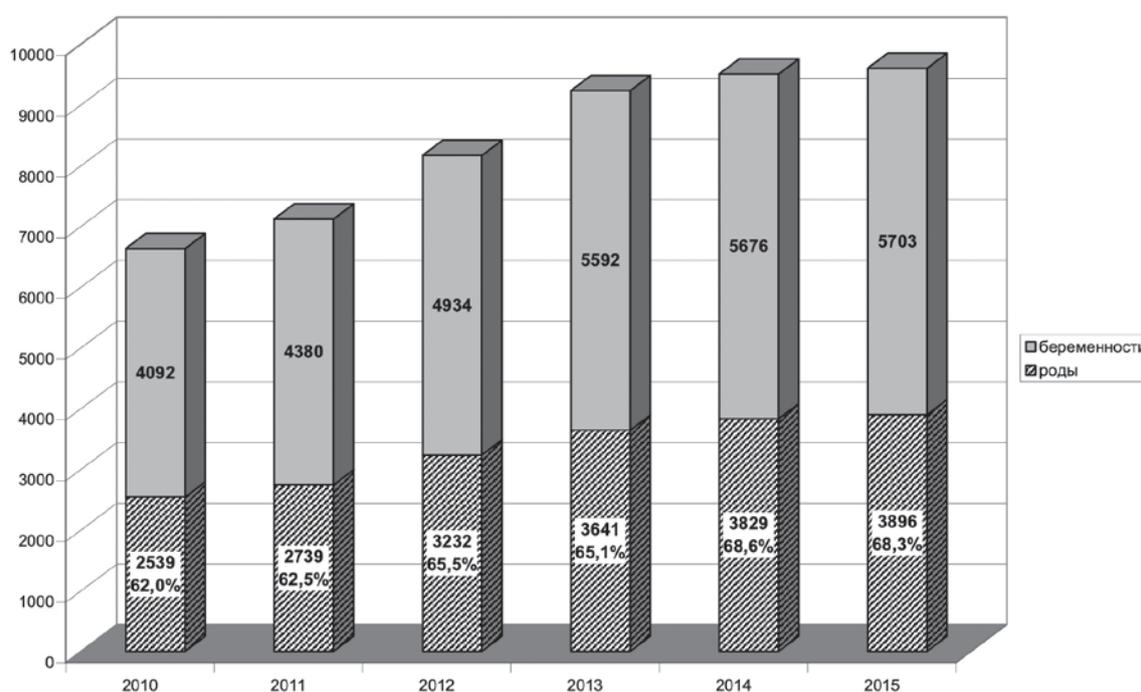


Рис.3. Доля ВИЧ-позитивных беременных, завершивших беременность родами, в ПФО в 2010-2015 гг.

Наблюдающаяся тенденция к сохранению беременности ВИЧ-инфицированными женщинами обуславливает чрезвычайную важность реализации эффективной стратегии профилактики передачи ВИЧ от матери ребенку. Имеющиеся у нас данные свидетельствуют, что в 2010-2011 гг. ВИЧ-позитивные беременные почти в 60% случаев имели диагноз ВИЧ-инфекции еще до наступления беременности, т.е. женщины были осведомлены о своем ВИЧ-статусе и сделали выбор в пользу сохранения беременности. Вопрос о том, была ли каждая сохраненная беременность запланированной, требует отдельного изучения. Диспансеризация ВИЧ-инфицированных женщин, таким образом, в обязательном порядке должна предусматривать консультирование по вопросам планирования семьи. С другой стороны, в том же исследовании было показано, что 36-37% женщин впервые были выявлены именно во время беременности. Риск инфицирования ребенка возрастает при более позднем выявлении ВИЧ-инфекции, по мере увеличения срока беременности. Особенно значительное возрастание риска было отмечено нами при сравнении группы женщин, выявленных в период беременности при первом тестировании, с выявленными в родах (ОШ= 6,0; 95% ДИ 4,2–8,5) [2].

Диспансеризация беременных дает возможность своевременного их обследования на ВИЧ-инфекцию и, в случае ее обнаружения, организации рационального наблюдения и правильного и

своевременного начала химиопрофилактики (ХП), снижая тем самым риск рождения инфицированного ребенка. Вместе с тем, примерно 3,5% ВИЧ-инфицированных женщин было выявлено при поступлении на роды. Это свидетельствовало чаще всего об отсутствии приверженности беременной диспансерному наблюдению и отсутствию в связи с этим своевременного тестирования на ВИЧ. Однако в ряде случаев в родах выявлялась сероконверсия, подтверждая факт инфицирования во время беременности. Это определяет необходимость своевременного обследования половых партнеров, в особенности на территориях с высокой пораженностью, и профилактической просветительской работы с женщинами.

Ранее нами было показано, что среди женщин, не состоявших на учете по беременности, риск перинатальной трансмиссии в 4,6 раза выше, чем у тех, кто состоял под наблюдением (95% ДИ 3,8-5,6). Взятие на учет по беременности в ранние сроки (первый триместр) ассоциировано с наиболее значительным снижением риска перинатальной трансмиссии – в 6,3 раза по сравнению с не состоявшими на учете. Риск инфицирования ребенка достоверно ниже также в группе женщин, вставших на учет в сроки 13-21 неделя (в 4,5 раза). Снижение риска перинатальной передачи отмечается и в группе женщин, вставших на учет в сроки 22-35 недель беременности, однако степень снижения уже менее значительна – в 3,1 раза. Напротив, обращение в женскую консультацию и начало наблюдения по поводу беременности в поздние сроки (в 36 недель и позже) не оказывает существенного влияния на снижение риска перинатальной трансмиссии [2].

Чрезвычайно важным преимуществом, которое дает ВИЧ-инфицированным беременным женщинам ранняя постановка на диспансерный учет по беременности, является возможность своевременного начала приема антиретровирусных препаратов с целью предотвращения передачи вируса от матери ребенку.

В многочисленных исследованиях показано, что количество вируса, с которым контактирует ребенок, является одним из ключевых факторов риска перинатальной трансмиссии ВИЧ. [3,4] В целом за период 2010-2015 гг. химиопрофилактикой (хотя бы одним ее этапом) было охвачено 95,3% пар мать-ребенок. Однако отмечено, что уровень перинатальной передачи вируса в значительной мере определяется его содержанием в крови матери к моменту родов. Так, в нашем более раннем исследовании в группе рожениц с неопределяемой вирусной нагрузкой (2398 женщин) уровень перинатальной передачи составил 0,5%. Среди тех, у кого нагрузка была < 1000 копий/мл (944 женщины), он составил 1,9%, в подгруппе с уровнем вирусной нагрузки  $\geq 1000$  копий/мл (747 женщин) – 7,6%. В группе с неизвестной вирусной нагрузкой к моменту родов (1222 женщины) показатель перинатальной передачи ВИЧ был равен 14,0%. [5].

Протоколом предусмотрена трехэтапная схема профилактики передачи ВИЧ от матери ребенку – во время беременности, в родах и новорожденному. Охват первым этапом ХП во всех субъектах округа был во все годы наблюдения значительно ниже, чем охват новорожденных (Табл. 2).

Таблица 2.

Охват химиопрофилактикой в парах мать-ребенок в ПФО в 2010-2015 гг.(%)

Этапы ХП	2010	2011	2012	2013	2014	2015	За 6 лет
Во время беременности	85,3	86,4	87,6	86,9	88,9	88,5	87,2
Новорожденному	98,5	98,5	98,7	98,6	99,1	99,0	98,2
Трехэтапная ХП	84,8	85,5	88,1	86,3	88,2	87,9	86,7

В среднем по округу за шестилетний период ХП перинатальной передачи получили 98,2% новорожденных и только 87,2% женщин на этапе беременности. Охват ВИЧ-позитивных беременных ХП за период наблюдения превысил 90% в Республиках Мордовия, Удмуртия, Татарстан, в Кировской, Пензенской и Саратовской областях и был выше 95% в Республиках Башкортостан, Чувашия, Марий Эл. В 2015 г. химиопрофилактикой было охвачено более 90% беременных в Оренбургской, Пензенской, Саратовской, Ульяновской областях, свыше 95% в Республиках Башкортостан, Татарстан, Чувашия, а в Республиках Марий Эл и Мордовия охват беременных достиг 100%. В 2015 г. более 99% новорожденных получили ХП в Республике Башкортостан,

Нижегородской, Оренбургской, Саратовской областях и Пермском крае, а в Республиках Марий Эл, Мордовия, Татарстан, Чувашия, Кировской и Ульяновской областях этот показатель составил 100%. Ранее нами было показано, в какой мере влияет пропуск первого этапа ХП на ее эффективность. [2] Если женщина не получала ХП в период беременности, но были проведены второй и третий ее этапы, то риск рождения инфицированного ребенка в 8,3 раза ниже, чем у тех, кто не получал АРТ вообще. Однако женщины, не принимавшие антиретровирусные препараты во время беременности, имеют почти в 4 раза больший риск рождения инфицированного ребенка, чем те пары мать-дитя, в которых проведен полный курс ХП.

Наиболее эффективной является трехэтапная химиопрофилактика. Так, если проведение хотя бы одного этапа ХП снижает риск рождения инфицированного ребенка в 20,2 раза (ОШ=0,05; 95% ДИ 0,04-0,07), то при проведении трехэтапной ХП риск снижается в 31,7 раза [2].

В целом за анализируемый период охват женщин трехэтапной химиопрофилактикой (ХП) составил 86,7%. Работа территориальной службы по профилактике и борьбе со СПИД округа в данном направлении способствовала тому, что этот показатель вырос в 2014 г. по сравнению с 2010 г. на 3,4%, что означает охват еще 1271 пары мать-ребенок полным курсом перинатальной ХП. Отметим, что в 2006 г. в ПФО данный показатель составлял лишь 71,5%. Однако в 2015 г. было допущено снижение показателя до 87,9%. Средние пятилетние значения (2010-2014 гг.) охвата полным курсом химиопрофилактики ниже среднеокружных отмечались в четырех субъектах ПФО (Самарской, Нижегородской, Оренбургской областях и Пермском крае) [6].

Уровень перинатальной передачи в ПФО с 2010 по 2014 гг. имел четкую тенденцию к снижению, составив 8,3% - 8,1% - 7,4% - 6,9% - 6,8% соответственно (рассчитан по данным формы мониторинга ПНП). К началу 2015 года в округе состояло под наблюдением 1689 детей, инфицированных перинатально. Они составили 90,8% от числа всех детей и подростков до 18 лет, находившихся на диспансерном учете в 2014 году. Из числа инфицированных детей большая часть проживает в семьях с биологическими родителями или родственниками-опекунами, доля отказных детей за период наблюдения снизилась с 22,6% в 2010 г. до 15,1% в 2014 г.

Следует отметить, что ежегодно территориальные центры ПБ СПИД регистрируют случаи грудного вскармливания ВИЧ-инфицированными женщинами. И хотя с 2010 года число таких случаев по округу сократилось более чем в 3,5 раза, в 2014 году находилось на естественном вскармливании 13 детей, рожденных ВИЧ-позитивными матерями. Данный факт указывает на необходимость усиления разъяснительной работы с ВИЧ-позитивными беременными и родильницами по вопросам вскармливания и обеспечения своевременности поставок заменителей грудного молока в территории.

Выводы. Женщины детородного возраста составляют значительную долю в популяции ВИЧ-инфицированных в ПФО. Репродуктивное поведение их характеризуется тенденцией к более частому сохранению наступившей беременности. Однако не всегда ВИЧ-позитивные женщины привержены диспансерному наблюдению, как по поводу ВИЧ-инфекции, так и в связи с беременностью, что препятствует своевременному началу химиопрофилактики перинатальной передачи ВИЧ. Активизация работы по планированию семьи с этой категорией пациентов, увеличение охвата беременных перинатальной ХП, повышение приверженности приему препаратов, отказ от грудного вскармливания являются важными направлениями работы по диспансеризации женщин, живущих с ВИЧ, в ПФО.

#### Литература:

1. Ладная Н.Н., Соколова Е.В., Тушина О.И., Козырина Н.В., Покровский В.В. ВИЧ-инфекция у женщин и детей в Российской Федерации в 2013 г. В кн.: Дети и ВИЧ: проблемы и перспективы: Материалы конференции. СПб, Изд-во «Человек и его здоровье», 2014, с.3-6
2. Кузоватова Е.Е. Оценка роли некоторых факторов, ассоциированных с риском перинатальной трансмиссии ВИЧ, в когорте детей, рожденных ВИЧ-позитивными матерями в ПФО в 2006-2010 гг. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия. 2014; Т. 6. № 3: с.32-38
3. Tubiana R., J. Le Chenadec, C. Rouzioux, L. Mandelbrot, K. Hamrene, C. Dollfus, A. Faye, C. Delaugerre, S. Blanche, J. Warszawski Factors Associated with Mother-to-Child Transmission of

HIV-1 Despite a Maternal Viral Load < 500 Copies/mL at Delivery: A Case-Control Study Nested in the French Perinatal Cohort (EPF-ANRS CO1). Clin. Infect. Dis. 2010; 50: 585–596.

4. Афонина Л.Ю., Воронин Е.Е., Фомин Ю.А., Козырина Н.В., Юрин О.Г., Покровский В.В. Применение антиретровирусных препаратов в комплексе мер, направленных на профилактику передачи ВИЧ от матери ребенку. Клинический протокол. Эпидемиол. инфек. болезни. Актуал. вопр. 2013; 1 (приложение). 16 с.

5. Кузоватова Е.Е. Влияние вирусологических и иммунологических показателей матери и способа родоразрешения на исход перинатального контакта у детей, рожденных ВИЧ-позитивными матерями в Приволжском федеральном округе в 2006-2011 гг. Эпидемиол. инфек. болезни. Актуал. вопр. 2013; 6: с.43-48

6. Кузоватова Е.Е. Характеристика контингентов ВИЧ-инфицированных женщин, состоявших под наблюдением в ПФО в 2010-2014 гг. В кн: Актуальные вопросы профилактики передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку: Материалы международной научно-практ. конф. С-Пб, Изд-во «Человек и его здоровье», 2015, с. 223-225

## **УНИВЕРСАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЭПИДЕМИЙ. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ГРИППА**

**Низоленко Л.Ф., Бачинский А.Г.**

*ФБУН Государственный Научный Центр Вирусологии и Биотехнологии «Вектор»  
Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область*

### **1. Универсальная модель эпидемий**

Разработанная в ГНЦ ВБ «Вектор» и реализованная в виде компьютерной программы универсальная модель эпидемий адаптирована к возбудителям таких особо опасных инфекций, как натуральная оспа, сибирская язва, чума (легочная и бубонная формы), геморрагические лихорадки Эбола, Марбург, Ласса, Крымская-Конго, холера, грипп. Подробное описание модели и данные по ее верификации опубликованы ранее [1,2].

Модель установлена на сервере ГНЦ ВБ «Вектор», <http://epimod.vector.nsc.ru> (доступна также на сайте <http://vector-epimod.ru>) и снабжена Web-интерфейсом.

Пользователь, работающий с моделью, имеет доступ ко всем параметрам. Он может редактировать параметры, характеризующие ту или иную инфекцию: инфекционность (заразность) больных и чувствительность к инфекции, смертность на разных стадиях болезни, чувствительность к лечению, а также параметры, задающие сроки и интенсивность реализации мер противодействия, таких как: три уровня противоэпидемических мероприятий (ПЭМ1-3), определяющих, в основном, скорость выявления и изоляции (наблюдения) инфицированных, контактных и подозрительных на заболевание лиц, вакцинация, карантин. Кроме того, ряд параметров задает характеристики региона, для которого моделируется эпидемия, в частности его обеспеченность ресурсами. С помощью данной модели можно рассчитать динамику эпидемии как с момента появления первых инфицированных, так и с любого выбранного дня, провести оптимизацию мер противодействия, рассчитать стандартные сценарии для выбранного региона и провести ряд других действий, подробно описанных в Руководстве пользователя.

В данной работе, в частности, модель использовалась для оценки эффективности разных стратегий вакцинации при борьбе с эпидемией гриппа.

### **2. Коллективный иммунитет во время эпидемии сезонного гриппа**

Коллективный иммунитет в случае гриппа может формироваться как в результате перенесенных инфекций, так и в результате предварительной массовой вакцинации. Влияние иммунитета

на динамику эпидемии реализуется за счет изменения эффективной скорости трансмиссии  $R_e$ , которая определяется в модели как «среднее число инфицируемых от одного больного». Задаваемое пользователем значение параметра  $R_0$  - это число инфицируемых одним неиммунным больным, имеющим тяжелую форму заболевания, в полностью чувствительной популяции, состоящей из не иммунных лиц, при отсутствии мер противодействия. Уменьшение значения  $R_e$  по сравнению с  $R_0$  достигается, в частности, за счет влияния уровня коллективного иммунитета.

Во-первых, иммунные лица могут быть менее чувствительными к инфекции. Во-вторых, у них может быть снижена их заразность. Соответственно, если долю иммунных лиц в популяции обозначить через  $P$ , то зависимость значения  $R_e$  от этой величины можно выразить следующей формулой:

$$R_e = R_0 * [P * S + (1 - P)] * [P * H + (1 - P)] \quad (1)$$

Кроме того, что характерно как раз для гриппа, доля тяжелых форм для иммунных может быть ниже, чем для неиммунных. Тогда формула усложняется:

$$R_e = R_0 * [P * S + (1 - P)] * [P * (Q * H + (1 - Q) * E) + (1 - P) * (q + (1 - q) * E)] \quad (2)$$

В обеих формулах выражение в первых квадратных скобках задает среднее по популяции снижение чувствительности к инфекции за счет наличия иммунных:  $S \leq 1$  - коэффициент, задающий долю чувствительности к инфекции иммунных по отношению к чувствительности неиммунных. Выражение во вторых квадратных скобках задает снижение напряженности инфекционного фона, формируемого больными, которое также может зависеть от уровня коллективного иммунитета например из-за разной вероятности проявления тяжелых и легких форм заболевания среди иммунных и неиммунных.  $Q$  и  $q$  - доля тяжелых форм среди иммунных и неиммунных, соответственно ( $Q \leq q$ );  $E \leq 1$  - отношение заразности больного легкой формой к заразности больного тяжелой формой заболевания;  $H \leq 1$  - отношение заразности иммунных больных тяжелой формой заболевания к заразности больных тяжелой формой, неиммунных (значение заразности для тяжелой формы у неиммунных полагается равным единице).

Для сезонного гриппа в модели по умолчанию используются следующие значения этих показателей:  $R_0=1.5$ ,  $S=0.2$ ;  $Q=0.2$ ;  $q=0.5$ ;  $E=0.5$ ;  $H=0.5$ , выбранные на основании анализа литературных данных, в том числе, об эффективности применяемых в настоящее время вакцин [3-5]. Фактически заразность больных легкой формой может быть существенно ниже. Однако, такие больные, как правило, ведут гораздо более активный образ жизни и контактируют с большим количеством людей.

Таким образом,  $R_e$  снижается по отношению к  $R_0$  с увеличением  $P$  и при некотором уровне коллективного иммунитета  $R_e$  может стать меньше единицы, так что эпидемия будет затухать даже без других мер противодействия. Например, для сезонного гриппа с  $R_0=1.5$  это теоретически происходит, если при отсутствии других мер противодействия вакцинировано 30 и более процентов населения.

Здесь и далее в качестве модельного объекта взят мегаполис с населением 1000000 человек. В начальный момент времени в популяции появляются 20 инфицированных лиц в латентной стадии заболевания. ПЭМ1 начинается через 20 дней после начала расчетов. Основные параметры противоэпидемических мероприятий, а также ресурсы, доступные для их осуществления представлены в двух первых столбцах Таблицы 1. Время расчетов составляло 100 дней.

При таких условиях и в случае увеличения доли иммунных до 30%, эпидемия действительно самопроизвольно заканчивается без введения следующих этапов ПЭМ (означающих не только изоляцию больных, но и наблюдение за контактными лицами) и карантина. Однако ее продолжительность значительно превышает время расчетов. К сотому же дню инфицированным оказывается более половины населения города и, при максимальном уровне смертности до 0.2% (тяжелая форма) от числа заболевших, отмечается более 2000 смертельных случаев. Если осуществляется весь комплекс противоэпидемических мероприятий, число инфицированных - чуть более девяти тысяч человек с 26 смертельными исходами. При вакцинации 50% населения эти показатели составляют 272 тысячи инфицированных и 598 смертельных случаев без ПЭМ, и 912 и 3, соответственно, с ПЭМ.

Таблица 1

Параметры, для которых возможна оптимизация, их условная «цена» и значения, используемые «по умолчанию» при моделировании эпидемии сезонного гриппа.

Параметр	Значение «по умолчанию»	Цена единицы фактора
Доля иммунных, %	20	1000
Параметры ПЭМ		
Доля бессимптомных контактных/подозрительных, изолируемых ежедневно для ПЭМ2, %	5	10
Доля бессимптомных контактных/подозрительных, изолируемых ежедневно для ПЭМ3, %	10	10
Доля больных в стадии продромы, изолируемых ежедневно для ПЭМ1-3 % (неиммунные)	5,8,10	10,10,10
Доля больных в стадии продромы, изолируемых ежедневно для ПЭМ1-3 % (иммунные)	2,4,8	10,10,10
Доля больных в финальной стадии (тяжелая форма), изолируемых ежедневно для ПЭМ1-3, %	8,10,15	10,10,10
Минимальная доля симптоматических больных, изолируемых ежедневно для ПЭМ1-3, %	2	10
Максимальная доля получивших профилактическое лечение в группах риска ежедневно, %	10	5
Параметры ресурсов		
Число медицинских работников, занятых в ликвидации эпидемии	2000	100
Число медицинских бригад для поиска и изоляции больных и контактных	100	200
Число больных/контактных, выявляемых одной бригадой в сутки	20	50
Число пунктов выдачи средств химиофилактики	500	100
Число обслуживаемых на одном пункте в сутки	500	50
Запас профилактических средств	1000000	2
Запас лекарств	1000000	3
Число мест строгой изоляции	30000	100
Число мест в провизорных госпиталях	2500	50
Число мест в изоляторах для контактных	10000	70

Одной из возможностей модели является оптимизация мер противодействия. Конечно, можно «вручную» подбирать значения факторов управления эпидемиями, анализируя расчетную динамику эпидемии. А можно, как это реализовано в модели, задав начальные значения и допустимые границы факторов, получить их значения, минимизирующие некоторый критерий:

$$F = \sum v_i \cdot f_i + \sum L_j \cdot f_j \quad (3)$$

где  $v_i$  - значение  $i$ -го фактора оптимизации,  $f_i$  - цена единицы этого фактора,  $L_j$  - показатель, характеризующий результаты эпидемии, который вносит вклад, определяемый его весом  $f_j$  в потери от эпидемии.

Поддержание определенного уровня готовности к эпидемии, как и применение интервенций требует некоторых затрат: материальных и/или человеческих. Поэтому задается «цена» единицы каждого фактора. Сумма затрат на поддержание или применение заданных значений факторов входит в критерий оптимизации в качестве первого слагаемого. Второй составной частью критерия является сумма потерь от эпидемии, зависящая от ряда ее показателей таких как: число

инфицированных, число умерших и т.д., и назначаемых пользователем весов этих показателей.

Для оптимизации используется генетический алгоритм [6]. Более подробно применение его в модели описано в ранее опубликованной работе [7].

Значения факторов оптимизации, заданные по умолчанию, и «цена» единицы каждого из них также приведены в Таблице 1.

Поскольку целью данной работы было исследование влияния на последствия эпидемии именно вакцинации, верхняя граница этого параметра задавалась различной и достаточно высокой, а для всех прочих – лишь в пределах ресурсов модельного города. Поскольку генетический алгоритм является «случайным», с каждым набором параметров процесс оптимизации проводится 5 раз.

Даже несмотря на то, что «цена» единицы уровня коллективного иммунитета была задана в 5-10 раз выше, чем самых «дорогих» из прочих параметров, в оптимизированных условиях он обязательно принимал максимально допустимые значения, кроме совершенно нереальной ситуации, когда верхней границей доли иммунных было задано 80%. Причем, чем выше была граница числа иммунных, тем меньшее значение имели все прочие факторы. При верхней границе числа иммунных 50- 60%, значения параметров интенсивности ПЭМ, а именно доля неиммунных больных в стадии продромы, и доля больных в финальной стадии (тяжелая форма), изолируемых ежедневно для ПЭМ1-3 в оптимизированных условиях оставались на уровне заданном «по умолчанию», то есть достигали верхней границы. Все прочие параметры оказались значительно ниже таковой, или принимали минимально допустимые значения. При уровне коллективного иммунитета 75% и выше, ни один из прочих параметров не превышал минимального значения. При этом «цена» эпидемии снижалась весьма значительно, что показано в Таблице 2. Видно, что при прочих равных, повышение доли иммунных среди населения с 20 до 50% снижает число инфицированных и погибших в 5-10 раз, и еще в пять раз повышение этого показателя с 50 до 60% .

Таблица 2

Параметры, задающие «потери от эпидемии» и сравнение последствий эпидемии сезонного гриппа в оптимизированных условиях при разном уровне коллективного иммунитета.

Показатели	До оптимизации	Условная «цена» параметра	В оптимизированных условиях при верхней границе доли иммунных		
			50%	60%	80%
Всего инфицированных	29637	100	2910-4006	605 - 808	69
Всего умерли	77	1000000	7-11	2	0
Человеко-дней изолированных больных	32849	1	3138-4359	544-805	0
Человеко-дней изолированных контактных	37422	0.1	3673-5243	585-877	0
Получили профилактическое лечение	248865	0.1	162284-164807	127776-131916	0
«Цена» эпидемии: затраты + потери в условных единицах	75351016		1098607 -1584403 -	347841-373384	92150 -92260

### 3. Вакцинация против пандемических штаммов

Используемые в настоящее время вакцины против гриппа эффективны только в случае антигенного совпадения вакцин с эпидемическими штаммами. Поэтому сезонные вакцины должны обновляться почти ежегодно. Кроме того, вакцины против сезонного гриппа не обеспечивают защиту против значительно отличающихся вирусов пандемического гриппа. Таким образом, как из-за постоянной угрозы следующей пандемии так и из-за непрерывного появления вариантов сезонных вирусов гриппа типа А путем дрейфа, есть потребность в универсальной вакцине против гриппа, обеспечивающей защитный иммунитет против всех вирусов гриппа [8,9]. В данном разделе оценивается влияние эффективности гипотетической универсальной вакцины на эпидемию пандемического гриппа в том же модельном городе при ее использовании до эпидемии. Мы

не рассматривали вакцинацию непосредственно во время эпидемии, а также режим вакцинации/ревакцинации как таковой. Предполагалось, что к началу расчетов у вакцинированных лиц иммунитет полностью сформирован.

Пандемический вариант при моделировании отличался от сезонного повышенной скоростью трансмиссии ( $R_0$  1.5 → 2.5), повышенной смертностью (в 5 раз) и низким (<5%) уровнем коллективного иммунитета [10-12]. То есть, при моделировании задавалось, что весь коллективный иммунитет формируется до начала расчетов за счет вакцинации.

Параметр «эффективность вакцины» задавал пропорциональное изменение всех параметров моделирования, которые отличаются у иммунных и неиммунных лиц. Например, если эффективность вакцины определялась как 90%, коэффициент, задающий долю чувствительности к инфекции иммунных по отношению к чувствительности неиммунных (S) и отношение заразности иммунных к заразности неиммунных (H) задавались равными 0.1, а доля тяжелых форм среди иммунных (Q) – 0.05, по сравнению с долей тяжелых форм среди неиммунных  $q=0.5$ . Также в 10 раз снижался показатель смертности иммунных по сравнению с неиммунными на любой из стадий болезни.

Динамика эпидемии гриппа, рассчитывалась на протяжении 100 суток от появления первых инфицированных при разных уровнях коллективного иммунитета.

Влияние эффективности вакцины и уровня ее использования можно также теоретически оценить путем вычисления эффективной скорости трансмиссии  $R_e$ , как это делалось для сезонного гриппа (формулы 1 и 2). Значение показателя  $R_e$  для разных комбинаций эффективности вакцины и уровня коллективного иммунитета представлены в Таблице 3. Полужирным шрифтом выделены комбинации параметров, при которых эпидемия не способна заметно разрастаться при отсутствии других мер противодействия.

Для лучшего понимания степени влияния того или иного параметра на последствия эпидемии целесообразно ввести понятие защищенности населения. В качестве показателя защищенности принимается величина:

$$P_1 = (N_0 - N_1)/N_0 \quad (4)$$

где  $N_0$  – значение некоторой величины (в данном случае, число инфицированных) к моменту окончания расчета в отсутствие мер противодействия,  $N_1$  – значение той же величины при реализации меры противодействия ‘Г’.

На Рисунке 1 сравниваются показатели защищенности для разных уровней коллективного иммунитета, сформированного с использованием вакцин с 50 и 80% эффективностью.

Таблица 3

Значение  $R_e$  для комбинаций параметров: уровень коллективного иммунитета vs эффективность вакцины для пандемического гриппа с  $R_0=2.5$ .

Уровень иммунитета	Эффективность вакцины					
	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
0.1	2.149375	2.10607	2.064135	2.02354	1.984255	1.94625
0.2	1.935	1.85328	1.77504	1.70016	1.62852	1.56
0.3	1.731875	1.61663	1.507715	1.40486	1.307795	1.21625
0.4	1.54	1.39612	1.26216	1.13764	1.02208	<b>0.915</b>
0.5	1.359375	1.19175	1.038375	<b>0.8985</b>	<b>0.771375</b>	<b>0.65625</b>
0.6	1.19	1.00352	<b>0.83636</b>	<b>0.68744</b>	<b>0.552912</b>	<b>0.44</b>
0.7	1.031875	<b>0.83143</b>	<b>0.656115</b>	<b>0.50446</b>	<b>0.374995</b>	<b>0.26625</b>
0.8	<b>0.885</b>	<b>0.67548</b>	<b>0.49764</b>	<b>0.23436</b>	<b>0.22932</b>	<b>0.135</b>
0.9	<b>0.749375</b>	<b>0.53567</b>	<b>0.360935</b>	<b>0.22274</b>	<b>0.118655</b>	<b>0.04625</b>
1	<b>0.625</b>	<b>0.412</b>	<b>0.246</b>	<b>0.124</b>	<b>0.043</b>	<b>0</b>

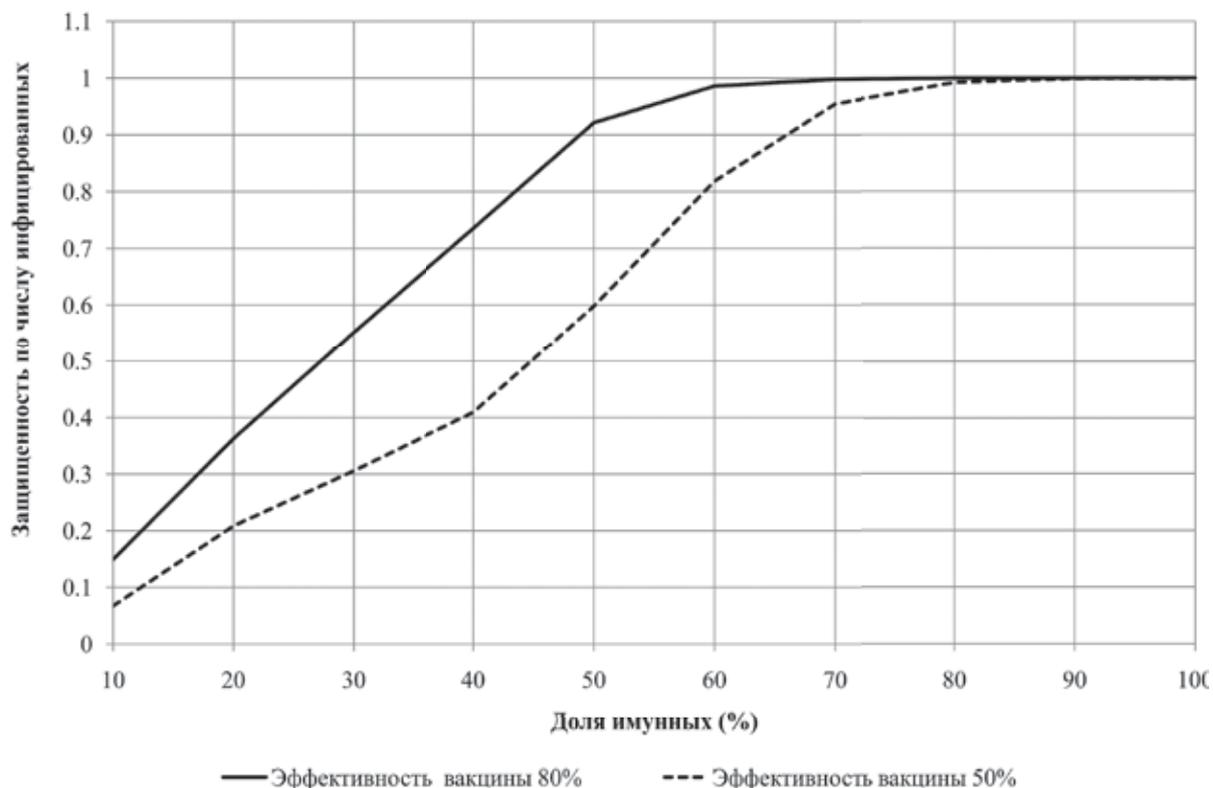


Рисунок 1. Сравнение защищенности по параметру «число инфицированных» для разных уровней коллективного иммунитета, сформированного до начала эпидемии пандемического гриппа с использованием гипотетических универсальных вакцин с разной эффективностью

По итогам моделирования, можно сделать вывод, что если гипотетическая универсальная вакцина будет обладать эффективностью того же уровня, что современные «сезонные» вакцины, то есть, порядка 70-80%, достаточно надежную (90%) защиту от пандемического гриппа она сможет обеспечить лишь при условии предварительной вакцинации не менее 50% населения. Причем, при расчетах этого показателя реализовался полный комплекс ПЭМ, применяемых при эпидемии сезонного гриппа (изоляция заболевших, карантин, профилактическое лечение).

#### Литература:

1. Bachinsky A.G. A Universal Model for Predicting Dynamics of the Epidemics Caused by Special Pathogens/ A.G. Bachinsky, L. Ph. Nizolenko// BioMed Research International. - 2013. - v. 2013. - 7 p.
2. Бачинский А.Г. Универсальная модель локальных эпидемий, вызываемых возбудителями особо опасных инфекций/ А.Г. Бачинский, Л.Ф. Низоленко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. - № 2. – с. 44-47.
3. Гендон Ю.З. Вакцина Ваксигрип для профилактики гриппа (обзор литературы)/ Ю.З. Гендон //Вакцинация. – 2000. - № 5. – приложение.
4. Containing Pandemic Influenza with Antiviral Agents/ I.M. Longini Jr., M.E. Halloran, A.Nizam, Y. Yang //Am. J. Epidemiol. – 2004. - V.159. - p.623-633.
5. Научно-исследовательский институт гриппа. Профилактика гриппа [Электронный ресурс] / НИИ гриппа. – СПб, 2010. – Режим доступа: [http://www.influenza.spb.ru/institute\\_for\\_population/gripp\\_prof/](http://www.influenza.spb.ru/institute_for_population/gripp_prof/)
6. Haupt R. L. Practical genetic algorithms. Second edition/ R. L. Haupt, S. E. Haupt. - A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION, 2004.
7. Bachinsky A.G., A Universal Model of Epidemic: Optimizing Interventions/ A.G. Bachinsky, L.Ph. Nizolenko// Universal Journal of Public Health. - 2014. - v. 2. - № 4. - p. 111-117.

8. Universal Influenza Vaccines, a Dream to Be Realized Soon/ H. Zhang, L. Wang, R.W. Compans, B-Z. Wang// Viruses. – 2014. –v. 6. – p. 1974-1991.
9. de Vries R. D. Universal influenza vaccines, science fiction or soon reality?/ R.D. de Vries, A.F. Altenburg, G.F. Rimmelzwaan//Expert Review of Vaccines. - 2015. – v. 14. – p. 1299-1301.
10. Cheng K.F. What happened in China during the 1918 influenza pandemic? / K.F. Cheng, P.C. Leung //International Journal of Infectious Diseases. – 2007. – v. 11. – p. 360-364.
11. Chowell G. Transmission dynamics of the great influenza pandemic of 1918 in Geneva,Switzerland: Assessing the effects of hypothetical interventions/ G. Chowell, C.E. Ammon, N.W. Hengartner, J.M. Hyman // Journal of Theoretical Biology. – 2006. – v. 241. – p. 193 –204.
12. Transmissibility and mortality impact of epidemic and pandemic influenza, with emphasis on the unusually deadly 1951 epidemic/ C. Viboud, T. Tam, D. Fleming [et all.] //Vaccine. – 2006. – v. 24. – p. 6701–6707.

## **ИНФОРМАТИВНОСТЬ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПАРАМЕТРОВ ОТНОСИТЕЛЬНО РИСКА ЗАБОЛЕВАНИЯ ТУЛЯРЕМИЕЙ В ПРИВОЛЖСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ**

**Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н.**

*ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»  
Роспотребнадзора, Оболensk*

Для прогнозирования ситуации по туляремии на территории Приволжского Федерального округа Российской Федерации были выбраны ретроспективные эпидемиологически важные параметры: положительные находки при исследовании мелких млекопитающих, иксодовых клещей, комаров, слепней и других объектов внешней среды, полученные при помощи иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования, зарегистрированные случаи заболевания человека туляремией, уровень вакцинопрофилактики и численность мелких млекопитающих. Анализ этих данных позволил выявить регионы, проблемные по этому заболеванию.

### **Введение**

Туляремия как зоонозная природно-очаговая инфекция по уровню регистрируемой заболеваемости занимает относительно скромное место в структуре инфекционной патологии человека в Российской Федерации. Вместе с тем актуальность проблемы определяется различными факторами и особенностями эпидемического проявления инфекции, возбудитель которой принадлежит к особо опасным микроорганизмам II группы патогенности (опасности), способен вызывать эпидемические проявления чрезвычайного характера и является потенциальным агентом биотерроризма.

В последние десятилетия туляремия проявляется спорадической заболеваемостью, групповыми случаями и эпидемическими вспышками. Эпидемиологической и эпизоотологической особенностью туляремии является стойкость природных очагов и широкая распространённость их на практически всей территории Российской Федерации. Это является следствием того, что возбудитель туляремии обнаруживает значительную устойчивость во внешней среде, особенно при низких температурах, природные очаги туляремии распространены в различных климатических зонах и приурочены к разнообразным ландшафтам, в циркуляцию вовлечено большое количество теплокровных животных и членистоногих. Во всех типах природных очагов основными носителями инфекции являются грызуны, хранителями – эктопаразиты (клещи, блохи, вши), а механическими переносчиками инфекции кровососущие насекомые.

Инфекция передается человеку всеми возможными способами (алиментарным, трансмиссивным, аэрогенным и контактным). Многообразие путей заражения человека туляремией обуславливает разнообразие клинических форм заболевания (бубонная, язвенно-бубонная, глазо-бубонная, ангинозно-бубонная, абдоминальная, респираторная, генерализованная и другие

формы), что в свою очередь приводит к большим сложностям диагностики данного заболевания. Клиническая диагностика туляремии затруднена особенно на ранней стадии из-за неспецифических симптомов, характерных для других инфекционных заболеваний. Возбудитель туляремии обладает высокой патогенностью для человека - ингаляция 10 - 50 бактерий приводит к развитию инфекционного процесса.

Целью данной работы был анализ эпидемически значимых показателей за предыдущие годы, визуализации параметров и дифференциация территории Приволжского Федерального округа по риску заболевания людей туляремией в 2016 году.

#### **Материалы и методы**

В работе использованы статистические сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях, данные по эпизоотической ситуации за обзорный период (с июня по октябрь 2015 года) в Российской Федерации и информация по вакцинации, полученные из Федерального центра гигиены и эпидемиологии.

#### **Результаты и обсуждение**

Приволжский Федеральный округ (ПФО) занимает около 6 % территории Российской Федерации, на которой проживает около 30 млн. человек, что составляет примерно 20% всего населения России.

Комплексная оценка риска заболевания туляремией на территории РФ включает большое количество показателей, чья эпидемиологическая значимость и информативность различна. Среди них наиболее важными мы считаем: эпизоотологический мониторинг, учет динамики заболеваемости, вакцинации населения и численности мелких млекопитающих.

**1. Данные эпизоотологического обследования.** Количество положительных находок, полученных при помощи бактериологических, иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования от мелких млекопитающих, иксодовых клещей, комаров, слепней, воды и других объектов внешней среды, особенно на территориях проживания, деятельности и отдыха населения определяют степень активности и опасности зооантропоноза для региона.

Инфицированные полевки и мыши были выявлены в 2015 году на территории Кировской, Нижегородской, Пензенской областей, в Республиках Мордовия и Татарстан. При исследовании клещей положительные результаты получены в 4 субъектах ПФО (в 3-х в аналогичном периоде прошлого года): в Удмуртской Республике, Самарской, Саратовской и Ульяновской областях. При исследовании погадок хищных птиц и помета хищных млекопитающих положительные результаты получены в 6 субъектах ПФО (в 4 в аналогичном периоде прошлого года): в Республиках Мордовия, Чувашия и Удмуртия, Кировской, Оренбургской и Самарской областях. При исследовании воды открытых водоёмов инфицированные пробы были обнаружены на территории Республики Татарстан. Антигены возбудителя обнаружены при исследовании гнезд грызунов в Удмуртской Республике.

**2. Количество заболевших людей в регионе.** К сожалению, именно больные люди чаще всего становятся индикаторами активности природного очага туляремии. За 2015 год на территории ПФО зарегистрировано 25 случаев заболевания человека туляремией и все они в Кировской области (таблица 1). Однако можно предположить, что случаев гораздо больше, так как много механизмов заражения человека и путей передачи возбудителя инфекции, клинические формы этого заболевания очень разнообразны, широко распространено лечение антибиотиками и диагностируют туляремию поэтому далеко не всегда. При этом во всех регионах РФ отмечается недостаточная настороженность врачей лечебно-профилактических учреждений при обращении за медицинской помощью больных с лимфаденитами различной локализации, лихорадками неустановленной этиологии и другими диагнозами, не исключающими заболевание туляремией. Многолетние эпизоотологические исследования на территории Российской Федерации демонстрируют высокую степень риска заражения населения в естественных условиях и резко возрастающую в антропогенных ландшафтах. В последние годы в большинстве регионов РФ на долю городского населения приходится до 70% от числа больных туляремией /1/.

**3. Уровень вакцинации и ревакцинации людей в регионе.** Эпидемическое благополучие региона по туляремии определяется уровнем иммунной прослойки населения. Вакцинация считается единственной долгосрочной мерой борьбы с туляремией. В Приволжском Федеральном

округе самая неблагополучная ситуация по туляремии из года в год в Нижегородской и Кировской областях, что связано с явно недостаточным объемом проводимых мероприятий по специфической и неспецифической профилактике туляремии. Полное отсутствие вакцинации и ревакцинации населения в соседнем регионе – республике Марий Эл – привело к появлению заболевания в этом регионе. Аналогичную ситуацию можно ожидать практически во всех регионах ПФО, кроме Саратовской, Оренбургской и Пензенской областей, где вакцинация и ревакцинация проводятся в более ощутимых объемах. Необходимо заметить, что объем вакцинации на территории всей Российской Федерации за последние 5 лет сократилась на треть, хотя численность населения за это время выросла почти на 4 млн. человек.

Таблица 1.

Результаты эпизоотолого-эпидемиологического надзора за туляремией в субъектах Приволжского Федерального округа.

	Субъекты ПФО	Количество случаев заболевания (год)						2015*	2015**	
		2009	2010	2011	2012	2013	2014			2015
1	Республика Башкортостан					5				
2	Республика Марий Эл		2				2			
3	Республика Мордовия							+	> 15%	
4	Республика Татарстан							+	> 15%	
5	Удмуртская Республика							+	> 15%	
6	Чувашская Республика							+		
7	Пермский край				5				> 15%	
8	Кировская область				20	3	2	25	+	> 15%
9	Нижегородская область	1	2	2	17	3	3		+	> 15%
10	Оренбургская область								+	> 15%
11	Пензенская область				1				+	
12	Самарская область								+	> 15%
13	Саратовская область					1			+	> 15%
14	Ульяновская область					3			+	> 15%

2015\* + - субъекты ПФО, на территории которых найдены положительные находки, полученные при помощи бактериологических, иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования от мелких млекопитающих, иксодовых клещей, комаров, слепней, воды и других объектов внешней среды;

2015\*\* - субъекты ПФО, на территории которых численность мелких млекопитающих (попаданий на 100 ловушко-суток) больше 15%.

**4. Численность мелких млекопитающих.** Критически высокая эпидемичность территорий обусловлена частыми и острыми эпизоотиями туляремии среди мелких млекопитающих, высокой вирулентностью и устойчивостью циркулирующих штаммов возбудителя и особенностями быта и хозяйственной деятельности местного населения. Часто, предвестником осложнения эпизоотической ситуации служит увеличение численности мелких млекопитающих /2/. При проведении учетов относительной численности мелких млекопитающих в летне-осенний период 2015 года, выше 15 % попадания (до 45,1%) зарегистрировано в лесокустарниковых станциях Республики Татарстан и Удмуртии, Самарской, Саратовской и Ульяновской областей. В открытых луго-полевых станциях высокий процент попадания (до 61,1%) зарегистрирован в Республиках Мордовия и Удмуртия, Нижегородской области, Оренбургской, Самарской и Ульяновской областях. Более 15 % (до 67,2%) попадания отмечено в околородных станциях Кировской и Оренбургской областях, в Удмуртии и Пермском крае.

Для визуализации эпидемиологически важных параметров использовали совмещение различных показателей на одной карте как проявление многоаспектности заболевания туляремией (Рис. 1)



Рисунок 1. Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка на территории ПФО в 2015 году.  
Распределение субъектов ПФО по сведениям:

- о положительных находках при исследовании мелких млекопитающих, иксодовых клещей, комаров, слепней и других объектов внешней среды, полученных при помощи иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования (клетчатое окрашивание региона),
- о низком уровне вакцинации (тёмное окрашивание региона),
- о случаях заболеваемости людей туляремией (черные кружки),
- о высокой численности мелких млекопитающих (черный квадрат).

На полученной картографической модели распределения субъектов ПФО по эпизоотической активности, заболеваемости людей туляремией, уровню вакцинации и высокой численности мелких млекопитающих, наглядно видно, что наиболее неблагоприятная ситуация по туляремии в 2015 году наблюдалась в Кировской области (все 4 негативных для развития инфекции фактора). В 2016 году наиболее вероятны случаи заболевания людей туляремией на территориях, соседних с Кировской областью, а также в Самарской и Ульяновской областях, где низкий уровень иммунопрофилактики, высокая численность мелких млекопитающих и широкая циркуляция возбудителя в природных биотопах.

Информативности использованных параметров достаточно для первоначальной дифференциации территории Приволжского Федерального округа по риску заболевания туляремией, но, безусловно, недостаточно для прогноза реализации этого риска. Из данных за 2015 год видно,

что активны природные очаги, высока численность мелких млекопитающих и низкий уровень вакцинопрофилактики в 11 из 14 субъектов ПФО. Кроме того, неизвестно какие климатические условия будут способствовать распространению инфекции и какие меры специфической и неспецифической профилактики туляремии будут приняты главами субъектов в текущем 2016 году, ослабление которых неизбежно приводит к вспышкам болезни.

Литература:

1. Мещерякова И.С., Михайлова Т.В., Демидова Т.Н., Кормилицына М.И. Эпизоотическая и эпидемическая активность природных очагов туляремии различных ландшафтно-эпидемиологических типов в период 2009-20014 гг. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2016;1, 42-46.

2. Транквилевский Д.В., Квасов Д.А., Мещерякова И.С., Михайлова Т.В., Кормилицына М.И., Демидова Т.Н., Ананьина Ю.В., Савельева О.В., Малкин Г.А., Мутных Е.С., Коротина Н.А., Дзагурова Т.К., Простаков Н.И., Сурков А.В., Куролап С.А., Клепиков О.В., Стёпкин Ю.И., Чубирко М.И., Жуков В.И. Вопросы организации мониторинга природных очагов инфекций опасных для человека. Планирование, проведение и анализ результатов полевых наблюдений. Здоровье населения и среда обитания. 2014; 8(257), 38-43.

## НОВЫЕ ИНФЕКЦИИ: «ЗАЛ ОЖИДАНИЯ» ИЛИ НАЧАЛО ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПУТИ

Лапидус А.Ю.

*Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород*

Новые инфекции занимают важное место в современной эпидемиологической науке. Имеются основания полагать, что среди последствий их распространения могут быть не только медицинские и социально-экономические последствия, но и их роль как биологической угрозы в перспективе. Попытки всестороннего изучения и классификации таких нозологических форм предпринимались разными авторами. Одним из российских научных трудов, получивших широкую известность, содержащих критический анализ современных представлений по эпидемиологии и классификации новых инфекций является монография В.В. Шкарина, О.В. Ковалишеной (2012). Особый интерес в ней, на мой взгляд, представляет раздел книги, касающийся инфекционных болезней, сгруппированных авторами в отдельный кластер малоизученных инфекций и возбудителей, который был назван залом ожидания. Информация по указанным заболеваниям, без преувеличения, остается terra incognita и требует дальнейшего изучения, что и определило необходимость представленного исследования.

**Цель работы:** выяснить остаются ли инфекции из зала ожидания в фокусе внимания ученых и оценить масштабы распространения болезней в период с 2012 года по настоящее время, по данным опубликованных исследований.

**Материалы и методы.** Был произведен поиск публикаций за 2012-2015 гг. по ключевым словам без ограничений по языку в базах данных PubMed и электронной научной библиотеке eLibrary.ru. Временной точкой отчета информационного поиска послужил год выпуска указанной монографии. При этом предполагалось, что в данный период времени были опубликованы новые результаты исследований по инфекциям «зала ожидания».

**Результаты исследования.** В целом, из 35 нозологий, всех из которых имеют вирусную этиологию, отнесенных в эту группу, были обнаружены публикации, касающиеся только 12 болезней (возбудителей). Несмотря на небольшой объем полученной ранее не известной информации, сам факт появления публикаций за последние четыре года может указывать на сохранение интереса к новым инфекциям «зала ожидания» у исследователей различного профиля.

Объектами исследований, результаты которых были опубликованы в 2012-2015 гг., выступили следующие нозологии (потенциальные возбудители): лихорадка Orungo, американская москит-

ная лихорадка Punta-Togo, африканская буньявирусная лихорадка Plesha, геморрагическая лихорадка Альхумра, геморрагическая лихорадка, вызванная вирусом Lujo, лихорадка Quarantfil, лихорадка Chandipura, североамериканская лихорадка Cashe Valley, южноамериканская С-вирусные лихорадки Marutuba и Сагагаи, вариант сидорнавирусной инфекции Ванна – лихорадка, ассоциированная с вирусом Balaton, а также вирус Хурдун, уже признанный потенциальным возбудителем новой инфекционной патологии. Информацию, полученную учеными за последние годы, мы сгруппировали по следующим направлениям: новые сведения о возбудителе (его свойствах, таксономическом положении), уточнение эпидемиологических характеристик заболевания (напр., особенности механизма передачи вирусов, изменение ареала распространения), новые данные об этиотропной терапии. заболевания. Кроме того, в 2015 году были опубликованы сведения о не известном ранее вирусе Itaуа, который также удовлетворяет признакам новой инфекции.

**Заключение** Таким образом, проведенный анализ публикаций, появившихся за последние 4 года, позволяет проследить процесс распространения некоторых возбудителей малоизученных инфекций, говорить о переходе таких нозологий из «зала ожидания» в группу инфекций, требующих эпидемиологического надзора и контроля (в частности, лихорадка Альхумра). Кроме того, полученные данные могут служить свидетельством обоснованности практики дифференцирования подобных новых инфекций в отдельную группу.

## **К ВОПРОСУ О СОЧЕТАННОСТИ МИКСТ-НОСИТЕЛЬСТВА ДНК/РНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ В КЛЕЩАХ *IXODES PERSULCATUS* P.SCH. В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ЗАПАДНОЙ ЧАСТИ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ**

**Леонтьева С.А., Брагина Е.А., Катин А.А.**

*ФБУН « Тюменский научно исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, Тюмень*

Проблема заболеваний, переносчиками которых являются иксодовые клещи, в последнее десятилетие приобретает все большее значение для многих регионов России, и в первую очередь для Западной Сибири. На территории Западной Сибири отмечается практически повсеместная сочетанность природных очагов иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) и клещевого энцефалита (КЭ). Имеются очаговые территории, характеризующиеся сочетанностью трех и более трансмиссивных инфекций: иксодового клещевого боррелиоза, клещевого энцефалита, клещевого риккетсиоза (КР), гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) и моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) [1]. Это приводит к затруднению в диагностике, профилактике и лечении.

Основным переносчиком клещевых инфекций сибирского нозоареала является *Ixodes persulcatus*. Он служит удобной моделью для исследования паразитарных отношений между возбудителями клещевых инфекций и их переносчиком. Микропопуляции различных вирусов, риккетсий, бактерий и других микроорганизмов образуют в одной особи клеща своеобразный паразитоценоз или микросообщество (по терминологии Ю.С. Балашова). В организме клеща, как правило, не возникает антагонистических отношений между разными возбудителями, поскольку они преимущественно локализуются в определенных органах и тканях или даже в определенных клеточных структурах, представляющих собой свойственные им своеобразные экологические ниши. В инфекционной патологии человека, при обозначении первенствующей нозоформы, возможно только одно обстоятельство: какая из одновременно протекающих микст-инфекций проявляется в более тяжелой форме, хотя не исключается взаимовлияние каждой из них на степень клинического проявления [2]. В частности, при смешенных инфекциях зараженные клещи вызывают ИКБ в 30 раз чаще, чем КЭ. [3].

**Цель работы:** установление микст-носительства ДНК/РНК возбудителей клещевых инфекций в отдельных особях *Ixodes persulcatus*.

**Материалы и методы:** Материал собран в природном очаге п. Лесозавод Нижнетавдинского

района Тюменской области (подзона осиново-березовых лесов) в 2015 году. Сбор материала проводили в пик активности клещей (апрель, июнь). Численность клещей в этот период составляла от 30 до 35 особей на км/маршрута. Из собранных клещей методом ПЦР было исследовано 113 особей.

Аmplификацию проводили наборами производства «ИнтерЛабСервис», г. Москва - АмплиСенс TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophillum, E.chaffeensis/E.muris-FL в режиме реального времени. Для подтверждения существенности различий сравниваемых величин с вероятностью 99%, использовали критерий «t» - не менее 2,6 [4].

**Результаты исследования и обсуждение.** Из 113 исследованных клещей, носителями изучаемых возбудителей клещевых инфекций, оказались 73, что составляет 64,6%. Из общего количества клещей - носителей - основной процент моно-носительства приходится на боррелии:  $65,75 \pm 5,5\%$  (табл.1). С одинаковой частотой выделялась в клещах ДНК эрлихий и анаплазм -  $2,73 \pm 1,9\%$ . Следует отметить, что РНК клещевого энцефалита в виде моно-носительства в клещах не выделено.

Таблица 1

Особенности моно-носительства специфических нуклеиновых кислот изучаемых возбудителей клещевых инфекций в исследуемой популяции переносчиков

общее число переносчиков-носителей РНК/ДНК изучаемых возбудителей клещевых инфекций	изучаемые возбудители клещевых инфекций	Показатели мононосительства ДНК/РНК изучаемых возбудителей		Существенность различий, (t)
		Абс.	%	
73	КЭ	0	0	10,8
	ИКБ	48	$65,75 \pm 5,5$	
	МЭЧ	2	$2,73 \pm 1,9$	
	ГАЧ	2	$2,73 \pm 1,9$	

По данным Рудаковой С.А. (2014 г) в Омской области инфицированность исследованных клещей *I.persulcatus* боррелиями (методом ПЦР) составила 54,2%, *A.phagocytophillum* – 3,6%, *E.muris* - 2,9% , *E.chaffeensis* – 1,2%. В Новосибирской области инфицированность боррелиями составила 52,0%, *A.phagocytophillum* - 0,1%, *E.muris* – 6,1%, *E.chaffeensis* – 0,9%.

По нашим данным, при микст-носительстве наиболее часто встречалось сочетание: ИКБ + МЭЧ; КЭ + ИКБ + МЭЧ (табл.2). Был выявлен один случай содержания в клеще четырех ДНК/РНК возбудителей клещевых инфекций одновременно.

Таблица 2

Варианты сочетания исследуемых нозоформ

варианты сочетанности	Количество	Абсолютное число	Относительное число, %
ИКБ, МЭЧ		7	$9,58 \pm 3,4$
КЭ, ИКБ		3	$4,1 \pm 2,3$
ИКБ, ГАЧ		3	$4,1 \pm 2,3$
МЭЧ, ГАЧ		1	$1,36 \pm 1,35$
КЭ, ИКБ, МЭЧ		5	$6,84 \pm 2,95$
КЭ, ИКБ, ГАЧ		2	$2,73 \pm 1,9$
КЭ, ИКБ, МЭЧ, ГАЧ		1	$1,36 \pm 1,35$

Примечание: различия статистически незначительны, t в пределах от 1,3 до 2,25

Интерес представляло также выяснить какую долю (в %) переносчиков составили только клещи-носители РНК клещевого энцефалита в сочетании с их носительством ДНК боррелий, эрлихий и анаплазм, по сравнению с долей клещей – носителей только ДНК боррелий или ДНК эрлихий и анаплазм, также с аналогичными сочетаниями носительства изучаемых инфекций (табл.3)

Таблица 3

Особенности состава переносчиков-носителей РНК и ДНК только одной нозоформы в сочетании с другими нозоформами в изучаемой популяции клещей

Количество исследованных клещей	Изучаемые нозоформы	Показатели сочетанного носительства		Существенность различий
		Абс.	%	
113	КЭ	11	9,7±2,78	Различия существенны только между крайними показателями (18,58 и 6,19), t=2,8
	ИКБ	21	18,58±3,65	
	МЭЧ	14	12,38±3,0	
	ГАЧ	7	6,19±2,26	

Продолжение таблицы 3

Изучаемые нозоформы	Число клещей в сочетании	Особенности сочетания							МЭЧ	ГАЧ
		КЭ+ ИКБ	КЭ+ ИКБ+ МЭЧ	КЭ+ ИКБ+ ГАЧ	КЭ+ ИКБ+ ГАЧ+ МЭЧ	ИКБ+ МЭЧ	ИКБ+ ГАЧ	МЭЧ+ ГАЧ		
КЭ	11	3	5	2	1	0	0	0	0	0
ИКБ	21	3	5	2	1	7*	3*	0	7*	3*
МЭЧ	14	5*	5*	0	1	7	0	1*	-	1*
ГАЧ	7	2*	0	2*	1	0	0	1*	1*	-

Примечание: \* - дублирование в целях упрощения таблицы

Предварительные результаты исследований, представленные в таблице 3, показывают, что наиболее часто микст-носительство специфических нуклеиновых кислот определяется в группе клещей-носителей ДНК боррелий. Только в одном случае сочетанного носительства (в частности с МЭЧ и ГАЧ) был зафиксирован нулевой результат. По сравнению с этой группой переносчиков, в группе клещей – носителей РНК клещевого энцефалита, микст-носительство с нулевым результатом было зафиксировано в 5 случаях (в сочетании: ИКБ+МЭЧ, МЭЧ+ГАЧ, ИКБ+ГАЧ, МЭЧ, ГАЧ). Наиболее редко в указанных группах клещей встречается сочетание носительства всех изучаемых РНК/ДНК возбудителей клещевых инфекций (в одном случае), а также сочетание носительство ДНК эрлихий и анаплазм.

#### Выводы:

Установлено, что процент мононосительства РНК КЭ, а также ДНК МЭЧ и ГАЧ в популяции изучаемых переносчиков составил от 0 до 3,0 % и имеет существенные статистические различия (t=10,8) с аналогичным показателем для клещей – носителей ДНК боррелий (65,75%).

Микст - носительство специфических РНК и ДНК изучаемых возбудителей клещевых инфекций имеет широкое распространение в клещевых популяциях – это явление регистрируется в каждом 5 переносчике.

Наиболее редко встречается сочетание всех 4 возбудителей клещевых инфекций, и одновременное присутствие ДНК эрлихий и анаплазм.

Можно предположить, что заражение клеща одним из возбудителем приводит к снижению его естественной толерантности к другому и уменьшает обычной для этой пары видов паразита и хозяина заражающую дозу [5].

Литература:

1. Рудакова С.А. Иксодовые клещевые боррелиозы в сочетанных природных очагах Западной Сибири / С.А. Рудакова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2000. - №3. - С. 151-155.
2. Коренберг Э.И. Изучение и профилактика микстинфекций, передающихся иксодовыми клещами / Э.И. Коренберг // Вестник РАМН. – 2001. - №11. – С. 41-45.
3. Боррелии как вероятные антагонисты вируса клещевого энцефалита: паразитологический и клинический аспекты проблемы / А.Н.Алексеев [и др.] // Мед. паразитология и паразитарные болезни. – 2001. - №. - С. 3-11.
4. Мельников В.Г. Медицинская кибернетика. Киев 1978.170 с.
5. Наумов Р.Л. Микстинфекции у клещей: правило или исключение?/ Р.Л.Наумов, И.С. Васильева // Мед. паразитология и паразитарные болезни. – 2002. - №4. – С. 27-33.

## **ВАКЦИНАЦИЯ ПРОТИВ СЕЗОННОГО ГРИППА И АУТОИММУННЫЙ ГОМЕОСТАЗ У ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЛИЦ**

**Матвейчев А.В., Цыганова М.И., Моханова Е.В., Талаева М.В., Никитина З.И., Коптелова В.Н.**

*ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

### **Введение.**

Профилактическая вакцинация является одной из наиболее эффективных мер по защите широких масс населения от инфекционных заболеваний. В то же время, будучи мощным стимулятором всех форм иммунных реакций, вакцина имеет малый, но достоверно возможный риск вызвать у реципиента ряд негативных последствий, в том числе, аутоиммунного генеза. Подтверждением этому служат клинические случаи, описывающие развитие аутоиммунных заболеваний у прежде здоровых лиц, получивших вакцинацию, и воспроизводимые в животных моделях предполагаемые механизмы такой индукции [1]. Вероятность развития подобных негативных событий при вакцинации здоровых людей считается минимальной, однако, существует мнение о том, что значимость и число случаев драматического изменения аутоиммунного гомеостаза существенно недооценена [2,3]. Наиболее часто вопросы точности оценки изменений аутоиммунитета встают в отношении широко применимых вакцин против социально значимых бактериальных и вирусных инфекций [4], в частности, вакцины против сезонного гриппа.

Исходное внимание к вакцине против сезонного гриппа привлекли вспышка свиного гриппа в США (штамм A/New Jersey/76) в 1976-1977 годах и последовавшие профилактические меры. В результате интерпретации антигенной структуры данного вируса, как имеющей схожесть со структурой возбудителя “испанки”, в США, несмотря на отсутствие распространения возбудителя за пределы точки его выявления (тренировочный лагерь Форт Дикс, штат Нью-Джерси) была развернута программа вакцинации, в ходе которой было введено более 40 миллионов доз вакцины. При этом среди вакцинированных было отмечено развитие синдрома Гийена-Барре (СГБ) с частотой 1 случай на 100000 введенных доз вакцины, что превышало фоновую заболеваемость в 5-10 раз [5, 6, 7], не менее 25 человек погибло [8].

Обнаружение повышенной заболеваемости СГБ вследствие вакцинационной кампании 1976-77 годов породило закономерную озабоченность среди ученых и представителей здравоохранения, а также вызвало пристальное внимание к прочим вакцинным препаратам против сезонного гриппа. На данный момент известно, как минимум, 10 опубликованных исследований, затрагивающих взаимосвязь вакцинации против гриппа после 1977 года и развитие СГБ, 7 из которых не отмечают повышения риска развития аутоиммунной патологии, 3 – декларируют небольшое, но статистически достоверное повышение риска развития СГБ [9]. Также, ряд работ опосредованно указывает на возможность связи вакцинации против гриппа с иными состояниями предположительно аутоиммунного генеза [10].

Принимая во внимание изложенные выше данные, мы приняли решение экспериментально оценить изменение показателей аутоиммунного гомеостаза у здоровых лиц, подвергающихся вакцинации против сезонного гриппа.

#### **Материалы и методы**

Объектами исследования стали образцы цельной крови и сыворотки крови лиц – медицинских работников и пациентов гастроэнтерологического профиля (ср. возраст  $48 \pm 12$  лет,  $n=31$ ), разделенные на группы “Контроль” и “Опыт”. Лица, относящиеся к группе “Опыт” (19 человек), получили вакцинацию против сезонного гриппа штаммов 2014-2015 годов вакциной “Гриппол”, (НПО “Петровакс-Фарм”, Россия), забор крови осуществлялся спустя 3-6 месяцев после вакцинации. Лица группы “Контроль” (12 человек) в сезон 2014-2015 годов от гриппа не прививались. Лица обеих групп также не имели достоверной истории аутоиммунных заболеваний, в течении двух лет не прививались иными вакцинами и не имели историю ОРЗ в течении полугода.

Из образцов цельной крови данных лиц путем градиентного центрифугирования выделялись мононуклеарные клетки, среди которых цитофлюорометрически оценивалось содержание Т-регуляторных клеток (Т-рег) как клеток с фенотипом  $CD4+CD25+FoxP3+$ , а также Т-хелперов 17 типа (Th17), как клеток фенотипа  $CD4+CD161+$ .

В образцах сыворотки данных лиц путем твердофазного иммуноферментного анализа оценивалось содержание аутоантител к нативной ДНК (анти-ДНК) классов IgM и IgG, аутоантител к кардиолипину (анти-КЛ) классов IgM и IgG, и аутоантител к тиреоглобулину (анти-ТГ), путем турбидиметрии – содержание высоко- и низкомолекулярных циркулирующих иммунных комплексов (ВСС и НМС ЦИК соответственно). Также, с помощью реакции пассивной гемагглютинации оценивалось содержание свободного ферритина и ревматоидного фактора (РА) как маркеров аутоиммунных заболеваний и хронического воспаления.

Статистическую достоверность оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни (титры ревматоидного фактора и аутоантител к тиреоглобулину) или непарного T-критерия Стьюдента (все остальные данные).

#### **Результаты и обсуждение.**

Как известно, аутоантитела относятся к одному из важнейших маркеров изменения аутоиммунного гомеостаза, давно и успешно применяемого в клинической практике, и не утратившему своей актуальности. Так, антинуклеарные антитела, к которым относятся анти-ДНК, определяются при ряде системных аутоиммунных заболеваний, в том числе системной красной волчанке, ревматоидном и идиотипическом ювенильном артрите, системной склеродермии, аутоиммунных гепатитах, вирусных инфекциях и ряде иных патологий. Наиболее распространенными нозологиями, при которых отмечается значительное повышение содержания аутоантител к кардиолипину – системная красная волчанка (СКВ) и антифосфолипидный синдром. Содержание данных факторов у доноров-участников исследования оценивали с помощью экспериментальных серий ИФА-диагностикумов, разработанных коллективом лаборатории иммунохимии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, результат выражался в виде индекса: OD образца/OD внутреннего контроля (средняя OD клинически здоровых доноров крови различных возрастных групп,  $n=100$ ).

Согласно полученным нами данным, введение вакцины “Гриппол” не приводило к достоверным изменениям в содержании данных факторов (средний индекс для IgM-анти-ДНК у лиц контрольной группы составил  $2,37 \pm 0,18$ , у вакцинированных лиц  $2,17 \pm 0,13$ , тенденция к понижению недостоверна; средний индекс для IgG-анти-ДНК у лиц контрольной группы составил  $1,75 \pm 0,1$ , у вакцинированных лиц  $1,69 \pm 0,05$ ; средний индекс для IgM-анти-КЛ у лиц контрольной группы составил  $1,87 \pm 0,13$ , у вакцинированных лиц  $1,9 \pm 0,07$ ; средний индекс для IgG-анти-КЛ у лиц контрольной группы составил  $2,14 \pm 0,16$ , у вакцинированных лиц  $2,02 \pm 0,15$  тенденция к понижению недостоверна).

Как и в наших прошлых работах, исследование титра аутоантител к тиреоглобулину было использовано в качестве модели оценки редких, нехарактерных аутоиммунных сдвигов, свя-

зывается с вакцинацией (ситуация развития аутоиммунного сдвига, при котором отсутствует химическое или стерическое сходство между введенным антигеном и мишенью последующего аутоиммунного ответа). Данные о влиянии вакцины “Гриппол” на продукцию аутоантител к тиреоглобулину в таблице 1. Как можно видеть, “Гриппол”, подобно остальным вакцинам, оцененным нами за 2011-2015 годы, не изменял продукции анти-ТГ.

Таблица 1.

Статистическая обработка данных о влиянии вакцинации против гриппа на продукцию аутоантител к тиреоглобулину.

Сумма рангов “До вакцинации”	211,5
Сумма рангов “После вакцинации”	253,5
U эмпирическое	67
U критическое 0,01	50
U критическое 0,05	65
Вывод	Зона незначимости

Ревматоидный фактор (РФ) представляет собой аутоантитела различных субклассов против Fc-фрагмента человеческих IgG. Исследование уровня РФ применяется в клинической практике уже более 50 лет и в данный момент является одним из классификационных критериев ревматоидного артрита. Результаты оценки влияния вакцинации против гриппа на содержание РФ и статистическая обработка этих данных представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Статистическая обработка данных о влиянии вакцинации против гриппа на продукцию ревматоидного фактора.

Сумма рангов “До вакцинации”	215,5
Сумма рангов “После вакцинации”	280,5
U эмпирическое	90,5
U критическое 0,01	56
U критическое 0,05	72
Вывод	Зона незначимости

Как можно видеть из представленных материалов, под влиянием вакцины “Гриппол” изменения в продукции ревматоидного фактора не наблюдаются. Уровень же ферритина испытывает тенденцию к снижению, которая, однако, не является статистически достоверной (среднее содержание ферритина у лиц контрольной группы составило 343,75±49 мкг/л, у вакцинированных лиц 279,47±37,8 мкг/л).

Наряду с ревматоидным фактором, циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) являются маркерами длительной активации иммунной системы. В низких концентрациях оба типа данных маркеров могут обнаруживаться у клинически здоровых лиц, в особенности старшего возраста, однако длительное повышенное их содержание является высокочувствительным, хотя и неспецифическим признаком патологии. Нами было показано, что введение вакцины “Гриппол” не оказывает статистически достоверного влияния на образование ЦИК (среднее содержание ВМС ЦИК у лиц контрольной группы составило 386,4±52,46 условных единиц, у вакцинированных лиц 356±11,18 условных единиц; средний индекс для НМС ЦИК у лиц контрольной группы составил 117,8 ±27,8, у вакцинированных лиц 78,31±11,18, обе тенденции к понижению не достоверны). Лабораторные нормы при этом составляют для ВМС ЦИК 380 условных единиц, для НМС ЦИК – 50 условных единиц.

В большинстве доступных литературных работ, оценивающих безопасность и эффектив-

ность вакцинации, основное внимание авторов направленно на гуморальные факторы аутоиммунитета, в то время как оценке работы клеточных факторов придается незаслуженно малое значение, и только в последние годы появились работы, направленные на оценку содержания и функций клеток, участвующих в развитии и прекращении аутоиммунных ответов. К таковым клеткам традиционно относят Th17 и Т-регуляторные клетки. Если Th17 клетки являются индукторами и эффекторами аутоиммунных реакций, то Т-регуляторные клетки отвечают за поддержание и сохранение аутоотолерантности.

В ходе работы нами показано, что введение вакцины “Гриппол” не оказывало сколь-либо значимого влияния на процентное содержание указанных субпопуляций. Так, в крови лиц контрольной группы содержалось в среднем  $2,76 \pm 0,31\%$  CD4+CD25+FoxP3+ Т-регуляторных клеток, для группы вакцинированных лиц данное значение составляло  $2,7 \pm 0,4\%$ . Содержание CD4+CD161+Th17 у контрольной группы составляло  $9,66 \pm 0,8\%$ , у вакцинированных лиц –  $10,11 \pm 0,9\%$ . Статистически достоверных различий нами зафиксировано не было.

Полученные данные вполне соответствуют отмеченному нами отсутствию изменений в продукции факторов гуморального аутоиммунитета.

Таким образом, в ходе проведения данной работы нами было установлено, что введение вакцины “Гриппол” (производства НПО “Петровакс-Фарм”, Россия) против сезонного гриппа 2014-2015 годов (А / Калифорния / 07 / 2009 (H1N1) pdm09 - подобный вирус; А / Виктория / 361 / 2011 (H3N2) - подобный вирус; В / Массачусетс / 2 / 2012 - подобный вирус) не приводит у вакцинированных лиц к достоверным изменениям аутоиммунного гомеостаза, как на клеточном, так и на гуморальном уровнях. На основании полученных данных, мы считаем принципиально весьма низкой вероятностью развития негативных последствий вакцинации против гриппа, связанных с системой аутоиммунитета – как минимум, в среднесрочной перспективе (3-6 месяцев после вакцинации). Полученные данные подтверждают имеющиеся в научной литературе работы о безопасности вакцин против сезонного гриппа, выпущенных после 1976-77 годов.

#### Литература:

1. Salemi S. Vaccinations and autoimmune diseases / S. Salemi, R. D'Amelio // *Int. Rev. Immunol.* – 2010. – V. 29. – P. 239–246.
2. Geier D.A. A case-control study of serious autoimmune adverse events following hepatitis B immunization / D.A. Geier, M.R. Geier // *Autoimmunity.* – 2005. – V. 38(4). – P. 295–301.
3. Hernбn M.A. Recombinant hepatitis B vaccine and the risk of multiple sclerosis: A prospective study / M.A. Hernбn, S.S. Jick, M.J. Olek, H. Jick // *Neurology.* – 2004; – V. 63: – P. 838–842.
4. Salemi S. Could autoimmunity be induced by vaccination? / S. Salemi, R. D'Amelio // *Int. Rev. Immunol.* – 2010; – V. 29: – P. 247–269.
8. Belshe R.B. Implications of the emergence of a novel H1 influenza virus / R.B. Belshe // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 360. – P. 2667–2668.
9. Marks J.S. Guillain–Barr´e syndrome in recipients of A/New Jersey influenza vaccine / J.S. Marks, T.J. Halpin // *J.A.M.A.* – 1980. – V. 243. – P. 2490–2494
10. Schonberger L.B. Guillain–Barr´e syndrome following vaccination in the National Influenza Immunization Program, United States, 1976–1977 / L.B. Schonberger, D.J. Bregman, J.Z. Sullivan–Bolyai, et al. // *Am. J. Epidemiol.* – 1979. – V. 110. – P. 105–123.
11. Langmuir A.D. Guillain–Barrй syndrome: the swine influenza virus vaccine incident in the United States of America, 1976–77: preliminary communication / A.D. Langmuir // *J. R. Soc. Med.* 1979. – V. 72(9). – P. 660–669.
12. Sejvar J.J. Guillain-barrй syndrome following influenza vaccination: causal or coincidental? / J.J. Sejvar, D. Pfeifer, L.B. Schonberger // *Curr. Infect. Dis. Rep.* – 2011. – V. 13(4). – P. 387-398.
13. Lind A., A/H1N1 antibodies and TRIB2 autoantibodies in narcolepsy patients diagnosed in conjunction with the Pandemrix vaccination campaign in Sweden 2009-2010 / A. Lind, A. Ramelius, T. Olsson, et al. // *J. Autoimmun.* – 2014. – V. 50. – P. 99-106.

## НОВАЯ ПРОГРАММА ДЛЯ ЭВМ В ОБЛАСТИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

Моргачева Я. В.<sup>1</sup>, Горшков А. С.<sup>1</sup>, Саухат С. Р.<sup>2</sup>, Рындич А. А.<sup>1</sup>, Солтанова О. М.<sup>1</sup>, Суладзе А. Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии», Ростов-на-Дону;

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

### Резюме.

С целью оптимизации эпидемиологического мониторинга за ВИЧ-инфекцией в федеральных округах и субъектах Российской Федерации в Южном окружном центре по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» разработана и апробирована программа для ЭВМ «Информационно-аналитическая система эпидемиологического мониторинга за ВИЧ-инфекцией «КВИК» (далее - Программа). Программа включает как стандартные опции по сбору, хранению, поиску эпидемиологически значимой информации, так и реализует возможность ввода и обработки данных о молекулярно-биологических характеристиках возбудителя. Использование системы управления базами данных (СУБД) «1С:Предприятие V.7.7» позволило проводить углубленный статистический анализ первичной информации с использованием различных методов математической статистики, включить в Программу конструктор свободных запросов и формировать не только утвержденные, но и самостоятельно создаваемые статистические отчетные формы.

Разработанная Программа позволяет комплексно и стандартизировано проводить многоаспектный анализ эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции (оценивать уровень, структуру и динамику эпидемиологически значимых показателей с учетом молекулярно-биологических характеристик возбудителя), оценивать в автоматическом режиме эффективность мероприятий по противодействию эпидемии.

### Введение.

В силу нарастания угроз от продолжения эпидемии ВИЧ-инфекции, ее возможной генерализации, в настоящее время возрастает актуальность проведения оперативного многофакторного анализа постоянно меняющейся эпидемиологической ситуации, что невозможно осуществить без использования современных компьютерных информационно-аналитических систем. Важность оптимизации системы обработки информационных потоков для обеспечения эффективного эпиднадзора за ВИЧ-инфекцией была подчеркнута на совещании в Правительстве РФ от 23.10.2015 г.

Федеральным научно-методическим центром по профилактике и борьбе со СПИДом создана и поддерживается единая база данных и регистр случаев ВИЧ-инфекции, СПИДа, обследований на ВИЧ и исходов ВИЧ-инфекции с использованием разработанного программного средства информационно-аналитической системы «АСОДОС». Вышеуказанной системой в 2000 году были обеспечены практически все территориальные центры СПИД.

К концу 2004 года Тюменским областным центром по профилактике и борьбе со СПИДом была разработана компьютерная информационно-аналитическая система для осуществления эпидемиологического мониторинга за ВИЧ-инфекцией в субъектах Российской Федерации, которая была также предложена многим территориальным центрам СПИД. Имеется информация о том, что в некоторых территориальных центрах СПИД разработано и используется оригинальное программное обеспечение информационно-аналитических систем.

Обязательным условием эффективного использования программных средств является периодическая их модификация. Это объясняется необходимостью учета всех достижений в изучении анализируемой проблемы. Применительно к эпидемиологическому мониторингу за ВИЧ-инфекцией речь может идти о появлении новых научных методик в исследовании возбудителя,

новых направлений анализа уже имеющейся или дополнительно собранной информации, содержащей важные эпидемиологические данные.

С момента установки в 2000–2004 годах компьютерных информационно-аналитических систем изменились подходы к расчету эпидемиологически значимых показателей, в том числе, характеризующих активность эпидемического процесса и эффективность противодействия ВИЧ-инфекции. ВОЗ/ЮНЭЙДС была предложена целая система индикаторов мониторинга и оценки эффективности функционирования национальных систем противодействия эпидемии ВИЧ/СПИД [1].

В 2007 году Министерством здравоохранения и социального развития России были утверждены ряд нормативных документов, регламентирующих единообразие подходов к анализу эпидемиологически значимой информации в отношении ВИЧ-инфекции всеми ЛПО [2, 3]. Вместе с тем, знакомство с аналитическими материалами территориальных центров СПИД показывает, что учет некоторых категорий больных ВИЧ-инфекцией ведется по-разному. В связи с этим проведение сравнительного анализа эпидемиологической ситуации по данным отчетов из разных субъектов РФ может привести к некорректным результатам и принятию де-факто необоснованных решений.

Поэтому представляется важным обеспечить возможность проведения сравнительного анализа эпидемиологической ситуации в различных субъектах РФ на окружном уровне с соблюдением единообразных подходов к статистическому учету и анализу персонифицированной информации независимо от существующих особенностей этих подходов в каждом из субъектов РФ, включенных в федеральные округа. Решению данной задачи должна способствовать созданная Программа.

Так, показатели распространенности ВИЧ-инфекции рассчитываются не как кумулятивное число всех выявленных за предшествующий период больных, а как показатели, отражающие общее количество людей, живущих с ВИЧ/СПИДом среди определенной группы населения на определенный момент времени с учетом естественного и механического движения населения [2]. На окружном уровне осуществления эпидемиологического надзора возникла потребность анализа распределения больных ВИЧ-инфекцией не только по субъектам РФ, но и муниципальным образованиям. В соответствии с изменением требований ВОЗ/ЮНЭЙДС к страновым отчетам о прогрессе в области противодействия эпидемии ВИЧ/СПИДа возникла потребность в анализе распределения случаев ВИЧ-инфекции по вновь определенным возрастным группам населения и т.д.

Указанные изменения в подходах к эпидемиологическому анализу требуют существенной переработки алгоритмов программного обеспечения для правильного расчета статистических показателей и их оценки. Вместе с тем, полученные в вышеуказанный период программные продукты используются в неизменном виде по настоящее время в силу того, что модифицированные разработчиками версии в территориальные центры СПИД не поставлялись.

Существенным недостатком информационного блока используемых компьютерных аналитических систем является отсутствие возможности анализировать проявления эпидемического процесса с учетом молекулярно-биологических характеристик циркулирующих штаммов ВИЧ, что не позволяет осуществлять эпиднадзор за ВИЧ-инфекцией в соответствии с действующими нормативными документами [4, 5].

Необходимость модификации таких систем объясняется также наблюдаемым физическим и моральным старением аппаратуры, программного обеспечения, а также используемых средств защиты анализируемой информации.

Кроме того, упомянутые программные средства уже не позволяют оперативно обрабатывать растущий объем эпидемиологической информации, что связано с ограниченными возможностями СУБД Access, использованной для разработки этих систем.

Таким образом, существующие программные средства в области эпиднадзора за ВИЧ-инфекцией морально устарели. Кроме того, они не обеспечивают адекватного анализа возросших информационных потоков и не позволяют проводить эпидемиологический надзор в соответствии

с современными национальными [2, 3, 4, 5, 6] и международными требованиями. В связи с этим становится весьма актуальной разработка информационно-аналитической системы для оптимизации эпидемиологического мониторинга за ВИЧ-инфекцией в России.

#### **Цель исследования.**

Разработать программу для ЭВМ «Информационно-аналитическая система «КВИК» на платформе СУБД «1С:Предприятие V.7.7» для оптимизации эпидемиологического мониторинга ВИЧ-инфекции в федеральных округах и субъектах Российской Федерации.

#### **Материалы и методы.**

При создании Программы использованы следующие данные:

- Форма 266/у «Оперативное донесение о лице, в крови которого при исследовании в реакции иммуноблота выявлены антитела к ВИЧ»,
  - Форма № 309/у «Извещение о ребенке, рожденном от ВИЧ-инфицированной женщины»,
  - Форма № 310/у «Донесение о снятии с диспансерного наблюдения ребенка, рожденного ВИЧ-инфицированной матерью»,
  - Форма № 311/у «Донесение о подтверждении диагноза у ребенка, рожденного ВИЧ-инфицированной матерью»,
  - Донесения об установлении причин заражения ВИЧ-инфицированного, об установлении диагноза СПИД, смерти ВИЧ-инфицированного или больного СПИДом,
  - Бюллетень Госкомстата «Численность населения по полу и возрасту на 1 января 2009 – 2014 годов»,
  - Бюллетень Госкомстата «Численность населения по муниципальным образованиям на 1 января 2009 – 2014 годов»,
  - Донесения о результатах исследования по определению лекарственной резистентности ВИЧ,
- Программа разработана на IBM PC (совместимых ПК) при помощи языка 1с 7.7, поддерживается в операционной среде MS Windows XP, Vista, 7, 8, 8.1.

При создании Программы использован метод научного эксперимента. Последовательно создано несколько версий с различными структурами хранения данных и алгоритмами их анализа. Каждый раз Программа наполнялась тестовыми данными, включающими как типовые, так и исключительные случаи, затем проводились сравнения с данными, полученными в различных отчетах программы.

#### **Результаты исследования и их обсуждение.**

В процессе разработки Программы поля информационного блока заполнялись данными о лицах, живущих с ВИЧ, проживающих в субъектах РФ Южного и Северо-Кавказского федеральных округов. Результаты уникальных выходных форм верифицировались вручную.

В отличие от существующих аналогов, созданных с использованием системы управления базами данных Access, при разработке Программы применена в качестве платформы СУБД «1С:Предприятие V.7.7», что расширило возможности оперативной обработки возрастающего объема эпидемиологически значимой информации.

Применение более современной СУБД позволило проводить углубленный статистический анализ первичной информации с использованием различных методов математической статистики, а наличия в программе конструктора свободных запросов увеличило возможности пользователей по самостоятельному формированию аналитических таблиц, содержание которых необходимо для выработки оптимальных решений.

В итоге была создана Программа, предназначенная для ввода, хранения, группировки, поиска и анализа данных по ВИЧ-инфекции в федеральных округах и субъектах Российской Федерации в электронном виде. Получено свидетельство Федеральной службы по интеллектуальной собственности о государственной регистрации программы для ЭВМ «Информационно-аналитическая система эпидемиологического мониторинга за ВИЧ-инфекцией «КВИК» № 2015619465 от 04.09.2015 г. Программа позволяет:

1. Осуществлять сбор, хранение, поиск эпидемиологической информации по ВИЧ-инфекции, в том числе:

- адресных данных о больных ВИЧ-инфекцией, сведений о результатах их обследований, информации о возможной причине заражения, ВИЧ-статусе и т.п.,
- данных о численности населения районов, городов и субъектов РФ,
- данных о половозрастном составе населения субъектов РФ.

2. Формировать по различным критериям отбора следующие списки:

- списки больных ВИЧ-инфекцией, зарегистрированных за определенный промежуток времени,

- списки людей, живущих с ВИЧ, на определенную дату.

3. Комплексно и стандартизировано проводить многоаспектный анализ эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции, в том числе:

- осуществлять оперативный и ретроспективный анализ показателей заболеваемости ВИЧ-инфекцией в разрезе субъектов РФ, а также муниципальных образований; среди сельского и городского населения, а также среди различных половозрастных групп,

- осуществлять оперативный и ретроспективный анализ показателей пораженности населения ВИЧ-инфекцией в разрезе субъектов РФ, а также муниципальных образований, среди сельского и городского населения, а также среди различных половозрастных групп населения,

- оценивать динамику возрастно-половой структуры больных ВИЧ-инфекцией в разрезе субъектов РФ, а также структуры наиболее вероятных факторов риска заражения ВИЧ-инфекцией.

- определять структуру субтипического состава штаммов ВИЧ-1, циркулирующих в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах России.

Для обеспечения точности и достоверности учета эпидемиологической информации при разработке Программы предусмотрена обязательная регистрация дат изменения признаков. Учет сведений о лицах, живущих с ВИЧ, ведется в хронологическом порядке по следующим признакам: адресам регистрации, проживания и пребывания, гражданству, учетной группе и т.д.

Разделение информации об адресах и других эпидемиологических признаках в несвязанные временные потоки позволяет автоматически получать достоверные данные об учетном адресе (в случае изменения места жительства), о гражданстве (в случае его изменения) и других эпидемиологических данных, даже если о них стало известно спустя некоторое время.

При хранении в базе данных даты, когда произошло то или иное событие, а не даты, когда о нем стало известно, Программа будет работать в режиме логического времени.

Благодаря реализации единообразных подходов к статистическому учету и анализу персонализированной информации независимо от существующих особенностей этих подходов в каждом из субъектов РФ, разработанная Программа способствует повышению качества оценки эпидемиологической ситуации, уровня и тенденций развития эпидемического процесса.

Таким образом, Программа позволяет комплексно и стандартизированно проводить анализ эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции (оценивать уровень, структуру и динамику эпидемиологически значимых показателей), что в свою очередь, дает возможность объективной оценки эффективности проводимых мероприятий, направленных на снижение заболеваемости ВИЧ-инфекцией. Полученная достоверная информация способствует более рациональному планированию бюджетных расходов на мероприятия по противодействию эпидемии ВИЧ-инфекции.

**Заключение.** С целью оптимизации эпидемиологического мониторинга за ВИЧ-инфекцией в федеральных округах и субъектах Российской Федерации разработана и апробирована программа для ЭВМ «Информационно-аналитическая система «КВИК» на платформе «1С:Предприятие V.7.7» Помимо стандартных опций по сбору, хранению, поиску эпидемиологически значимой информации, в программе реализована возможность введения и обработки молекулярно-биологических характеристик возбудителя. Программа позволяет проводить углубленный статистический анализ первичной информации с использованием различных методов математической статистики, а также самостоятельно создаваемые пользователем аналитические таблицы для выработки оптимальных решений.

Благодаря реализации единообразных подходов к статистическому учету и анализу персонализированной информации независимо от существующих особенностей этих подходов в каждом из субъектов РФ, разработанная информационно-аналитическая система способствует

повышению качества оценки эпидемиологической ситуации, уровня и тенденций развития эпидемического процесса, что позволяет более рационально планировать бюджетные расходы по противодействию эпидемии ВИЧ-инфекции на окружном и региональном уровнях.

Литература:

1. Доклад ЮНЭЙДС. Ускорение: прекращение эпидемии СПИДа к 2030 году. // URL: [http://www.ЮНЭЙДС.org/ru/resources/documents/2014/JC2686\\_WAD2014report](http://www.ЮНЭЙДС.org/ru/resources/documents/2014/JC2686_WAD2014report)

2. Анализ эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции и сопутствующим заболеваниям (туберкулез, ИППП, гепатиты). - Методические рекомендации от 20.09.2007 № 6964-РХ. – М.: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007. – 68 с.

3. Организация работ по сбору информации о случаях ВИЧ-инфекции СПИДа. - Методические рекомендации от 06.08.2007 № 5962-РХ. – М.: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007 - 10 с.

4. Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам. - Методические рекомендации 3.1.5.0075/1-13 от 20.08.2013. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2013 - 49 с.

5. О проведении надзора за циркуляцией генетических вариантов вируса иммунодефицита человека, включая циркуляцию штаммов, резистентных к антиретровирусным препаратам. - Методические рекомендации от 06.08.2007 № 5958-РХ. – М.: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007 - 46 с.

6. Профилактика ВИЧ-инфекции. – Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.5.2826-10. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2010 - 24 с.

## **ОЦЕНКА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ ВНЕШНИХ И ВНУТРЕННИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ УГРОЗ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МАССОВОГО МЕРОПРИЯТИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ**

**Пяташина М.А., Авдоница Л.Г., Трофимова М.В., Балабанова Л.А., Замалиева М.А.**  
*Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан, Казань*

Управлением Роспотребнадзора по Республике Татарстан (далее - Управление) проведена количественная оценка потенциальной эпидемической опасности XVI чемпионата мира по водным видам спорта 2015 года в г. Казани согласно требованиям действующего методического документа [1].

Проведена оценка эпидемиологических рисков внешних и внутренних биологических угроз.

Для участия в XVI чемпионате мира по водным видам спорта 2015 года в г. Казани ожидалось прибытие 2041 участника из 101 страны, неблагополучной по особо опасным инфекционным заболеваниям, что составляло 37% от общего количества участников. Страны распределились по регионам следующим образом: страны Американского региона -33,8%, Азии – 26,2%, Европы -19,3%, Африки -11,2%, Ближнего Востока -5,6%, Южной Азии -2%, Океании -0,9%, Центральной Азии -0,8%, Средиземноморья - 0,2%.

Из стран, неблагополучных по особо опасным инфекционным заболеваниям ожидался приезд по: малярии 58,9% всех спортсменов, лихорадке Денге - 45,2%, менингококковой инфекции - 32,0%, холере - 30,9%, желтой лихорадке - 16,2%, чуме -16,0%, БВРС-КоВ - 6,5%, лихорадке Эбола - 1,0%, лихорадке Ласса - 0,5%, лихорадке Марбург - 0,5%.

Просчитывались риски по 10 инфекциям внешних угроз - холере, малярии, лихорадке Денге, лихорадке Эбола, лихорадке Ласса, лихорадке Марбург, желтой лихорадке, чуме, коронавирусной инфекции и менингококковой инфекции. Наибольший риск заноса на территорию Республики Татарстан составил по малярии (100 баллов), Лихорадка Денге (50 баллов) и холере (20 баллов).

Риск завоза лихорадки Эбола и менингококковой инфекции составил 5 баллов. Наименьший риск завоза (1 балл) составил по желтой лихорадке, БВРС-КоВ, чуме, лихорадке Ласса, лихорадке Марбург.

Наибольший риск распространения инфекционных заболеваний в случае завоза по холере, малярии и менингококковой инфекции, средний риск - ВРС-КоВ, лихорадка Ласса и лихорадка Марбург, низкий риск распространения присвоен лихорадке Эбола, желтой лихорадке, лихорадка Денге и чуме.

При анализе рисков завоза и распространения инфекционных особо опасных заболеваний установлена потенциальная противэпидемическая опасность (уровень ПЭО). Высокий уровень - по холере и малярии, низкий уровень – лихорадка Денге, менингококковая инфекция, БВРС-КоВ, лихорадка Ласса, лихорадка Марбург и минимальный уровень – чума, лихорадка Эбола, желтая лихорадка.

По внутренним угрозам просчитывались риски по природно-очаговым инфекциям – ГЛПС, клещевой энцефалит, клещевой боррелиоз, лихорадка Западного Нила, малярия с местной передачей, туляремия, лептоспироз и бешенство.

Уровень потенциальной противэпидемической опасности определен следующим образом: высокий – ГЛПС, средний – клещевой боррелиоз, низкий – лихорадка Западного Нила, минимальный – клещевой энцефалит и малярия с местной передачей. Потенциальная противэпидемическая опасность отсутствует по туляремии, лептоспирозу и бешенству.

Литература:

МР 3.1.0079/2-13 «Организация санитарно-противоэпидемического обеспечения массовых мероприятий с международным участием».

## **СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ТРИХИНЕЛЛЕЗА В ПРИВОЛЖСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ**

**Пекло Г.Н., Степанова Т.Ф., Смирнова С.С.**

*ФБУН «Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Тюмень*

Трихинеллез – широко распространенная инвазия семейства млекопитающих. Ей подвержены дикие, сельскохозяйственные, домашние животные и человек. У человека заболевание протекает тяжело. При достаточно эффективных методах лечения при поздней диагностике заболевания возможны летальные исходы, переход болезни в хроническую стадию.

Выделяют три типа очагов трихинеллеза: природные, синантропные и смешанные. Поскольку инвазия сохраняется в дикой природе у многочисленных хозяев, нереальной является задача ликвидации трихинеллеза в природных очагах. Однако реальна задача ее успешной профилактики, чему служит мониторинг за зараженностью млекопитающих и санитарно-просветительная работа среди населения с применением всех возможных средств массовой информации [1].

Приволжский федеральный округ (ПФО) образован в мае 2000 года. В его составе 14 субъектов России: шесть республик (Башкортостан, Марий Эл, Мордовия, Татарстан, Удмуртия, Чувашия), семь областей (Кировская, Нижегородская, Оренбургская, Пензенская, Самарская, Саратовская, Ульяновская). Пермская область и Коми-Пермяцкий автономный округ объединены и включены в состав округа под названием Пермский край. Большинство субъектов ПФО - особенно Самарская, Саратовская области, Татарстан - высоко урбанизированные территории: доля городского населения составляет от 74,14% до 80,53% при средней по округу 70,2%. Плотность населения в несколько раз превышает среднюю по стране и равняется 35,3 чел./км<sup>2</sup>, вследствие чего природа пригородных зон испытывает интенсивный антропогенный пресс.

Большая протяженность ПФО с севера на юг обуславливает разнообразие природных ландшафтов в регионе. На севере округа – в Кировской области, Пермском крае, Нижегородской области, в Республике Марий-Эл, Удмуртии, Чувашии и на севере Татарстана – размещены лесные

ресурсы региона. Общая лесистость округа составляет 36,6%. На самых северных территориях она больше – 59% - 60% и представлена северо-европейской тайгой. По мере смещения на юг лесистость снижается: в Чувашии она не превышает 32%, а в Татарстане составляет не более 16%. В таежных лесах преобладают хвойные породы (ель, сосна, кедр). В зоне смешанных лесов распространены еловые и пихтовые породы с примесью липы и дуба. В широколиственных лесах растут береза, осина, ива и т.д. Лесостепная зона охватывает все Правобережье Волги в пределах ПФО, в Левобережье – это южная часть Татарстана, Ульяновская область, северные районы Самарской области, северо-западные и предгорные районы Южного Урала, в том числе часть территорий Башкортостана. Западная часть лесостепной зоны имеет более разнообразную фауну, в восточной полузасушливой части она беднее. Естественная растительность лесостепи практически не сохранилась. Степная и полупустынная зоны находятся южнее Саратова и Балакова, на территориях Оренбургской и Саратовской областей. Степи, в основном, распаханы под зерновые культуры.

История изучения трихинеллеза на территориях ПФО начинается с 50-х годов прошедшего столетия. В Кировской области исследования проводились А.З. Бердовым [2], Е.А. Поляковым [3], О.В. Масленниковой и А.И. Колеватовой [4]. Трихинеллез регистрировался практически во всех районах области. Широко была распространена инвазия среди диких хищников – волков, лисиц, енотовидных собак, барсуков. На территории Омутнинского района (северо-восток области) за 10 лет наблюдения инвазия обнаружена только у двух волков «пришлой стаи», в то время как «местные» волки были свободны от нее. Енотовидные собаки, обитающие на ограниченной территории этого района, также были свободны от трихинелл. В Арбажском районе (юго-западная часть области), неблагоприятном по природному трихинеллезу, зараженность енотовидных собак достигала 50,0%. Носительство трихинелл установлено у двух волков, обитающих в окрестностях Кирова [2,3]

Мониторинг гельминтофауны в Кировской области осуществлялся О.В.Масленниковой и А.И. Колеватовой [4] с 1967 по 1999 год (выделенные авторами периоды 1967 – 1971, 1982 – 1987, 1996 - 1999 годы). Исследования подтвердили длительность сохранения инвазии на высоком уровне, хотя и с некоторыми колебаниями. Волки были заражены на 91,7%, 59,4%, 71,9% в соответствии с обозначенными периодами; лисицы – в 37,2%, 62,5%, 41,9% случаев; рыси – в 50,0%, 44,8%, 33,3%. Мелкие хищники (куница, норка, горностаи и др.) были заражены значительно реже. Эпидемиологически опасные животные – бурый медведь, барсук, кабан были заражены значительно: экстенсивность инвазии у них составила от 28,6%, до 50,0% у медведя, 33,3% - у барсука, и 13,3% - у кабана. Авторы обнаруживали инвазию у грызунов и насекомых: у обыкновенной буроzubки – фонового вида мелких млекопитающих зараженность составила 12,6%.

По данным ветеринарной службы с 1986 по 1995 гг. в 10 районах Кировской области утилизировано 49 инвазированных туш медведей и 7 туш кабанов. В последнее время в Кировской области стали проблемой одичавшие собаки, выведенные человеком в природную среду. Они, наряду с крупными хищниками, становятся носителями трихинелл и, следовательно, опасны для синантропных сообществ.

Широкое распространение трихинеллеза у диких хищников, высокая экстенсивность инвазии у них доказывают существование «стационарного природного очага трихинеллеза на территории Кировской области» с циркуляцией *T. nativa* [4].

Пермский край расположен в трех типах ландшафтов – таежном, подтаежном и лесостепном. На территории отмечается смешение фауны европейской тайги с элементами фауны сибирской тайги, смешанных лесов, лесостепи и даже тундры. Согласно ветеринарной отчетности и литературным данным в Пермском регионе трихинеллез зарегистрирован у двух эпидемиологически опасных видов животных – медведя и барсука. Начиная с 1995 года, трихинеллез выявляется у свиней в хозяйствах разных форм собственности в различных ландшафтных зонах.

В Пермском крае трихинеллы зарегистрированы у 11 видов промысловых животных : волк заражен в 46,3% случаев, лисица – в 25,8%, медведь – в 5,3%, барсук - в 17,3%, росомаха – в 50%, рысь – в 19,3%, кабан – в 2,4% случаев. Зараженность мелких хищников была ниже и составила у горностаев 6,7%, у норок – 2,8 – 3,5% [5]. В таежной зоне наиболее зараженными являются волк, рысь, норки, в подтаежной – барсук и кабан, в лесостепной – лисица. Трихинеллы обнаружены у серой крысы (2,14%), у рыжей полевки (0,46%), у обыкновенной полевки (0,54%), у собаки

(1,1%) и кошки (5,9%). Между тем, рыжая полевка в околородных и лесокустарниковых стациях, а обыкновенная полевка – в лугово-полевых являются доминирующими видами [5,6].

Приведенные данные свидетельствуют о существовании на территориях Пермского региона природного очага трихинеллеза, простирающегося на все его ландшафтные зоны. Наибольшая экстенсивность инвазии наблюдается у крупных хищников. Мелкими млекопитающими - основной кормовой базы хищников, передается инвазия по принципу «хищник – жертва» [5].

В формировании синантропных очагов в Пермском регионе могут играть определенную роль мелкие дикие хищники, посещающие поселки (норки, горностаи, хорьки) а также грызуны. Вынос инвазии в природу возможен бродячими животными и синантропными грызунами, ставшими жертвами диких хищников [5].

Свиноводство в Пермском регионе развито на государственных предприятиях, в фермерских и крестьянских хозяйствах. С перестроечных времен в связи с нарушениями технологии содержания животных, понижения ветеринарно-санитарного сопровождения выращивания животных, трихинеллез регистрируется в хозяйствах разных форм собственности во всех ландшафтных зонах. С 1995 по 1999 год при исследовании 1653087 туш свиней трихинеллы выявлены в 20 тушах - 0,0012% случаев. Факторами передачи трихинелл человеку служат продукты охоты, свинина (37%) и мясо собак (19,0%).

Таким образом, представленные исследования свидетельствуют о существовании на территории Пермского региона природных и синантропных очагов трихинеллеза [7].

Ситуация по трихинеллезу в Башкортостане изучалась Х.В. Аюповым с соавторами [8], С.М. Валиуллин с соавторами [9], Г.З. Хазиевым с соавторами [10, 11]. Авторы единодушны в отрицании существования синантропных очагов инвазии и столь же уверенно признают существование трихинелл в дикой природе Башкортостана.

В дикой природе трихинеллы выявлены у 11 видов животных: у барсука, медведя, колонка, куницы, лисицы, волка, енотовидной собаки, рыси, у двух видов норки и хорька. Природный очаг трихинеллеза охватывает 17 районов из 54 административных единиц Башкортостана [10, 11]. Штаммы принадлежат к виду *T.nativa* [9]. Эпидемиологически опасными являются блюда из мяса медведя и барсука. В 1996 году добытое браконьерским способом и не подвергнутое экспертизе мясо барсука употреблялось в виде шашлыка восьмью лицами. У всех наблюдалась клинически выраженная форма трихинеллеза, закончившаяся благополучно после стационарного курса лечения.

В среднем Поволжье (Татарстан, Нижегородская область, Республика Чувашия) домашние и дикие плотоядные играли важную роль в поддержании очагов трихинеллеза. Экстенсивность инвазии у диких животных - лисиц, волков достигала 26,0% и 47,0% соответственно. У домашних собак она составляла 0,9% [29]. За последующие тридцать лет трихинеллез выявлен у домашней свиньи. Установлена инвазия у лисицы, барсука, куницы, норки, хоря и горностаи. Наличие инвазии у барсуков с экстенсивностью инвазии до 80% отмечали многие авторы [12, 13, 14, 15]. Д.В.Васильева [16] обнаружила инвазию у лисиц в 12,0% случаев, у куниц – в 25,0% случаев, у четырех американских норок и одного колонка. Этот же автор сообщил об отсутствии трихинелл у пушных зверей зверосовхозов Татарстана.

Исследования на территории Мордовии свидетельствуют, что основную роль в поддержании природных очагов играют дикие хищные плотоядные, а среди них – лисица обыкновенная [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27]. Многолетние исследования (1963 – 1999 гг.) позволили авторам утверждать наличие на территориях Мордовии стойкого природного очага трихинеллеза

О трихинеллезе свиней на территории Мордовии известно, что в 1968 году из 600 свиней, сданных на мясокомбинат из совхоза «Ардатовский», одна туша оказалась с большим количеством личинок. На Саранском мясокомбинате было выявлено несколько свиных туш с инвазией [18].

Зараженность лисиц Мордовии аналогична таковой у лисиц всего Среднего Поволжья (Нижегородской, Ульяновской, Кировской областей, Чувашии, Татарстана). Следовательно, лисицы способны формировать и поддерживать природные очаги трихинеллеза на всех территориях ПФО. Не менее широко распространен барсук. Зараженность его в Мордовии колеблется от 6,3% до 14,3% [24], в Башкирии – в 80 – 100% случаев [11], в Татарии – 4% - 20% [13]; около 20% составила зараженность барсуков в Нижегородской области и Пермском регионе [5, 12]. Мясо и жир барсука используются населением не только как продукт питания, но и как средство лечения

по прописям народной медицины. Поэтому барсук представляет реальную опасность для населения всего Волжско-Камского региона.

Согласно данным информационного сборника ФЦ ГСЭН за 2000 год «Санитарно-эпидемиологическая и санитарно-эпизоотологическая характеристика очагов трихинеллеза», по состоянию на 1983 – 1998 годы, к субъектам с активно действующими природными очагами отнесен Пермский край. Кировская область находится среди субъектов округа, где трихинеллез регистрируется с большим постоянством среди диких животных. К субъектам с мало проявляющимися или формирующимися природными очагами отнесены как лесные, так и лесостепные территории округа - Республика Марий Эл, Удмуртия, Татарстан, Самарская, Оренбургская, Кировская, Нижегородская области, Республика Башкортостан. Пензенская область отнесена к территориям с формирующимися или мало проявляющимися синантропными очагами инвазии [28].

В 1986 году в двух районах Кировской области имели место случаи заражения населения: заболели члены семьи охотника из пяти человек, употреблявшие медвежатину холодного копчения. У дегустировавших ее тридцати человек клинических проявлений болезни не было.

С 1992 по 1998 годы на территориях округа выявлено 79 туш диких животных с личинками трихинелл. Медвежье мясо вызвало групповые заболевания среди населения в Оренбургской области.

В 1998 году в Агрызском районе Татарстана заболело 15 человек, в основном дети. Фактором передачи трихинелл послужило мясо барсука. На территории Удмуртии фактором передачи инвазии 21 жителю послужило мясо свиньи частного сектора. Мясо барсука и кабана послужило причиной трихинеллеза еще у 6 человек [30].

Таким образом, трихинеллез в природных биоценозах ПФО распространен широко. Стойкость очагов обеспечивают способность гельминта проходить весь цикл развития в одном хозяине, длительность сохранения личинок в трупах, а в организме хозяина в течение всей его жизни; полигостальность трихинелл дает паразиту широкий круг хозяев с большой плотностью популяций – крупных и мелких хищных плотоядных. Постоянные и сезонные миграции в системе природный – синантропный биоценоз также работают на обеспечение стойкости очагов.

В таблицах 1 и 2 представлена заболеваемость населения территорий ПФО. Заболеваемость представлена в абсолютных цифрах (табл. 1) и в показателях на 100 000 населения (табл. 2). Для сравнения в этих же таблицах даны средние значения заболеваемости по Российской Федерации и по ПФО. Анализируется заболеваемость за 15-летний период – с 2000 по 2014 год. Используются данные «Информационных сборников статистических и аналитических материалов: Заболеваемость протозоозами и гельминтозами населения Российской Федерации» Федерального центра ГСЭН и Роспотребнадзора за 2000 – 2014 годы.

За анализируемый период в ПФО заболело 251 человек, из них 63 – дети. Неблагополучными были 2000, 2001, 2006 и 2008 годы, когда заболело 123 человека, что составляет 49,0% заболеваемости за 15 лет. Четыре территории округа обусловили 68,1% случаев трихинеллеза (171 больной) за 15 лет. В Удмуртии заболело 50 человек, в Пермском крае – 47, в Саратовской области – 42 и в Самарской области – 32 человека. Средние показатели заболеваемости по ПФО не превышают средние федеральные значения. Однако на отдельных территориях в некоторые годы показатели превышают средние по России значения до 2,5 раз и более. На фоне снижения заболеваемости в стране средние показатели заболеваемости (общей и особенно детской) превышали средние по РФ в Самарской области с 2006 по 2011 год и в 2014 году, в Кировской области – в 2007 году, в Пермском крае – с 2007 по 2010 год, в Удмуртии – в 2008 году. В Самарской области в 2014 году показатель заболеваемости составил 0,44/2,18, что в 7,3 – 21,8 раза выше средних федеральных значений – 0,06/0,1 (табл. 2, рис. 1 и 2). Рост заболеваемости в 2008 году частично объясняется заражением жителей округа на отдыхе в Абхазии (город Пицунда). Фактором передачи трихинелл послужили шашлыки из свинины. Завозные случаи имели место в Пермском крае, Пензенской и Самарской областях.

Детская заболеваемость за анализируемый период была высокой в Самарской области (заболели 6 детей, 41,3%) и Пермском крае – 15 детей или 23,8% от числа заболевших детей в округе. В 2014 году заболеваемость детей (12 случаев) составила 42,9% случаев трихинеллеза у детей до 17 лет по Российской Федерации (табл. 2, рис. 2).



13	Саратовская область	0	5	1/0	7/1	10/2	6/0	1/0	1/1	9/3	0	1/0	0	1/0	0	0	0
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	17
14	Чувашия	0	0	0	3/0	1/0	0	4/0 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	ПФО	30	33	20/6	22/5	20/6	14/2	23/6 (8)	19/11	37/9	6/2	4/1	2/1	1/0	3/0	17/ 12	12
16	РФ	483/ 61	641/ 92	527/ 84	342/ 34	514/ 59	299/ 37	201/ 31 (39)	171/ 39 (32)	328/ 42	153/ 27	209/ 67	84/ 12	118/ 20	30/3	94/ 28	28
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	17
		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2014

Примечание: Использованы данные «Информационных сборников статистических и аналитических материалов. Заболеваемость протозоозами и гельминтозами населения Российской Федерации» Федерального центра ГСЭН и Роспотребнадзора за 2000 -2014 гг.

Таблица 2

Показатели заболеваемости трихинеллезом (на 100 000 населения) в Приволжском федеральном округе (ПФО) и Российской Федерации (РФ) с 2000 по 2014 год

№ п/п	Субъекты ПФО	Показатели заболеваемости по годам (для общего числа больных/ для детей 14-17 лет)																
		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	17	
1.	Пермский край	0,2	0,2	0,1/ 0,6	0,1/ 0,4	0,1/ 0,2	0,1/ 0,5	0,1/ 0,2	0,1/ 0,5	0,4/ 0,4	0,04/ 0,2	0,04/ 0,2	0,04/ 0	0	0,04/ 0	0,04/ 0	0,04/ 0	
2.	Удмуртия	0,8	1,0	0,4/ 0,3	0,2/0	0	0	0,1/0	0,1/ 0	0,5/ 0	0	0	0	0	0	0	0	

3.	Кировская область	0,4	0	0,1/0	0	0	0	0	0	0,4/0,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4.	Саратовская область	0	0,2	0,04/0	0,3/0,2	0,4/0,5	0,2/0	0,04/0	0,3/0,6	0,04/0,2	0,04/0	0,3/0	0,04/0	0,04/0	0,04/0	0,04/0	0,04/0	0,04/0	0,04/0	0,04/0	0,04/0	0,04/0	0,04/0	0
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17								
5.	Оренбургская область	0,1	0	0	0,1/0,3	0	0	0,4/0,3	0	0,05/0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05/0	0
6.	Республика Марий Эл	0	0,6	0	0,3/0,8	0,4/2,4	0	0,1/0,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7.	Самарская область	0	0	0	0,03/0	0	0	0,1/0,5	0,2/0,7	0,2/0,7	0,03/0,2	0,03/0,2	0,03/0,19	0	0	0	0,44/2,18							
8.	Ульяновская область	0,1	0	0,2/0,4	0	0	0,1/0	0	0,1/0,4	0	0,1/0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9.	Чувашия	0	0	0	0,2/0	0,1/0	0	0,3/0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.	Татарстан	0	0	0,1/0,1	0	0,1/0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11.	Башкортостан	0	0	0	0	0	0,1/0	0	0	0	0	0	0	0,01/0	0,01/0	0,06/0,21								
12.	Мордовия	0,1	0	0	0	0	0	0,1/0,6	0	0	0	0	0	0,08/0,08	0,02/0,01	0,06/0,1								
13.	Пензенская область	0	0	0,1/0	0	0	0,1/0	0,1/0	0,1/0	0,1/0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.	Нижегородская область	0	0	0,03/0	0	0	0	0	0	0	0,01/0	0,03/0	0	0	0,06/0	0,03/0								
15.	ПФО			0,1/0,1	0,1/0,1	0,1/0,1	0,05/0,04	0,1/0,1	0,1/0,2	0,1/0,2	0,02/0,04	0,01/0,02	0,01/0,02	0,01/0,02	0,01/0	0,06/0,21								
16.	РФ	0,3/0,2	0,4/0,4	0,4/0,3	0,2/0,1	0,4/0,3	0,2/0,2	0,1/0,1	0,1/0,1	0,2/0,2	0,11/0,10	0,15/0,26	0,06/0,05	0,08/0,08	0,02/0,01	0,06/0,1								

Примечание: Использованы данные «Информационных сборников статистических и аналитических материалов: Заболеваемость протозоозами и гельминтозами населения Российской Федерации» Федерального центра ГСЭН и Роспотребнадзора за 2000 -2014 гг.

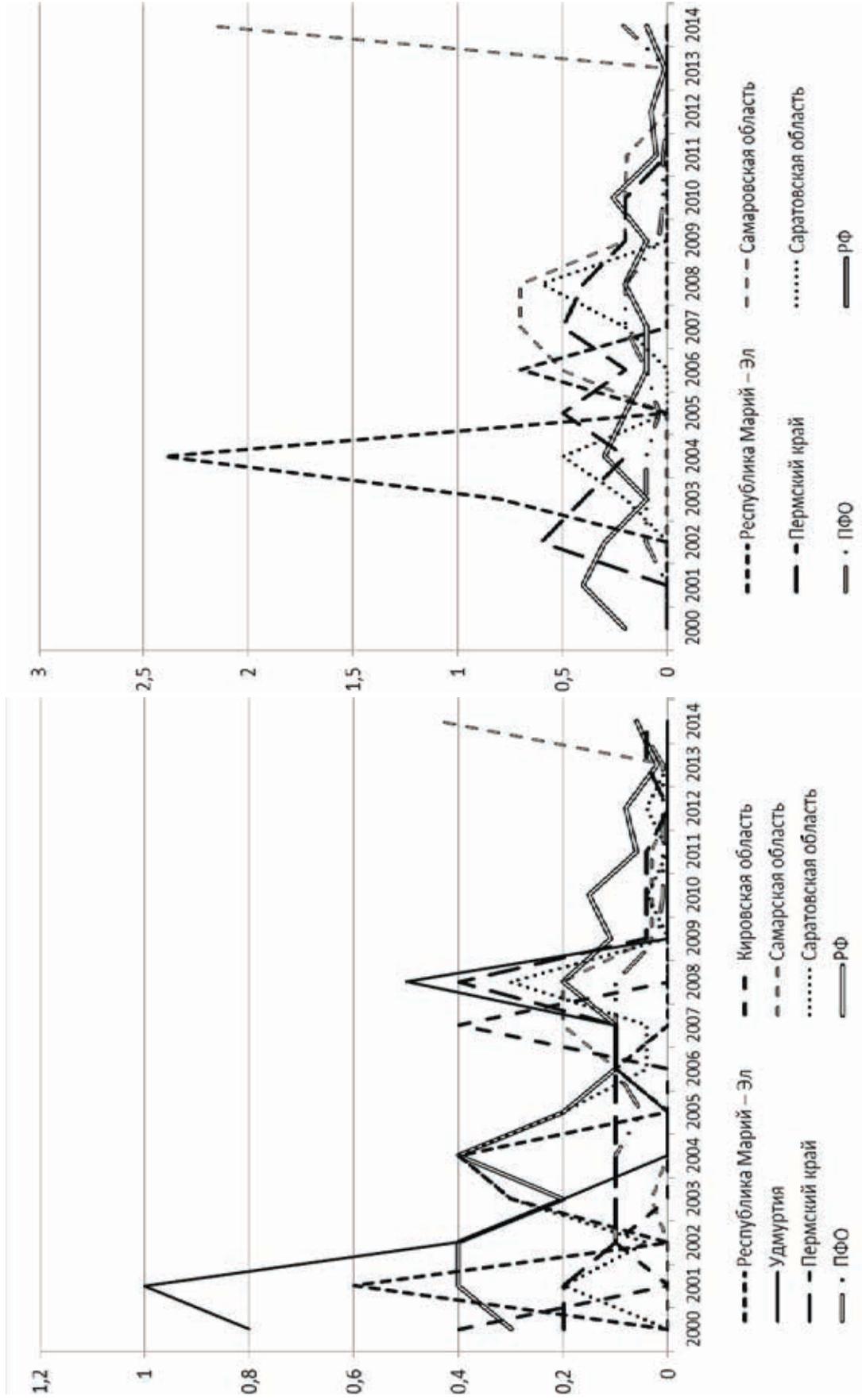


Рис. 1 Динамика заболеваемости трихинеллезом (показатели на общее число больших) на территориях Приволжского федерального округа в 2000-2014 годах.

Рис. 2 Динамика заболеваемости трихинеллезом (показатели детской заболеваемости) на территориях Приволжского федерального округа в 2000-2014 годах.

Таким образом, на территориях ПФО имеют место как природные, так и синантропные очаги трихинеллеза. Индустриальный пресс, аграрная агрессия для быстрого обеспечения пищевой пищей населения густонаселенного региона, трудности экономики, делающие привлекательными лесные дары природы способны усилить напряженность эпидемического процесса в ПФО. Поскольку возможность оздоровления может касаться только синантропных очагов, главная роль в защите населения от трихинеллеза принадлежит санитарно-просветительной работе с помощью всех форм средств массовой информации. С целью предупреждения заноса инвазии в синантропные сообщества целесообразен постоянный мониторинг ситуации в природных очагах и своевременное проведение профилактических мероприятий.

#### Литература:

1. Лейкина Е.С. Характеристика природных и смешанных очагов основных гельминтозонозов в СССР /XI Всесоюзная конференция по природной очаговости болезней. Тезисы докладов (18 – 20 сентября 1984 г., г Тюмень). Алма-Ата, 1984. –С. 29 – 31.
2. Бердов А. З. Трихинеллез волков и енотовидных собак в Кировской области /XI Всесоюзная конференция по природной очаговости болезней. Тезисы докладов (18 – 20 сентября 1984 г., г Тюмень). Алма-Ата, 1984. –С. 75 – 76.
3. Поляков Е.А. Дикие животные как источники трихинеллеза /XI Всесоюзная конференция по природной очаговости болезней. Тезисы докладов (18 – 20 сентября 1984 г., г Тюмень). Алма-Ата, 1984. –С. 131 – 132
4. Масленникова О.В., Колеватова А.Н. Мониторинг трихинеллеза в Кировской области / Восьмая Всероссийская конференция по трихинеллезу. Москва, 30 – 31 мая 2000 г. Статьи и тезисы докладов. М., 2000. –С. 108 – 115.
5. Ворожцов В.В. Распространение трихинеллеза у диких и синантропных животных Пермского региона /Восьмая Всероссийская конференция по трихинеллезу. Москва, 30 – 31 мая 2000 г. Статьи и тезисы докладов. М., 2000. –С. 92 – 96.
6. Зиатдинов В.Б., Хакимзянова М.В., Гайнуллин А.А. и др. Мониторинг численности и инфицированности мелких мышевидных грызунов – носителей природно-очаговых болезней в Республике Татарстан за 2015 год /Итоги и перспективы изучения проблем инфекционных и паразитарных болезней. Сборник трудов Российской научно-практической конференции в связи с 50- летием со дня организации Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии. Том I. Тюмень, 24 – 25 сентября 2015 г. Тюмень, 2015. – С. 145 – 147.
7. Ворожцов В.В., Белозеров С.Н. Эпизоотическая и эпидемическая ситуация по трихинеллезу в Пермском регионе / Восьмая Всероссийская конференция по трихинеллезу. Москва, 30 – 31 мая 2000 г. Статьи и тезисы докладов. М., 2000. – С. 96 – 97.
8. Аюпов Х.В., Валиуллин С.М., Кудрявцев А.А. Гельминты хищных млекопитающих Башкирии /Материалы научной конференции ВОГ, вып. 25. М., 1974. – С. 33 – 36.
9. Валиуллин С.М., Махмутова А.А., Мухаметьянов А.З. и др. Распространение трихинеллеза у диких млекопитающих Башкирии / Материалы докладов к III-ей Всесоюзной конференции по проблеме трихинеллеза человека и животных (4 – 5 июня 1981 г.). Вильнюс, 1981. – С. 51 – 53.
10. Хазиев Г.З., Сулейманова Г.Ф., Фазлаева Р.Г. и др. Профилактика трихинеллеза / Материалы докладов седьмой научной конференции по трихинеллезу человека и животных. Москва, 2 – 3 октября 1996 г. М., 1996. – С. 111 – 114.
11. Хазиев Г.З., Сагитова А.С., Подушкина М.А. Эпизоотология трихинеллеза в Республике Башкортостан / Восьмая Всероссийская конференция по трихинеллезу. Москва, 30 – 31 мая 2000 г. Статьи и тезисы докладов. М., 2000. – С. 157 – 159.
12. Троицкая А.А., Горшков П.К. К изучению фауны гельминтов барсука и его роль в поддержании природных очагов некоторых гельминтозов в Вятско-Камском крае /VIII Всесоюзная конференция по природной очаговости болезней животных и охране их численности. 5 – 8 сентября 1972 г. Тезисы докладов. Том I. Киров, 1972. – С. 128 – 129.
13. Эванова В.Г., Васильева Д. В. Распространение трихинеллеза в Татарской АССР / Природноочаговые антропозонозы. Омск, 1976. – С.180 – 181.
14. Бессонов А.С. Трихинеллез в Советском Союзе (1979 – 1983 гг.) /Материалы докладов к четвертой Всесоюзной конференции по проблеме трихинеллеза человека и животных (15 – 17 мая 1985 г.). Ереван, 1985. – С. 8 – 13.

15. Бессонов А.С. Распространение трихинеллеза *Trichinella spiralis* в России (1980 – 1994). Анализ причин и условий /Материалы докладов седьмой научной конференции по трихинеллезу человека и животных. Москва, 2 – 3 октября 1996 г. М., 1996. – С. 10 – 12.
16. Васильева Д.В. Распространение трихинеллеза среди диких животных Татарии / Материалы докладов к четвертой Всесоюзной конференции по проблеме трихинеллеза человека и животных (15 – 17 мая 1985 г.). Ереван, 1985. – С. 40– 42.
17. Шалдыбин Л.С. Гельминтофауна млекопитающих Мордовского государственного заповедника /Ученые записки Горьковского пединститута. Серия зоология. 1964, Выпуск 48.
18. Мачинский А.П., Васильева В.А., Горбов Ю.К. Хозяева трихинелл в Мордовии / Восьмая Всероссийская конференция по трихинеллезу. Москва, 30 – 31 мая 2000 г. Статьи и тезисы докладов. М., 2000. – С. 115 – 117.
19. Мачинский А.П. К гельминтофауне домашних и диких плотоядных Мордовии /Материалы к научной конференции ВОГ. Ноябрь – декабрь 1964 г. Часть II. М., 1964. – С. 256 – 257.
20. Мачинский А.П. О распространении трихинеллеза в Мордовской АССР /Материалы к научной конференции ВОГ. декабрь 1965 г. Часть II. М., 1965. – С. 156 – 158.
21. Мачинский А.П. О природной очаговости некоторых гельминтозов в Мордовии /VIII Всесоюзная конференция по природной очаговости болезней животных и охране их численности. 5 – 8 сентября 1972 г. Тезисы докладов. Том I. Киров, 1972. – С. 110.
22. Мачинский А.П. Распространение трихинеллеза среди млекопитающих Мордовского заповедника / Материалы докладов к III-ей Всесоюзной конференции по проблеме трихинеллеза человека и животных (4 – 5 июня 1981 г.). Вильнюс, 1981. – С. 59.
23. Мачинский А.П., Семов В.Н. К гельминтофауне лисиц Мордовии /Материалы к научной конференции ВОГ, декабрь 1966 г. Часть III. М., 1966. – С.175 – 178.
24. Мачинский А.П., Семов В.Н. О трихинеллезе домашних и диких животных Мордовии / Материалы научных конференций ВОГ, 1968, выпуск 22. М., 1971. – С 165 – 167.
25. Мачинский А.П., Семов В.Н. Гельминты лисиц Мордовии /VIII Всесоюзная конференция по природной очаговости болезней животных и охране их численности. 5 – 8 сентября 1972 г. Тезисы докладов. Том I. Киров, 1972. – С. 111.
26. Мачинский А.П., Орехов В.С. Трихинеллезный очаг в Саранске / Материалы докладов к четвертой Всесоюзной конференции по проблеме трихинеллеза человека и животных (15 – 17 мая 1985 г.). Ереван, 1985. – С. 45– 46.
27. Мачинский А.П., Семов В.Н. К познанию ларвальных стадий гельминтов насекомоядных и грызунов Мордовии /Материалы научных конференций ВОГ, 1969 – 1970 гг. Выпуск 23. М., 1971. – С. 163 – 167.
28. Санитарно-эпидемиологическая и санитарно-эпизоотологическая характеристика трихинеллеза. Информационный сборник статистических и аналитических материалов. М., 2000. 32 с.
29. Романов И.В. Гельминтофауна домашних плотоядных Среднего Поволжья в связи с дева-стацией гельминтозоонозов /Материалы научной конференции ВОГ. 9 – 12 декабря 1963 г. Часть II. М., 1963. – С. 61 – 62.
30. Рябов В.И., Михайлова В.Б., Рахматуллина С.А. и др. Зооантропонозные гельминтозы в Удмуртии /Природноочаговые болезни человека. Омск, 2001. – С. 128 – 133.

## **ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ОСТРЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ В СОВРЕМЕННЫЙ ПЕРИОД**

**Полянина А.В.<sup>1</sup>, Быстрова Т.Н.<sup>1</sup>, Карувваккат О.С.<sup>1</sup>, Княгина О.Н.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород;*

<sup>2</sup> *Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Нижегородской области*

### **Актуальность.**

В практике отечественного здравоохранения этиологическая структура вирусных гепатитов до настоящего времени основывается на регистрируемых формах вирусных гепатитов: гепатит А

(ГА), острый гепатит В (ОГВ), острый гепатит С (ОГС), впервые выявленный хронический гепатит В (ХГВ), впервые выявленный хронический гепатит С (ХГС), носительство.

Возможность использования в современный период высокочувствительных специфических методов лабораторной диагностики расширяет представления об интенсивности эпидемических процессов различных этиологических форм, включая ГА, ГВ, ГС, гепатит Е (ГЕ), гепатит G (ГG), гепатит, вызванный transfusion transmitted virus (ТТV) на конкретных территориях. Принимая во внимание этиологическое разнообразие вирусных гепатитов, чрезвычайно важно оценить долю каждой из нозологических форм, составляющих группу этих инфекций.

#### Материалы и методы.

Для изучения этиологической структуры острых вирусных гепатитов (ОВГ), выявления доли гепатита Е и интенсивности манифестного компонента ГЕ проведено исследование клинического материала (сыворотка крови, образцы стула) от всех больных с явлениями гепатита, поступающих в инфекционные стационары г. Дзержинска и г. Н. Новгорода. Использовались методы ИФА и ПЦР для определения специфических маркеров гепатитов: А, В, С, Е, G, ТТ. Изучение этиологической структуры ОВГ проведено в двух крупных городах Нижегородской области в разные эпидемические периоды. В г. Дзержинске исследование проводилось на пике заболеваемости ГА, а в г. Н.Новгороде – в год, когда отмечались минимальные показатели заболеваемости, как ГА, так и ОВГ в целом. Под наблюдением находилось 860 пациентов с явлениями гепатита в возрасте от 17 до 73 лет.

#### Результаты и их обсуждение.

При оценке этиологической структуры острых вирусных гепатитов как в г. Н.Новгороде, так и в г. Дзержинске за последние семнадцать лет установлено преобладание доли гепатита А, которая по среднегодовым данным составила  $66,9 \pm 1,4\%$  и  $51,5 \pm 1,7\%$  соответственно (Рис. 1.).

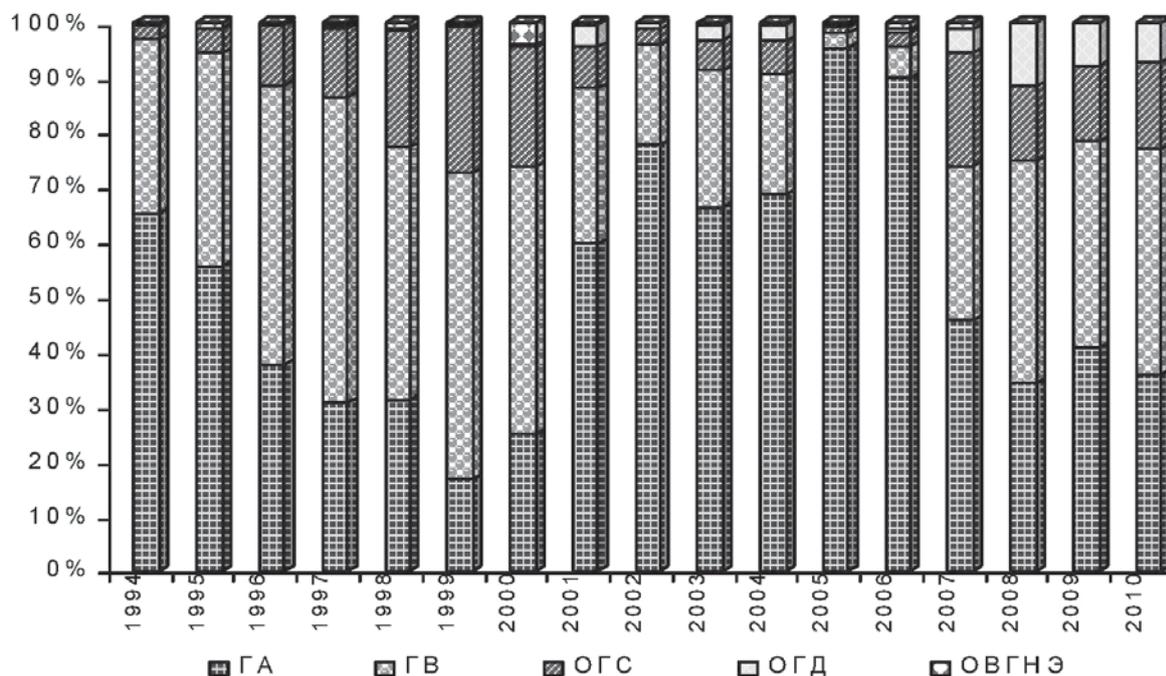


Рисунок 1. Этиологическая структура ОВГ на территории г. Н.Новгорода за период с 1994 по 2010 гг. (по данным официальной статистики, на 100 исследований)

Вместе с тем, выявлены значительные колебания по годам удельного веса гепатита А, который варьировал в зависимости от фазы эпидемического процесса от  $16,6 \pm 3,4\%$  в 1999 г. до  $95,4 \pm 0,5\%$  в 2005 году в г.Н. Новгороде и от  $33,9 \pm 10,5\%$  в 1999 г. до  $96,0 \pm 1,03\%$  в 2006 в г. Дзержинске (Рис. 2.).

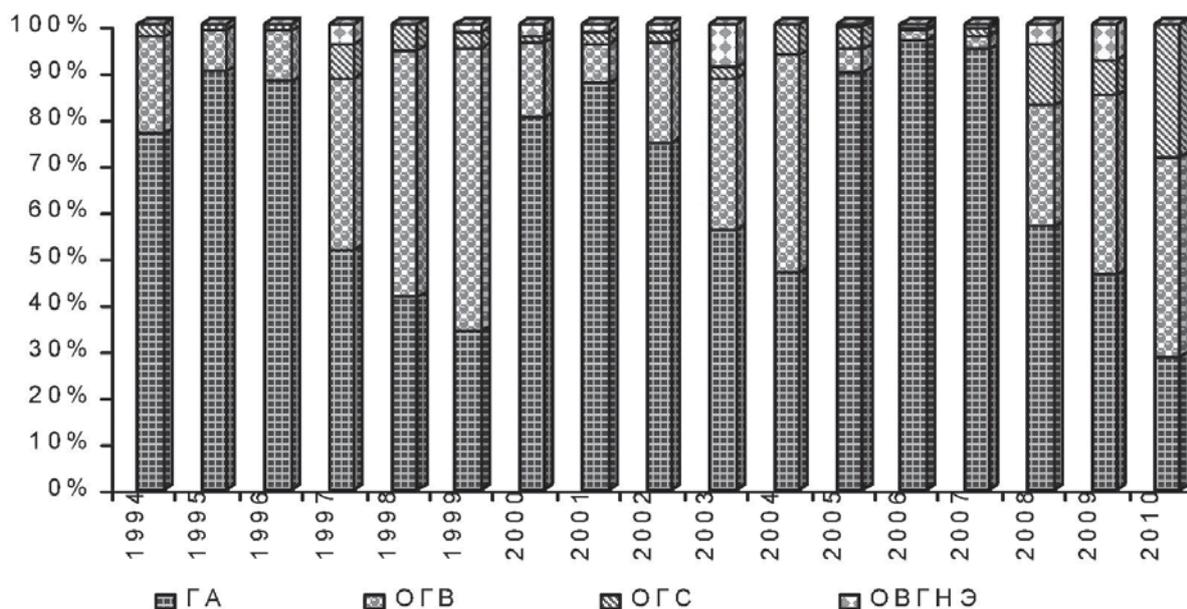


Рисунок 2. Этиологическая структура ОВГ на территории г. Дзержинска за период с 1994 по 2010 гг. (по данным официальной статистики, на 100 исследований)

В годы подъемов заболеваемости значительно возростала доля гепатита А и снижалась доля парентеральных гепатитов. Вместе с тем, в последнее десятилетие, как в годы подъемов, так и спадов, эта нозологическая форма превалирует в структуре ОВГ. Очевидно, что характер многолетней динамики заболеваемости ОВГ определяется ГА.

Таким образом, этиологическая структура вирусных гепатитов зависит в первую очередь от суммарного уровня заболеваемости ВГ. Кроме того, этиологическая структура определяется периодом проведения исследования. На фоне снижения заболеваемости происходит уменьшение участия ГА и повышение доли парентеральных гепатитов.

Следует отметить, что работа по изучению динамики этиологической структуры вирусных гепатитов в гг. Н.Новгороде и Дзержинске была начата Т.Н. Быстровой (1985, 1987, 1999 гг.), в период, когда отсутствовали методы лабораторной диагностики маркеров ГС, ГЕ и эти нозологические формы обозначались термином гепатит «ни-А ни-В» с фекально-оральным и парентеральным механизмами передачи [1]. Что и определило выбор территорий для исследования.

Исследования по выявлению доли ГЕ в структуре ОВГ на территории РФ проведены впервые.

В клинической и эпидемиологической практике постановка диагноза ГЕ до настоящего времени основывается на сборе эпиданамнеза (пребывание в недавнем прошлом в эпидемически неблагополучных по ГЕ регионах). Однако решающее значение при постановке диагноза ГЕ имеют методы специфической диагностики.

При сравнении этиологической структуры ОВГ, охарактеризованной по результатам специфической диагностики и данным официальной регистрации установлено, что последние не отражают истинной структуры заболеваемости.

Исследование в г. Дзержинске проводилось в периодическом подъеме заболеваемости ГА, когда уровень заболеваемости ГА достигал  $40,0\text{‰}$  среди взрослого населения, а показатель заболеваемости парентеральными гепатитами В и С составил  $1,1\text{‰}$  и  $0,8\text{‰}$  соответственно.

На территории г.Н.Новгорода исследование по изучению этиологической структуры ОВГ проводилось в межэпидемический период для ГА, когда его уровень составил  $4,37\text{‰}$ , показатель заболеваемости гепатитом В составил  $5,0\text{‰}$ , а гепатитом С -  $1,9\text{‰}$  соответственно.

По данным официальной регистрации в этиологической структуре острых вирусных гепатитов преобладающей формой в г. Дзержинске явился гепатит А, его доля составила  $93,8\pm 2,5\%$ . На долю парентеральных острых вирусных гепатитов В и С пришлось соответственно  $3,1\pm 1,7\%$  и  $2,1\pm 1,4\%$ , острые вирусные гепатиты неустановленной этиологии (ОВГНЭ) составили  $1,0\%$ . (Рис. 3.).

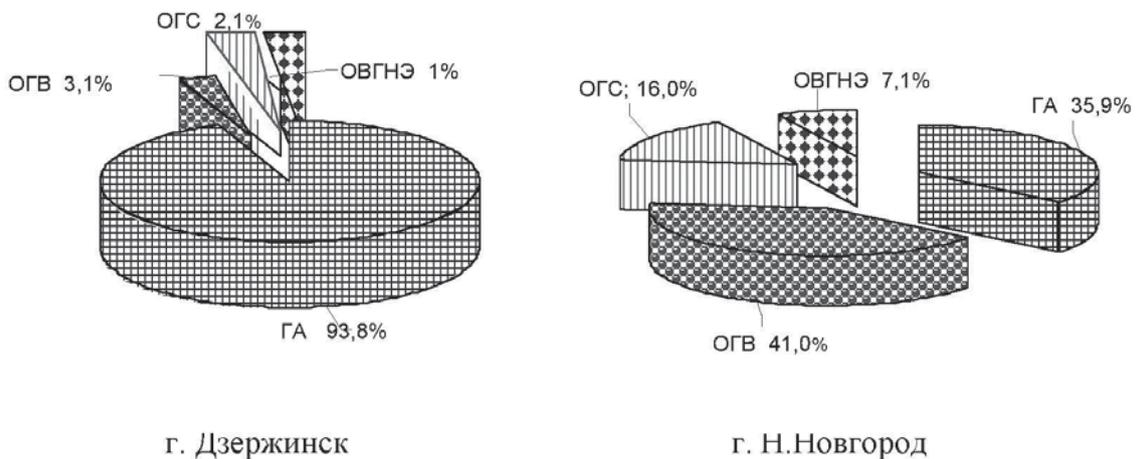


Рисунок 3. Этиологическая структура острых вирусных гепатитов у взрослого населения г. Дзержинска и г. Н.Новгорода (по данным официальной регистрации, на 100 исследований)

В отличие от г. Дзержинска в г. Н. Новгороде преобладающей формой явились парентеральные вирусные гепатиты В и С, на долю которых пришлось  $57,0 \pm 3,9\%$ . Доля гепатита А оказалась в 1,6 раза меньше. ОВГНЭ составили  $7,1 \pm 2,1\%$ .

Использование специфических методов диагностики приобрело особое значение в связи с ростом гепатитов сочетанной этиологии. В этих случаях обнаружение у больного маркеров ГВ или ГС не исключает у него одновременно двух названных гепатитов, а также их сочетанием с ГА или другими формами.

При изучении этиологической структуры ОВГ, по данным лабораторных методов исследования, в г. Дзержинске, как и по официальным данным, выявлено преобладание гепатитов с фекально-оральным механизмом передачи, на долю которых пришлось  $57,3 \pm 4,3\%$ . Удельный вес гепатита А с учетом микст-вариантов составил  $44,3 \pm 6,5\%$ . При этом, неожиданно высокой оказалась доля гепатита Е, которая составила  $13,0 \pm 2,9\%$  лишь в 1,4 раза уступая аналогичному показателю в условиях спорадической заболеваемости на территории с высокой активностью эпидемического процесса ГЕ (Таджикистан) [2]. Частота выявления изолированных анти-ВГЕ IgM в г. Дзержинске составила  $1,5 \pm 1,0\%$ , в микст - вариантах с гепатитами А, В, С –  $11,5 \pm 2,9\%$  [3].

В г. Н.Новгороде, где исследование проведено в межэпидемический период, преобладающей формой явились парентеральные гепатиты ( $58,3 \pm 5,4\%$ ), что соответствует ранее полученным данным по материалам 2001 г. [4]. Доля гепатитов с фекально-оральным механизмом передачи составила  $24,3 \pm 3,1\%$ , в т.ч. ГА -  $16 \pm 2,3\%$ , ГЕ -  $8,3 \pm 2,9\%$  (Рис. 4).

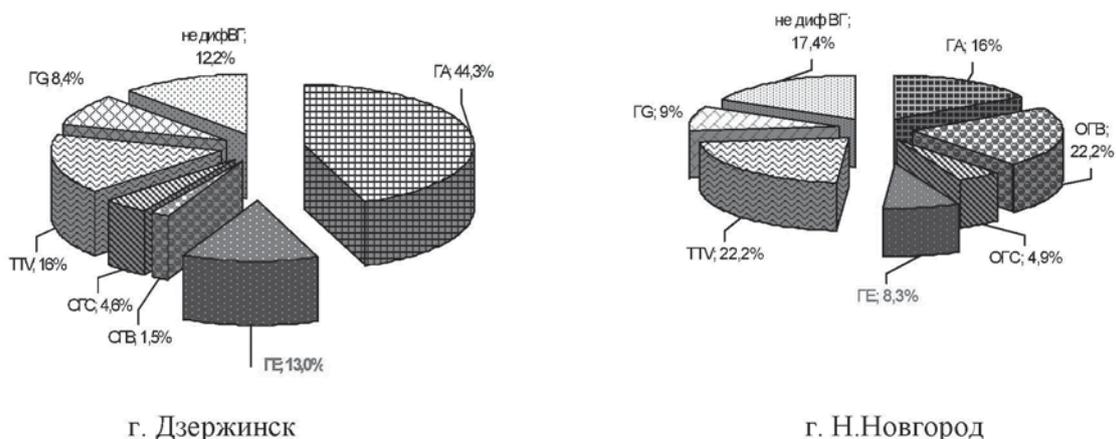


Рисунок 4. Этиологическая структура острых вирусных гепатитов в г. Дзержинске и г. Н.Новгороде (по данным лабораторных методов исследования, на 100 исследований)

Изолированные анти-ВГЕ IgM выявлены в  $3,5 \pm 1,5\%$ , как микст-инфекция с гепатитами А, В, С -  $4,8 \pm 2,9\%$  случаев. Чаще встречалось сочетание ГЕ с парентеральными гепатитами В и С ( $57,1 \pm 18,7\%$ ), в двух случаях отмечено сочетание ГЕ и ГА, а у одного больного выявлены маркеры сразу четырех гепатитов – ГЕ, ГА, ОГВ и ХГС.

Полученные в исследованиях результаты сопоставимы с материалами Быстровой Т.Н., когда в г. Н.Новгороде в межэпидемический период (1987 год) доля гепатита «ни-А ни-В» с фекально-оральным механизмом передачи в структуре ВГ составляла  $9,0\%$  [5]. Несмотря на то, что в то время еще не было методов прямого определения маркеров ГЕ, однако у всех больных в анамнезе имелись указания о пребывании на территориях неблагополучных по заболеваемости гепатитом «ни-А ни-В» с фекально-оральным механизмом передачи. На этом основании возможно предположить, что все выявленные манифестные случаи заболевания были завозными. Местные случаи в тот период не могли быть выявлены из-за отсутствия прямых методов определения маркеров ГЕ.

В настоящем исследовании при сборе эпиданамнеза ни в одном случае среди больных ГЕ не было зарегистрировано выездов на эндемичные территории, но некоторые пациенты посещали лес, употребляли в пищу недостаточно термически обработанное мясо (шашлыки), а также арбузы, овощи и фрукты, приобретенные на овощных рынках, куда они поступили из Средней Азии - территории с высокой интенсивностью эпидемического процесса ГЕ.

Следует отметить, что применение метода ПЦР для этиологической расшифровки гепатитов неустановленной этиологии ( $27,7 \pm 5,2\%$ ) позволило верифицировать диагноз дополнительно в  $58,3 \pm 3,1\%$  случаев и сократить число лиц с неуточненным диагнозом в 2,3 раза.

Так в г. Дзержинске в двух случаях ( $5,6 \pm 3,8\%$ ) из числа больных с гепатитом ни А ни Е была выявлена РНК ВГС, в 17 ( $47,2 \pm 8,3\%$ ) - ДНК ТТV, а у 2 ( $5,6 \pm 3,8\%$ ) больных - ДНК ВГВ без наличия НВsAg. Значительно чаще РНК ВГС обнаруживалась в сочетании с ВГС инфекцией, а ДНК ТТV в моноварианте.

Этиологические формы гепатитов встречались как в виде моноинфекции ( $51,7 \pm 4,1\%$  в г. Дзержинске и  $61,3 \pm 5,7\%$  в г. Н.Новгороде), так и в микст-вариантах ( $48,3 \pm 8,5\%$  и  $38,7 \pm 7,2\%$  соответственно).

Необходимо отметить, что в отличие от г. Дзержинска в г. Н.Новгороде чаще встречались сочетанные формы гепатитов с парентеральным механизмом передачи –  $70,0 \pm 12,2\%$ , фекально-оральные микст-гепатиты выявлялись в 7 раз реже. Вместе с тем у  $12,2 \pm 2,9\%$  -  $17,4 \pm 7,5\%$  больных этиологический диагноз установить не удалось, что требует продолжения исследований по поиску возбудителей других инфекций, сопровождающихся желтухой.

В ходе исследования выявлено 14 вариантов сочетаний микст-гепатитов. Интересно отметить, что сочетание двух гепатитов обнаруживалось в 2,5 раза чаще, чем сочетание трех ( $71,4\%$  против  $28,6\%$  случаев). При этом чаще встречается сочетание гепатитов с фекально-оральным (как ГЕ, так и ГА) и парентеральным механизмом передачи ( $41,9 \pm 8,8\%$ ), сочетание фекально-оральных гепатитов выявлено в 1,9 раза реже. Следует отметить, что ГЕ встречался в микст вариантах как с острыми, так и с хроническими формами вирусных гепатитов В и С.

Наибольшее количество больных ГЕ в г. Дзержинске выявлено в возрастной группе 30-39 лет и 20-29 лет ( $35,3 \pm 11,6\%$  и  $29,4 \pm 11,0\%$  соответственно), в г. Н.Новгороде обнаружено преобладание больных более старшего возраста (40-49 лет). Среди детей маркеры ГЕ не выявлены.

Следует отметить, что нами не выявлено гендерных различий в заболеваемости ГЕ. Среди заболевших мужчины составили  $47,1\%$ , женщины –  $52,9\%$ . У всех больных гепатит Е носил манифестный характер, т. е. протекал с выраженной желтухой, в  $40\%$  случаев отмечено среднетяжелое течение болезни.

### **Выводы**

Применение современных методов диагностики вирусных гепатитов, в том числе ПЦР, позволило расширить спектр этиологически расшифрованных случаев инфекции; показать, что наряду с традиционными возбудителями вирусных гепатитов (А, В, С) на территории Нижегородской области циркулируют вирусы гепатитов Е, G, ТТ, латентные формы гепатита В.

В структуре острых вирусных гепатитов выявлена значительная доля гепатита Е, которая составила  $13,0 \pm 2,9\%$  в г. Дзержинске и  $8,3 \pm 2,3\%$  в г.Н.Новгороде лишь в 1,4 – 2,3 раза уступая аналогичному показателю эндемичной по ГЕ территории. ГЕ зарегистрирован в моноварианте

в 1,5±1,1% - 3,5±1,2%, в составе микст-вариантов с гепатитами А, В, С - в 11,5±2,3% - 4,8±2,9% случаев. Манифестные формы ГЕ возникали только у взрослого населения, преимущественно у лиц 30-49 лет, не имели различий по гендерному признаку, в 40% случаев отмечено среднетяжелое течение болезни.

Установлена корреляция интенсивности манифестного компонента эпидемического процесса ГЕ и ГА. В период периодического подъема заболеваемости ГА ( $40,0 \pm 4,2 / 10000$ ) возрастает доля ГЕ в структуре ОВГ до 13,0±2,9%, показатель превалентности до  $6,9 \pm 1,7 / 10000$ ; в межэпидемический период (ГА -  $4,4 \pm 0,6 / 10000$ ) эти показатели снижаются до 8,3±2,3% и  $0,9 \pm 0,2 / 10000$  соответственно.

Полученные результаты диктуют необходимость расширения исследований по изучению этиологической структуры ВГ с применением новых медицинских технологий.

Литература:

1. Быстрова, Т.Н. Некоторые эпидемиологические закономерности гепатита ни А ни В / Быстрова Т.Н., Алейник М.Д., Копнина Е.О. // Журнал микробиология, эпидемиология и иммунология. 1990. №2. С. 38-41.

2. Рахимов, С.Г. Эпидемиологические особенности вирусных гепатитов А и Е в организованных воинских коллективах, дислоцированных на территории с высокой активностью эпидемического процесса: автореф. дис...канд. мед. наук: 14.00.30. / Рахимов Содик Ганиевич. Н. Новгород, 2005. 21 с.

3. Полянина, А.В. Эпидемиологическая характеристика гепатита Е на территории средневропейского региона России: дис...канд. мед. наук: 14.02.02. / Полянина Анастасия Викторовна. Н. Новгород, 2012. 130с.

4. Быстрова, Т.Н. Динамика этиологической структуры вирусных гепатитов на территории крупного города европейской зоны России / Быстрова Т.Н., Блохин К.В., Макарова Т.Г. // Фундаментальные и прикладные проблемы биотехнологии. М. 2001. С.117.

5. Быстрова, Т.Н. Вирусный гепатит А (эпидемиологические закономерности, лабораторная диагностика): автореф. дис...д-ра. мед. наук: 03.00.06, 14.00.30. // Быстрова Татьяна Николаевна. Москва, 1999. 50с.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА НИЖЕГОРОДСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ РОТАВИРУСА В 2012-2015 ГГ.

**Сашина Т.А.<sup>1</sup>, Морозова О.В.<sup>1,2</sup>, Новикова Н.А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород,

<sup>2</sup>ФГБОУ «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»,  
Нижний Новгород

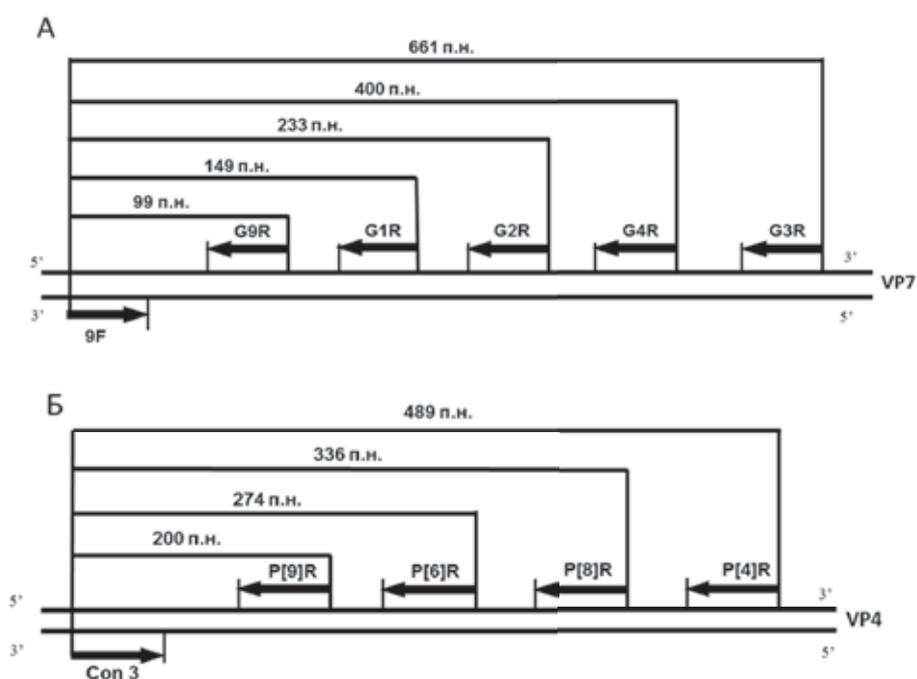
Актуальность изучения ротавирусов (род *Rotavirus*, сем. *Reoviridae*) обусловлена высокой долей ротавирусного гастроэнтерита в структуре острых кишечных инфекций у детей младшего возраста. К пяти годам ротавирусы поражают 95% всех невакцинированных детей в мире [1, 2]. Ротавирусы характеризуются широким генетическим и антигенным разнообразием, обусловленным наличием в составе наружного капсида вириона двух белков (VP4 и VP7), несущих на своей поверхности антигенные эпитопы и являющимся мишенями для нейтрализующих вирус антител. В настоящее время широко используют бинарную классификацию ротавирусов, включающую определение G- и P-генотипа на основе особенностей структуры генов VP4 и VP7, соответственно.

Разные авторы подчеркивают необходимость мониторинга циркулирующих вариантов ротавируса до и после введения вакцинации с целью изучения влияния действия вакцин на структуру вирусной популяции [3, 4, 5]. В нашей стране в 2014 году в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям была введена ротавирусная вакцина RotaTeq. Она имеет

в своем составе компоненты генотипов G1, G2, G3, G4 и P[8], и ее применение может оказать влияние на эволюцию ротавирусов основных генотипов. Таким образом, изучение геновариантов ротавируса, циркулирующих на территории России, является актуальным и представляет научно-практический интерес.

Данная работа посвящена изучению спектра G[P]-типов ротавируса А, циркулировавшего в Нижнем Новгороде в 2012-2015 гг. В работе использованы образцы фекалий детей, госпитализированных в инфекционный стационар г. Нижнего Новгорода в 2012-2015 гг. РНК ротавирусов выделяли методом аффинной сорбции на частицах силикагеля с помощью набора реагентов «АмплиПрайм РИБО-сорб» (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва), согласно инструкции. ОТ-ПЦР для определения генотипа вируса проводили с применением реактивов производства ЗАО «Силекс» (Москва). Для G-генотипирования использовали общий для всех генотипов прямой праймер 9F и смесь обратных праймеров, специфических для генотипов G1, G2, G3, G4 и G9 (Рис. 1 А). Для определения Р-генотипа ротавируса смешивали общий прямой праймер Con3 и обратные праймеры, специфические для генотипов P[4], P[6], P[8] и P[9] (Рис. 1 Б). Продукты амплификации кДНК анализировали по конечной точке методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле, содержащем бромид этидия. Учет результатов осуществляли с помощью геледокументирующей системы InGenius (Syngene, Великобритания) при длине волны 245 нм. Размер полученных фрагментов кДНК определяли путем сравнения их электрофоретической подвижности с фрагментами ДНК маркера рUC19/Msp1 (ЗАО «Силекс», Москва).

Рисунок 1. Схема посадки праймеров для определения G- генотипа (А) и Р-генотипа (Б) ротавируса А.



Методики, используемые для типирования ротавирусов, нуждаются в регулярном обновлении для соответствия типоспецифических праймеров появившимся в нуклеотидной последовательности генов VP4 и VP7 точечным мутациям [6, 7]. На первом этапе работы проведена проверка соответствия опубликованных в методических рекомендациях, разработанных специалистами ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора [8], общих и типоспецифических праймеров нуклеотидным последовательностям генов VP4 и VP7 современных штаммов ротавируса в регионах их посадки. Проведен анализ 265 нуклеотидных последовательностей гена VP7 ротавирусов разных G - генотипов, выявленных в 2005-2012 гг. в 19 странах (Россия, Бельгия, Германия, Греция, Италия,

США, Канада, Финляндия, Китай, Япония, Индия, Южная Корея, Таиланд, Иран, Индонезия, Бангладеш, Бразилия, Парагвай, Куба). В регионе посадки пяти праймеров (9F, G1R, G3R, G4R и G9R) выявлена вариабельность нуклеотидной последовательности, которая потребовала модификации и введения в последовательность праймера вырожденных оснований. Для повышения температуры плавления в последовательность пяти праймеров (9F, G1R, G2R, G4R и G9R) были добавлены нуклеотиды (Табл. 1).

Таблица 1

Модифицированные праймеры для определения G-генотипа и P-генотипа ротавирусов.

Название праймера	Последовательность 5' – 3'	Регион посадки, н.о.	Tm, °C
9F	ATGTATGGTATTGAATATACCRCA	49-72	57-58
G1R	GCTYTWGTYAAGGCAAATAATG	176-197	55-58
G2R	GTTAGAAATGATTCTCCACTAG	260-281	56-58
G3R	CTGTTGCAAYTTCTTCAAACG	689-709	55-57
G4R	GYT TTGGKTCGATGGAAAATTC	427-448	56-60
G9R	TATAAAGTCCATCGCRCTAG	128-147	54-56
Con3	TGGCTTCRCTCATTTATAGACA	11-32	56-58
P[4]R	CAAGTYATATTAGAGGTTAAAG	476-499	55-58
P[6]R	ACAAYTTGTTGATTAGTTGGATT	262-284	54-56
P[8]R	ACRTGCGGTTCAAYAGCAA	326-344	53-57
P[9]R	ACCRTCRAAGTTGGYTGACAC	190-210	60-65

Далее были проанализированы нуклеотидные последовательности гена VP4 158 ротавирусов, выявленных в 2003-2012 гг. в 30 странах (Россия, Бельгия, Германия, Венгрия, Италия, США, Канада, Китай, Япония, Индия, Южная Корея, Таиланд, Индонезия, Бангладеш, Бразилия, Парагвай, ЮАР, Австралия, Аргентина, Камерун, Буркина Фасо, Гана, Зимбабве, Уганда, Демократическая Республика Конго, Эфиопия, Гамбия, Тунис) и последовательностей праймеров для P-генотипирования. Установлена вариабельность нуклеотидной последовательности гена VP4 вариабельна в регионе посадки всех праймеров, что потребовало их модификации: регион посадки праймеров P[4]R, P[6]R и P[8]R был сдвинут; в последовательность праймеров Con3, P[4]R и P[8]R были введены вырожденные основания. Для праймера P[9]R подобран новый регион посадки (н.о. 190-210).

С помощью программы OligoCalc (Kibbe, 2007) была теоретически рассчитана температура плавления олигонуклеотидов. Параметры температуры отжига были скорректированы эмпирически в диапазоне 51-57 °C с шагом 2 °C в ходе постановки пробных ПЦР с использованием проб, содержащих РНК ротавирусов разных генотипов. При постановке мультиплексной ПЦР для G-генотипирования оптимальными были сочетания праймеров 9F, G1R, G2R и G4R (Ta=57° C) и 9F, G3R и G9R (Ta=55° C). При постановке мультиплексной ПЦР для P-генотипирования наработка фрагментов нужной длины шла при любой температуре отжига в указанном диапазоне. В окончательном варианте программы ПЦР использовали температуру отжига 55° C.

На следующем этапе работы было проведено определение G[P]-типа ротавирусов с использованием оптимизированной методики ОТ-ПЦР. За изучаемый период времени было исследовано 3689 образцов стула детей в возрасте до 14 лет, госпитализированных с диагнозом ОКИ (Табл. 2). Ротавирусы были обнаружены в 933 случаях (в среднем 25,3%, 21,8 – 27,4% в разные годы). Спектр установленных генотипов включал G1, G2, G3, G4, и G9, широко распространенные в мире (Рис. 2 А). Доминирующее положение на протяжении всего изучаемого периода занимали ротавирусы, имеющие генотип G4, их доля в среднем была 58,1%. Вторым по распространенности был генотип G9, который определен в 17,5% случаев.

Обнаружение ротавирусов в Нижнем Новгороде в 2012-2015 гг.

Сезон, гг.	Обследовано, абс.	Выявлено РВ	
		абс.	%
2012-2013	8595	196	21,8
2013-2014	1295	316	24,4
2014-2015	1535	421	27,4
Всего	3689	933	25,3

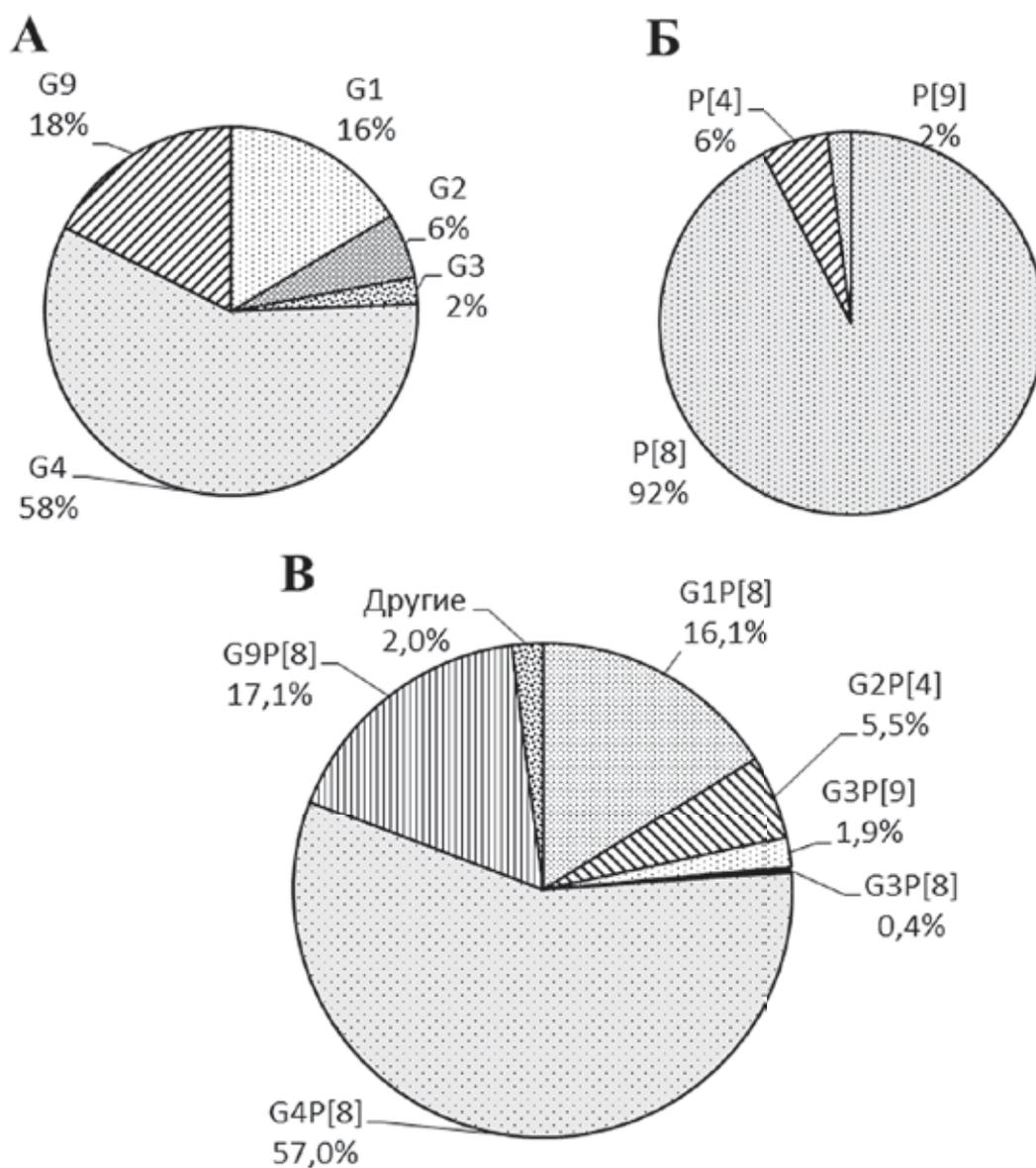


Рис. 2. Распределение G- генотипов (А), P- генотипов (Б) и их комбинаций (В) ротавирусов, выявленных в Нижнем Новгороде в 2012-2015 гг.

Спектр Р-генотипов ротавирусов, циркулирующих в Нижнем Новгороде, включал 4 типа, среди которых были как широко распространенные в мире (P[4] и P[8]), так и редкий (P[9]). Абсолютно преобладающее положение занимали ротавирусы генотипа P[8], доля их составила в среднем 92,4%. На втором месте по распространенности был генотип P[4] (5,6%). Доля генотипа P[9] была 2,0 % (Рис. 2 Б).

G- и P- генотипы были выявлены в 9 комбинациях: G1P[8], G1P[9], G2P[4], G3P[8], G3P[9], G4P[8], G4P[9], G9P[8] и G9P[9]. Доминировали штаммы, имеющие комбинацию G4P[8] (57,0 %), на втором месте были ротавирусы генотипа G9P[8] (17,1 %). Доля изолятов G1P[8] составила 16,1% и имеющих остальные комбинации в сумме была 9,8 % (Рис. 2 В).

Представленные результаты дополняют данные о генетической структуре популяции ротавирусов в других городах Российской Федерации. На территории Москвы, Махачкалы и Хабаровска в 2005-2007 гг. показано доминирование штаммов генотипа G4P[8]. В Челябинске и Тюмени, напротив, в этот период преобладали ротавирусы, имеющие генотип G1P[8] [9]. Позднее, в сезон 2011-2012 при генотипировании образцов из 11 городов Российской Федерации показано преобладание штаммов генотипа G4P[8] (выявлены в среднем в 50,5% случаев), второе место занимали ротавирусы генотипа G1P[8] (26,7%), доля ротавирусов генотипов G3P[8], G9P[8] и G2P[4] в сумме составила 16,6% [10]. Для Московского региона получены сходные результаты при исследовании генетической структуры популяции с 2009 по 2014 гг. (G4P[8] – 49% и G1P[8] – 18%) [11]. В Оренбургской области в сезон 2013-2014 гг. также показано доминирование ротавирусов генотипа G4P[8] (57,7%), однако на втором месте по распространенности был генотип G3P[8] (15,5%) [11]. В Новосибирске в 2009–2012 гг. также преобладали ротавирусы генотипа G4P[8] [12].

Полученные сведения о распределении типов ротавируса в Нижнем Новгороде согласуются с результатами исследований, проведенных в мире. Разные авторы подчеркивают ведущую роль генотипов G1P[8], G3P[8], G2P[4], G4P[8] и G9P[8] [14, 15, 16, 4, 5], в то время как G1P[9], G3P[9], G4P[9] и G9P[9] были отнесены к редким и необычным, наряду с G5P[8], G6P[8], G8P[10], G9P[5], G12P[8], G12P[9] и другими [16].

Проанализирована динамика циркуляции ротавирусов основных генотипов в 2012-2015 гг. (Рис. 3).

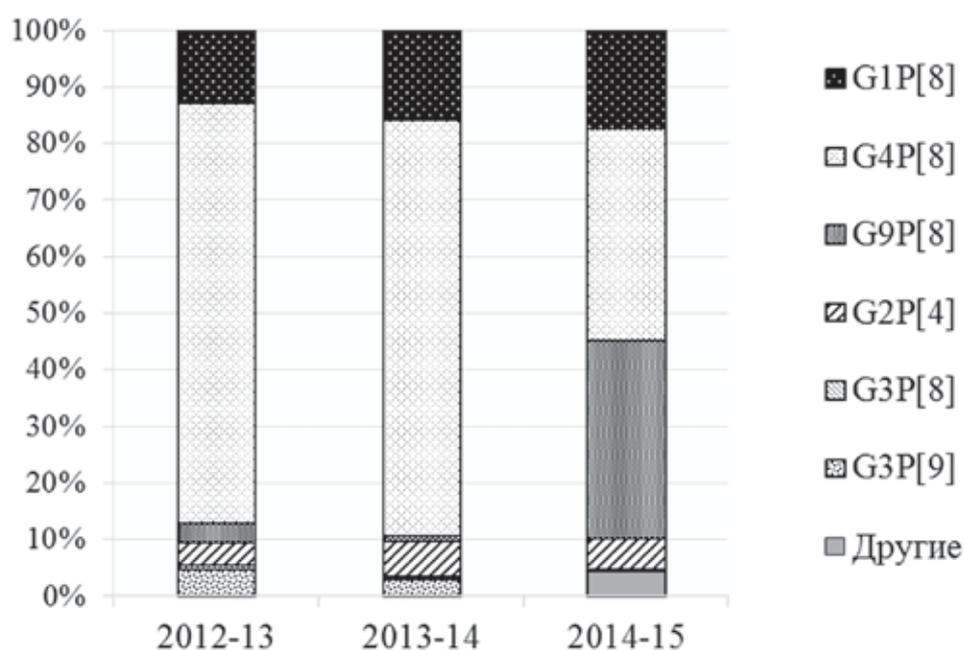


Рисунок 3. Динамика распределения основных генотипов ротавируса в Нижнем Новгороде

Варианты генотипа G4P[8] занимали доминирующее положение в Нижнем Новгороде с 2007 года, включая изучаемый период. Доля данного генотипа в популяции достигала 74,4% в 2012-2014 гг., однако, в сезон 2014-2015 гг. снизилась до 37,4% ( $p=0,0001$ ). В это время произошло усиление активности циркуляции ротавирусов генотипа G9P[8], доля которых возросла до 35,0% ( $p=0,0001$ ). Варианты G9P[8] были впервые идентифицированы в Нижнем Новгороде в 2007-2008 гг., и повышение их доли до 22,1% было зарегистрировано ранее в 2011-2012 гг. [17].

Варианты генотипа G1P[8] занимали второе место по распространенности в Нижнем Новгороде в 2012-2014 гг. (12,8% и 15,9%, соответственно). В 2014-2015 гг. их доля составила 17,5%. Ротавирусы генотипов G2P[4], G3P[8] и G3P[9] стабильно присутствовали в популяции в изучаемый период времени, однако, их доля в сумме не превышала 10%. Штаммы, имеющие генотипы G1P[9], G4P[9] и G9P[9], выявлены в Нижнем Новгороде в единичных случаях в сезон 2014-2015 гг.

Таким образом, с учетом результатов анализа нуклеотидных последовательностей четвертого и девятого сегментов генома современных штаммов ротавируса были модифицированы специфические праймеры для определения основных G- и P-генотипов и подобраны условия постановки мультиплексной ПЦР. С применением оптимизированной методики были охарактеризованы штаммы ротавируса, выявленные в Нижнем Новгороде. Спектр G[P]-генотипов включал 9 комбинаций (G1P[8], G1P[9], G2P[4], G3P[8], G3P[9], G4P[8], G4P[9], G9P[8] и G9P[9]). Ротавирусы разных генотипов имеют разный характер циркуляции на территории Нижнего Новгорода. Преобладающее положение в нижегородской популяции начиная с 2007 года занимали ротавирусы генотипа G4P[8] (74,4% в 2012-2014 гг.). Однако, в 2014-2015 гг. на фоне снижения их доли до 37,4% возросла активность циркуляции ротавирусов генотипа G9P[8] (35,0%).

#### Литература:

1. Parashar, U.D. Rotavirus and severe childhood diarrhea / U.D. Parashar, C.J. Gibson, J.S. Bresee, R.I. Glass // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 12. – P. 304–306.
2. Widdowson, M.A. Global rotavirus surveillance: determining the need and measuring the impact of rotavirus vaccines / M.A. Widdowson, D. Steele, J. Vojdani, J. Wecker, U. Parashar // *J. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 200. – P. S1–S8.
3. Zeller, M. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq / M. Zeller, J.T. Patton, E. Heylen, S. De Coster et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50, N 3. – P. 966–976.
4. Kirkwood, C.D. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs / C.D. Kirkwood // *J. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 202. – P. S43–S48.
5. Patton, J.T. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world / J.T. Patton // *Discov. Med.* – 2012. – Vol. 13, N 68. – P. 85–97.
6. Iturriza-Gomara, M. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses / M. Iturriza-Gomara, G. Kang, J. Gray // *J. Clin. Virol.* – 2004. – Vol. 31, N 4. P. 259–265.
7. Rahman, M., Typing of human rotaviruses: nucleotide mismatches between the VP7 gene and primer are associated with genotyping failure / M. Rahman, R. Sultana, G. Podder, A.S. Faruque et al. // *Virol. J.* – 2005. – Vol. 24, N 2. –P. 24.
8. G[P] генотипирование ротавирусов с использованием полимеразной цепной реакции: Методические рекомендации. – Нижний Новгород: ФГУН ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, 2007. – 16 с.
9. Podkolzin, A.T. Hospital-based surveillance of rotavirus and other viral agents of diarrhea in children and adults in Russia, 2005-2007 / A.T. Podkolzin, E.B. Fenske, N.Y. Abramycheva, G.A. Shipulin et al. // *J. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 200. – P. S228–S233.
10. Подколзин, А. Т. Позитивные и проблемные аспекты применения ротавирусных вакцин / А. Т. Подколзин, Д. Н. Петухов, О. А. Веселова, Т. А. Коновалова и др. // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* – 2013. – № 1/68. – С. 80–89.
11. Бахтояров, Г. Н. Генетическая структура штаммов ротавирусов Московского региона в период с 2009 по 2014 гг. / Г. Н. Бахтояров, Е. Б. Файзулов, Н. Н. Филатов, А. В. Линок, В. В. Курносова, В. В. Зверев // *Материалы VII Всероссийского Ежегодного конгресса по ин-*

фекционным болезням с международным участием (Москва, 30 марта–1 апреля, 2015 год). *Инфекционные болезни.* – 2015. – Т.13. – приложение N 1. – С. 37.

12. Денисюк, Н.Б. Молекулярно-генетическая характеристика ротавирусов, циркулирующих в Оренбургском регионе / Н.Б. Денисюк // *Материалы VII Всероссийского Ежегодного конгресса по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 30 марта–1 апреля, 2015 год).* *Инфекционные болезни.* – 2015. – Т.13. – приложение N 1. – С. 106.

13. Жираковская, Е.В. Генетическое разнообразие изолятов ротавирусов группы А, выявленных в западной Сибири в 2007-2011 гг. / Е.В.Жираковская, Р.Х. Аксанова, М.Г. Горбунова, А.Ю. Тикунов, А.М. Курильщикова и др. // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* – 2012. – №4. С. 33–41.

14. Gentsch, J.R. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs / J.R. Gentsch, A.R. Laird, B. Bielfelt et al. // *J. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 192. – P. S146-S159.

15. 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. – P. 29– 56.

16. Banyai, K. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs / K. Banyai, B. Laszlo, J. Duque, A.D. Steele et al. // *Vaccine.* – 2012. – Vol. 30. – P. 122–130.

17. Епифанова, Н.В. Характеристика ротавируса генотипа G9, выявленного в Нижнем Новгороде в 2011–12 годах / Н.В. Епифанова, О.В. Морозова, Т.А. Сашина, Н.А. Новикова // *Медицинский алфавит. Эпидемиология и гигиена.* – 2013. – Т. 4. – N. 24. – С. 20–26.

## **СИСТЕМАТИЗАЦИЯ И ОРГАНИЗАЦИЯ ХРАНЕНИЯ ДАННЫХ ПО ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ В СУБЪЕКТАХ ПФО В РАМКАХ РАБОТ ПО ПРОЕКТУ «ЭЛЕКТРОННЫЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АТЛАС ПФО»**

**Солнцев Л.А.**

*ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

В соответствии с отраслевой научно-исследовательской программой «*Научные аспекты обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в Российской Федерации на 2006-2010 годы*», утвержденной Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 23 сентября 2006 года, в ФБУН ННИИЭМ реализуется геоинформационный проект «*Электронный эпидемиологический атлас Приволжского федерального округа*». Последний является частью опытно-экспериментальной работы «*Разработка геоинформационной системы органов государственной власти ПФО*».

Целью проекта является создание эффективной системы мониторинга за развитием эпидемического процесса актуальных инфекционных заболеваний в ПФО на основе геоинформационных технологий. Атлас является динамически развивающимся проектом, постоянно дополняемым новыми данными и функционалом. Он содержит следующие разделы:

1. Санитарно-эпидемиологические правила по профилактике заболеваний
2. Пространственная и временная динамика для заболеваний из списка наиболее актуальных для территорий следующих уровней административного деления:
  - а. Федеральные округа Российской Федерации (с привязкой к территории и годам регистрации)
  - б. Муниципальные районы отдельных областей (с привязкой к территории и годам регистрации)
  - в. Административно-территориальные образования в составе городских округов (с привязкой к территории и годам регистрации)

3. Раздел, связанный с ВИЧ инфекцией:

а. Общие данные по ПФО (с привязкой к территории и годам регистрации)

б. Структура мутаций, определяющих резистентность ВИЧ-1, к различным группам АРВП (с привязкой к территории и годам регистрации)

в. Распространенность мутаций резистентности ВИЧ-1 к АРВП (с привязкой к территории и годам регистрации)

г. Распространённость субтипов ВИЧ-1 в ПФО

д. Смертность среди ВИЧ-инфицированных (с привязкой к территории и годам регистрации)

4. Аналитические данные:

а. Анализ инфекционной заболеваемости в Приволжском Федеральном округе (обновляется ежегодно)

б. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях в Приволжском федеральном округе (обновляется ежегодно)

Функциональное ядро атласа составляет база данных (БД) SQL, в которой хранится вся информация в виде связанных таблиц. С помощью языка PHP данные извлекаются и формируются сводные таблицы, графики временной динамики и картосхемы. Особенностью атласа является то, что пользователь всегда имеет возможность получить доступ к исходной табличной информации и, таким образом, не ограничен только теми видами анализа и представления данных, которые заложены в функционал атласа разработчиками. Атлас является законченной системой, т.е. помимо функционала хранения и представления данных, обладает интерфейсом ввода новых данных. Эти дополнения автоматически регистрируются в системе и сразу после ввода учитываются при формировании результирующих данных.

Одной из проблем при формировании БД является то обстоятельство, что на сегодняшний день в ПФО используются параллельно 3 программных продукта для учёта данных по заболеваемости:

1. Программа «Анализ популяционной заболеваемости» (АПЗ)

2. Программа АС «СТАТИСТИКА РОСПОТРЕБНАДЗОР» (КРИСТА)

3. Программные решения, которые разработаны собственными силами

При этом данные в каждом программном продукте хранятся в собственном формате, в ряде случаев являющимся закрытым (т.е. с таким форматом можно работать, используя только то программное обеспечение (ПО), в котором он был создан). Кроме того, во всех вышеперечисленных системах существует общая особенность, связанная с низкими способностями экспортировать хранящуюся в них информацию. Как правило – это только стандартизованные формы. Данное обстоятельство, учитывая характер ПО и ставящиеся перед ним задачи, никоим образом не является недостатком, но приводит к необходимости создания неких промежуточных средств для конвертации данных из отчётов в необходимый вид.

Таким образом, для решения задачи сбора, хранения и поддержания в актуальном состоянии БД атласа необходимо было решить следующие задачи:

1. Выбор СУБД для хранения данных

2. Разработка архитектуры БД

3. Выработка, тестирование и внедрение в практику протокола обмена данными между территориальными органами Роспотребнадзора и ФБУН ННИИЭМ

4. Создание необходимых программных средств для полуавтоматической и автоматической обработки отчётов, формируемых территориальными органами Роспотребнадзора и ввода их в БД.

В качестве системы хранения была выбрана СУБД MySQL, как обеспечивающая нужный функционал, хорошо документированная и распространяемая по лицензии GPL. Для хранения данных была выбрана следующая схема организации:

1. Для каждого субъекта заводится две таблицы:
  - а. Таблица, содержащая данные по абсолютным значениям (число заболевших) с указанием года, месяца, административного района, заболевания и контингента учёта
  - б. Таблица, содержащая данные по численности населения с указанием года, административного района и контингента учёта
2. Таблица, содержащая справочник заболеваний (для каждой территории)
3. Таблица, содержащая данные по административно-территориальному делению ПФО с хранением пространственной информации

В общем виде схема повторяет таковую, применяемую в программе АПЗ. Отличительной чертой является то, что для каждой территории используется свой список названий заболеваний и их численные коды. Это связано с тем, что в формах отчётов одно и то же заболевание может называться по-разному. Например, «Паратиф А, В, С» и «Паратифы А, В, С». В данном случае при автоматической обработке данные записи будут распознаны как разные заболевания, что приведёт к искажению информации. Каждое заболевание получает свой уникальный числовой код, который и хранится в таблицах из п.1. Аналогичным образом кодируются и территории. Каждая получает код, состоящий из 4-х знаков. Первые два являются автомобильным кодом субъекта. Две последние цифры кодируют район в пределах субъекта ПФО (от 01 до 69), город (от 70 до 98) и столицу субъекта (99). Таким образом, по коду территории можно определить её принадлежность. В получаемых от субъектов отчётах находится информация о ежемесячной заболеваемости (абсолютной и относительной) по инфекциям (Форма 2) для всех административных единиц субъекта. В процессе обработки на основе этих данных формируются таблицы 1а и 1б. При этом численность населения получается путём обратного пересчёта на основе абсолютных и относительных показателей. В процессе работы был выявлен недостаток такого подхода расчёта численности населения, связанный с тем, что в отчётах значения показателя заболеваемости округляются до второго или третьего знака после запятой, что приводит к искажению результатов расчётов. Поэтому было принято решение получать данные по численности отдельно раз в год.

Важно отметить тот факт, что сама процедура формирования отчётов является встроенной во все используемые программные средства и, таким образом, минимизированы дополнительные трудозатраты. Основным принцип создания протокола обмена можно охарактеризовать как «Скажите, в каком виде вы можете выгрузить данные и мы будем стараться его использовать». В качестве обменного формата был выбран формат электронных таблиц XLS (XSLX). Данный формат доступен как средство экспорта во всех программных продуктах, используемых в ПФО. Кроме того, являясь по сути массивом с достаточно жёстко заданной структурой, он удобен для автоматической обработки и преобразования. По состоянию на январь 2016 года протокол обмена прошёл первичное тестирование в так сказать «боевых условиях». Были получены и обработаны как массивы данных (глубина до 2010 года), так и ежемесячные отчёты, которые в дальнейшем становятся основной формой обмена.

Со стороны ФБУН ННИИЭМ были созданы три системы, которые обеспечивают конвертацию присылаемых отчётов в формат таблиц БД. Основным является инструмент, который принимает на вход XLS файл отчёта и переводит его в промежуточный формат для дальнейшего экспорта в БД. При этом реализована двойная система контроля корректности ввода: проверяется как формальное соответствие структуры отчёта исходно заданным критериям (расположение и название полей и т.д.), так и выборочный обратный контроль, когда полученные после конвертации значения сравниваются в теми, которые были в исходном отчёте. Кроме того, разработан инструмент для точечной коррекции уже введённых данных и инструмент, для конвертации полученных таблиц в SQL транзакции. Таким образом, труд оператора ввода данных также максимально автоматизирован.

## ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ: ДОМИНИРОВАНИЕ CRF63\_02A1 И ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ УНИКАЛЬНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФОРМ ВИЧ-1

Тотменин А.В.<sup>1</sup>, Зырянова Д.П.<sup>1</sup>, Астахова Е.М.<sup>1</sup>, Ивлев В.В.<sup>1</sup>, Гашникова М.П.<sup>1</sup>, Поздняков П.И.<sup>1</sup>, Москалева Н.В.<sup>2</sup>, Айкин С.С.<sup>2</sup>, Булатова Т.Н.<sup>2</sup>, Гашникова Н.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область;

<sup>2</sup>Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Кемеровской области «Кемеровский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Кемерово

Распространение ВИЧ-инфекции в Кемеровской области (КО), как и на большинстве территорий страны, началось в середине 90-х, когда был зарегистрирован первый пациент, инфицированный ВИЧ-1. До 1999 в области выявлялись лишь единичные случаи заражения ВИЧ-1. Взрыв эпидемии произошел в 2001 г, когда было отмечено 30-кратное увеличение новых случаев ВИЧ-инфекции (1603 человек, Рис. 1.). Именно в конце 90-х, в начале 2000-х наблюдалась резкая активизация распространения ВИЧ-инфекции на многих территориях Сибири, связанная с масштабным ростом наркотрафика из Афганистана через страны Средней Азии по так называемому «северному пути», значительным увеличением количества ПИН и распространением ВИЧ среди этой группы лиц. В последующем до 2007 г включительно наблюдалась относительная стабилизация эпидемии с ежегодной выявляемостью около 1 тыс. новых ВИЧ-инфицированных. Вторая волна эпидемии в КО началась в 2008 г (Рис. 1.).

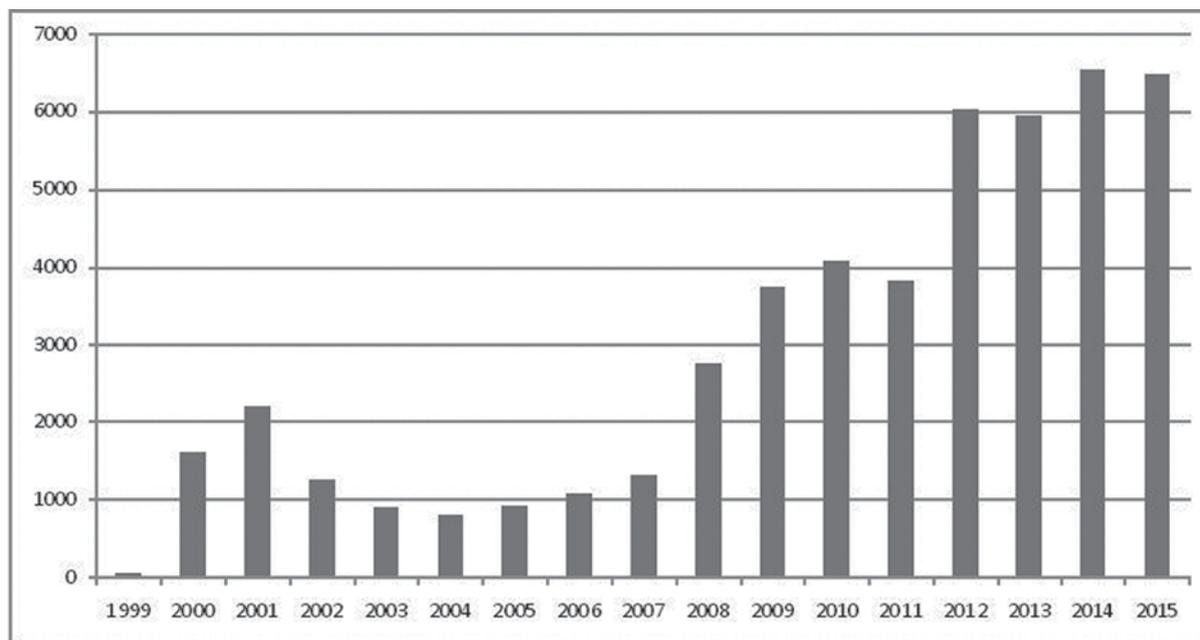


Рисунок 1. Динамика выявления новых случаев ВИЧ-инфекции в Кемеровской области по годам.

На протяжении последних пяти лет КО занимает первое место среди регионов России по числу новых выявленных случаев ВИЧ-инфекции на 100 тысяч населения, с 2012 г количество ВИЧ+ лиц ежегодно увеличивается на 6-6,5 тысяч человек. Распространенность ВИЧ-1 в КО на начало 2016 года достигла 1402,7 на 100 тысяч населения, что значительно превышает средний показатель по России (541,8). На протяжении эпидемии вклад основных путей распространения ВИЧ-инфекции в КО существенно менялся (Рис. 2.).

Основные вспышки эпидемии 2001, 2008 и 2012 гг. сопровождалась резким ростом инфицирования в группе ПИН. В 2006-7 годах преобладающим был половой путь передачи. На январь 2016 г в КО общее число ВИЧ-инфицированных лиц достигло 49517 человек. Основными путями распространения ВИЧ-инфекции в 2015 г стали введение наркотиков внутривенно (49,6%) и половой путь (49,0%), передача вируса от матери к ребенку регистрировалась на уровне 1,4%.

Принимая во внимание высокий уровень пораженности жителей КО ВИЧ-1 и существенное изменение молекулярно-эпидемической ситуации по распространению ВИЧ-1 в двух граничащих с КО регионах, представлялось важным изучить вклад отдельных генетических вариантов ВИЧ-1 в развитие данной территориальной эпидемии.

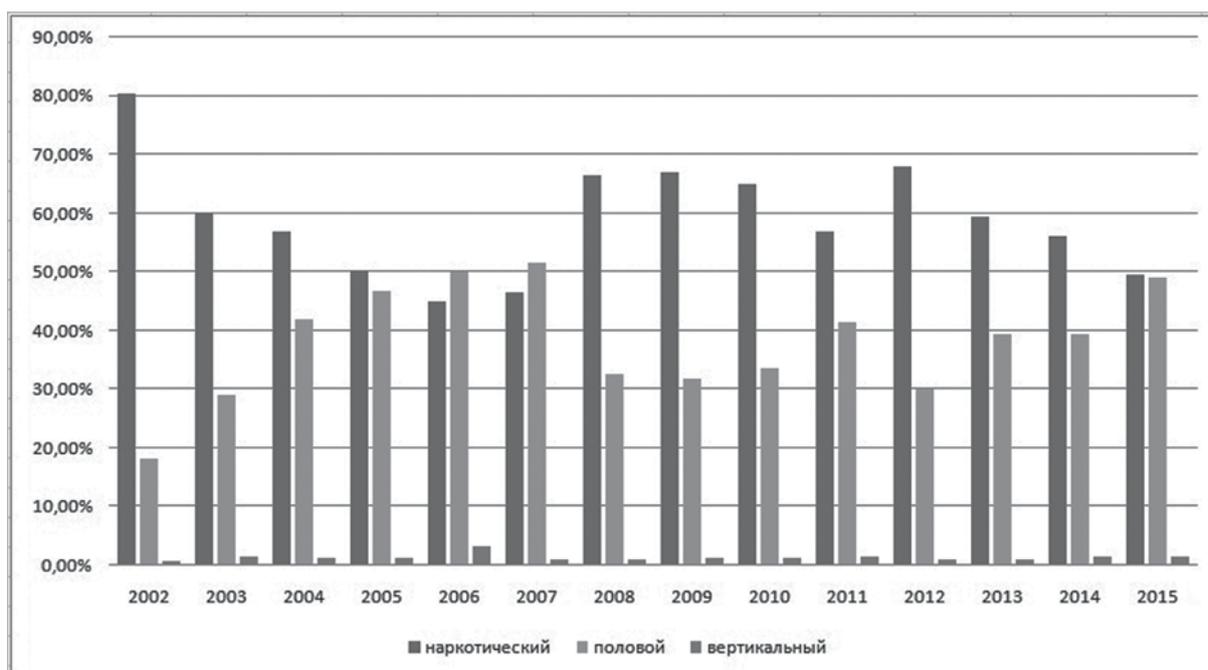


Рис. 2. Распределение основных путей инфицирования ВИЧ-1 в Кемеровской области в 2002 – 2015 годах.

### Материалы и методы

В исследование вовлечены 63 человека, проживающие в Кемеровской области. Образцы крови, клинические и эпидемиологические данные пациентов собраны специалистами ГБУЗ КО «Кемеровский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями». Образцы крови были связаны с демографическими и клиническими данными посредством анонимных кодированных номеров по требованиям этических норм России. Исследование клинических образцов крови проведено с соблюдением этических стандартов и требований Хельсинской декларации 1975 года, требований Постановления Межпарламентской Ассамблеи государств-участников Содружества Независимых Государств от 18 ноября 2005 года № 26-10 «О защите прав и достоинства человека в биомедицинских исследованиях в государствах-участниках СНГ». Характеристики образцов крови включали пол и возраст ВИЧ-инфицированных пациентов, путь инфицирования и предполагаемый период заражения, вирусную нагрузку и количество клеток CD4 на момент постановки диагноза.

Выделение РНК из отобранных образцов проводилось набором «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Для каждого клинического образца с использованием вирус-специфичных праймеров и реагентов для постановки ОТ и ПЦР (ООО «Биолабмикс», Россия) нарабатывались по три фрагмента генома ВИЧ-1: два фрагмента гена *pol*, кодирующие область протеазы-ревертазы (PR-RT, протяженностью 1400 нт.), область интегразы (IN, 960 нт.) и фрагмент, кодирующий участок основного белка оболочки вируса –env (732 нт.).

нуклеотидной последовательности проводили на автоматическом секвенаторе 3130xl (Applied Biosystems, США). Для теоретического анализа использовали референсные нуклеотидные последовательности основных субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1 из международной базы данных (Los Alamos HIV Sequence Database, <http://www.hiv.lanl.gov/>). Филогенетический анализ и определение субтипа ВИЧ-1 выполняли с помощью программы Mega 6.0 [1] путем построения филогенетических деревьев методом присоединения «ближайших соседей» (neighbor joining). Статистическую значимость топологии филогенетического дерева оценивали бутстреп-анализом. Рекомбинационный анализ выполняли с использованием Simplot v 3.5.1 с шагом 200 нт [2].

### **Результаты и обсуждение**

С целью изучения современной молекулярно-эпидемической ситуации по распространению ВИЧ-1 в данное исследование были вовлечены лица с впервые выявленной в 2015 году ВИЧ-инфекцией. Проведен сбор образцов периферической крови и клинико-эпидемических данных для 65 жителей Кемеровской области. Для 56 из них из плазмы крови была успешно выделена вирусная РНК и для вариантов ВИЧ-1 получены вирусные фрагменты, кодирующие протеазу-ревертазу, интегразу и основной белок оболочки ВИЧ-1, осуществлены секвенирование и анализ вирусных фрагментов. Для 9 образцов с низкой концентрацией РНК ВИЧ-1 не были получены ВИЧ-специфические фрагменты необходимого размера. Три человека с возможными эпидемическими связями были исключены из последующего анализа. Исследуемая выборка включала 31 (55,6%) мужчину и 22 (44,4%) женщины, средний возраст пациентов был 34,1 (21-60 лет); 62,3% сообщили об употреблении инъекционных наркотиков (ПИН), 37,7% были инфицированы при гетеросексуальных контактах. Среди группы лиц ПИН в 44,1% случаев наряду с героином/ханкой использовались соли и/или синтетические психостимуляторы. Эпидемическое расследование позволило заключить, что 84,9% пациентов были инфицированы после 2011-2014гг, для 26 (49%) из них предполагаемый период инфицирования включал 2014-2015 гг. Анализ эпидемических данных пациентов, вовлеченных в исследование, позволил заключить, что данная выборка достаточно корректно отражает характеристики современной эпидемии ВИЧ-инфекции в КО.

Проведение филогенетического и рекомбинационного анализов показало, что среди 53 исследованных ВИЧ-1 38 вариантов являлись недавно возникшей рекомбинантной формой CRF63\_02A1 (71,7%), из 4-х образцов был выделен субтип А (7,5%) ВИЧ-1 и в 11 (20,8%) случаях обнаружены уникальные рекомбинантные формы вируса, обозначенные нами URF63\_A1, так как геномы этих вирусных вариантов имели области, частично идентичные референсным последовательностям CRF63\_02A1, частично – последовательностям субтипа А ВИЧ-1 (Табл. 1.).

Важно отметить, что при генотипировании вируса лишь по одной из трех исследованных областей генома вируса выявляемость уникальных рекомбинантных форм ВИЧ значительно снижалась: при анализе области PR-RT было детектировано 5 отличающихся URF ВИЧ-1, по области IN – 3 URF, по области env к URF было отнесено лишь 2 варианта вируса. Из таблицы видно, что все обнаруженные рекомбинантные формы ВИЧ-1 являются уникальными, отличающимися как по областям рекомбинации, так и по структуре получившегося при рекомбинации генома вируса. Данный факт указывает на то, что эти уникальные вирусы произошли в результате различных рекомбинационных событий. В 9 (81,8%) случаях URF ВИЧ-1 были выявлены у ПИН, из которых пять человек являлись «смешанными наркоманами», употреблявшими одновременно героин и/или ханку, соли и/или синтетические психостимуляторы; в двух случаях URF ВИЧ-1 были выделены от женщин 21 и 27 лет, инфицированных при гетеросексуальных контактах.

Кроме филогенетического изучения вирусов был выполнен анализ наличия мутаций, влияющих на чувствительность ВИЧ-1 к АРВП. Показано, что все 100% ВИЧ-1 CRF63\_02A1 содержат характерную минорную мутацию K20I, снижающую чувствительность к NFV.

В 9,4% случаев выявлялась замена L10I/V, связанная со снижением чувствительности вируса к ингибиторам протеазы/с улучшением репликативных характеристик вируса в присутствии

ИП. В единичных случаях были найдены мутации Q58E (определяет низкий уровень резистентности к NFV и TPV/r) и L24I (потенциально низкий уровень устойчивости ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV, SQV/r). Основных мутаций устойчивости к ИП выявлено не было.

Таблица 1.

Генетические варианты ВИЧ-1 и их распространенность среди впервые выявленных в 2015 г ВИЧ-инфицированных жителей Кемеровской области.

Кол-во Образцов	Генотип ВИЧ-1 по области PR-RT	Генотип ВИЧ-1 по области IN	Генотип ВИЧ-1 по области env	Генетический вариант ВИЧ-1
38	CRF63_02A1	CRF63_02A1	CRF63_02A1	CRF63_02A1
4	A1	A1	A1	A1
1	н.и.*	CRF63/A1/CRF63	A1/CRF63/A1	URF63_A1
1	A1/CRF63	CRF63/A1	CRF63_02A1	URF63_A1
1	A1/CRF63	A1	CRF63_02A1	URF63_A1
1	CRF63/A1/CRF63	A1	CRF63_02A1	URF63_A1
1	н.и.	CRF63_02A1	A1	URF63_A1
1	CRF63/A1/CRF63	A1	A1	URF63_A1
1	A1	A1	CRF63/A1	URF63_A1
1	CRF63_02A1	A1/CRF63	A1	URF63_A1
1	CRF63_02A1	CRF63_02A1	A1	URF63_A1
1	CRF63/A1	A1	A1	URF63_A1
1	CRF63_02A1	A1	A1	URF63_A1

н.и.\* - нуклеотидная последовательность не определена

Важно, что мутации, вызывающие резистентность к НИОТ и ННИОТ (M41L, E138A, Y188L, K103N и V108I) также регистрировались лишь в единичных случаях. Обращают на себя внимание мутации Y188L (вызывающая более, чем 50-кратное снижение чувствительности к NVP и EFV и 5-кратное снижение к RPV) и K103N, ответственная за высокий уровень резистентности к NVP и 20-кратное снижение чувствительности к EFV. Другие обнаруженные мутации вызывают лишь потенциальную/слабую резистентность к соответствующим АРВП. Низкая первичная распространенность резистентных ВИЧ-1 является благоприятным прогностическим фактором территориальной эпидемии.

Изучение циркулирующих в России ВИЧ-1 показало, что в Сибири, как и на других территориях страны, основными вирусными вариантами, определяющими развитие эпидемии, были субтипы А и В ВИЧ-1 с доминированием субтипа А, распространенность которого превышала 90-95% [3, 4, 5]. В Новосибирской области (НСО), граничащей с КО, в 2008 году нами впервые был выявлен, а в 2011 описан новый вариант CRF63\_02A1 ВИЧ-1 [6, 7]. ВИЧ-1 CRF63\_02A1 в НСО к 2011 г выявлялся более, чем в 80% новых случаев инфицирования, практически вытеснив доминировавший ранее субтип А ВИЧ-1 [8]. Результаты изучения молекулярно-генетических особенностей вспышки эпидемии в соседней с КО Томской области (ТО), где в 2013 г произошло кратное увеличение количества впервые выявленных ВИЧ-инфицированных лиц, показали, что более, чем в 80% случаев заболевание также было вызвано инфицированием CRF63\_02A1 ВИЧ-1 [9].

Ранее в период 2007-2009 гг. нами выполнялись ограниченные исследования области PR-RT циркулирующих в КО ВИЧ-1, связанные с анализом резистентности вируса и проведением эпидемиологических исследований (46 исследований ВИЧ-1), по результатам которых варианты ВИЧ-1 в абсолютном большинстве были отнесены к субтипу А ВИЧ-1, в единичных случаях выявлялся субтип В ВИЧ-1. В 2013 году впервые при генотипировании ВИЧ-1, выделенных от жителей КО (31 человек из городов Новокузнецк и Юрга), инфицированных в 2006-2012 гг., в 11 (29%) случаях была выявлена CRF63\_02A1 ВИЧ-1, в 3 (9.7%) субтип В и в 19 (61.3%) – субтип А ВИЧ-1 [10].

Принимая во внимание данные, полученные нами при исследовании ВИЧ-1, выделенных в

КО до 2013 года, и данные по распространенности геновариантов ВИЧ-1, выделенных от лиц с впервые диагностированной ВИЧ-инфекцией в КО в 2015 году, можно предположить, что вспышка распространения CRF63\_02A1 ВИЧ-1 среди жителей КО происходила параллельно с третьей «волной» активизации эпидемии ВИЧ-инфекции среди ПИН, которая наблюдалась в 2012 году (Рис. 1, 2). Вероятно, данная ситуация произошла благодаря значительному увеличению количества потребителей солей и синтетических психоактивных препаратов, что стало возможным в результате тысячекратного роста объемов транспорта доступных по стоимости синтетических наркотических препаратов с территории Китая, выявляемого на многих территориях СФО с 2009 по 2015 гг.

Ситуации по распространению CRF63\_02A1 ВИЧ-1 в КО, НСО и ТО имели существенные различия. В НСО, как показал ретроспективный анализ ситуации, распространение геноварианта CRF63\_02A1, возникшего в результате рекомбинации вариантов ВИЧ-1 CRF02\_AG и субтипа А, происходило с начала 2000-х на фоне слабой пораженности населения с быстрым замещением основного российского ВИЧ-1 субтипа А в период активизации эпидемии в области в период 2008-9 годов, со стабилизацией процесса (со сменой доминирующего геноварианта вируса) в 2011 году. В Томской области, на территорию которой ВИЧ-1 CRF63\_02A1 также проник на фоне низкой распространенности ВИЧ-инфекции, этот геновариант распространился среди ПИН и другого населения области буквально в течение двух лет (2013-2014 гг.), вытеснив доминировавший ранее субтип А ВИЧ-1 при необычайно резкой активизации эпидемического процесса.

В КО занос CRF63\_02A1 ВИЧ-1 произошел при высокой пораженности населения ВИЧ-1 субтипа А. Несмотря на это, как показали результаты настоящего исследования, и на данной территории именно новый рекомбинантный вариант CRF63\_02A1 определяет развитие современной эпидемии ВИЧ-1. Вероятно, высокая исходная распространенность субтипа А ВИЧ-1 в основной группе риска – ПИН, практикующих поведение, способствующее повторному инфицированию, является основной причиной крайне высокой частоты возникновения вторичных уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1.

Необходимо подчеркнуть, что постоянное возникновение новых рекомбинантных форм вируса способствует его «скачкообразной» эволюции, в результате чего могут появляться все новые варианты ВИЧ, имеющие особенности и преимущества перед своими прародителями. Недавняя история развития эпидемии в СФО это прекрасно демонстрирует - недавно возникший рекомбинантный вирус CRF63\_02A1 благодаря особенностям своей биологии и «благоприятным» условиям территориальных эпидемий вытеснил субтип А ВИЧ-1, ответственный за предыдущую историю эпидемии ВИЧ-инфекции в России.

**Выводы.** КО – третья территория СФО, где развивается новая эпидемия ВИЧ-инфекции, основной чертой которой является доминирование CRF63\_02A1 и возникновение уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1. Очень высокая частота появления новых генетических вариантов ВИЧ-1 может стать дополнительным фактором, «усугубляющим» как территориальную, так и общероссийскую эпидемию, поэтому необходимо периодически контролировать молекулярно-эпидемиологическую ситуацию по распространению ВИЧ-1 в КО. Активное распространение на территориях СФО CRF63\_02A1 ВИЧ-1 и URF на основе этого генетического варианта указывает на необходимость углубленного исследования биологии данного вируса и патогенеза вызываемого им заболевания.

Выявление распространения уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1 среди молодежи и в группе ПИН говорит о важности проведения в этих группах лиц специфических профилактических мероприятий, направленных на предупреждение повторного заражения ВИЧ.

Данное исследование доказало, что для проведения корректного анализа распространения современных генетических вариантов ВИЧ-1 с целью прогнозирования развития не только территориальных эпидемий, но и характера изменения молекулярно-эпидемической ситуации по России в целом необходимо исследовать не менее двух различных областей генома циркулирующих вирусов.

#### Литература:

1. Tamura K., Stecher G., Peterson D., et al. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // *Molecular Biology and Evolution*. – 2013. -V.30. – P.2725-2729.
2. Lole K. S., Bollinger R. C., Paranjape R. S., et al. Full-length human immunodeficiency virus

type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination // *J Virol.* – 1999. – V.73. – P.152-160.

3. Коломеец А.Н., Сергеева И.В.. Анализ распространенности лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в регионах Сибирского федерального округа // *ЗНИСО.* – 2012. - №01. - С.22-24.

4. Fernández-García A., Revilla A., Vázquez-de Parga E., Vinogradova A., Rakhmanova A., Karamov E., Carrera C, Delgado E., Pérez-Blvarez L., Nájera R, Osmanov S., Thomson M.M. The analysis of near full-length genome sequences of HIV type 1 subtype A viruses from Russia supports the monophyly of major intrasubtype clusters // *AIDS Res Hum Retroviruses.* – 2012. – V.28. – P.1340-1343.

5. Богачев В.В., Тотменин А.В., Барышев П.Б., Мещерякова Ю.В., Черноусова Н.Я., Гашникова Н.М. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1 субтипов А и В, выделенных на территории Новосибирской области // *ЖМЭИ.* – 2012. - №6. – С.45-52.

6. Гашникова Н.М., Сафронов П.Ф., Никонорова Ю.В., Унагаева Н.В., Лаптева Т.А., Богачев В.В., Барышев П.Б., Тотменин А.В., Букин Е.К., Бочаров Е.Ф., Черноусова Н.Я., Ставский Е.А. Свойства изолятов CRF02\_AG ВИЧ-1, циркулирующих на территории Новосибирской области // *ЖМЭИ.* – 2011. - №3. – С.38-43.

7. Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. The HIV-1 Genetic Diversity in Russia: CRF63\_02A1, a New HIV-1 Genetic Variant Spreading in Siberia // *AIDS Research and Human Retroviruses.* – 2014. – V. 30. – P.592-597.

8. Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. Genetic characterization of an isolate of HIV type 1 AG recombinant form circulating in Siberia, Russia // *Arch Virol.* – 2012. – V. 157. – P. 2335–2341.

9. Gashnikova N.M., Bogachev V.V., Baryshev P.B., Totmenin A.V., Gashnikova M.P., Kazachinskaya A.G., Ismailova T.N., Stepanova S.A., Chernov A.S., Mikheev V.N.. A rapid expansion of HIV-1 CRF63\_02A1 among newly diagnosed HIV-infected individuals in the Tomsk Region, Russia // *AIDS Research and Human Retroviruses.* – 2015. – V. 31. – P.456-460.

10. Казачинская А.Г., Барышев П.Б., Тотменин А.В., Чубарева Е.А., Ачигечева П.Ю., Золотарева И.В., Мирджамалова Ф.О., Топчин Ю.А., Черноусова Н.Я., Чичамкина Н.В., Абрамов В.А., Гашникова Н.М. Территориальные особенности распространения генетических вариантов ВИЧ-1 в Сибирском Федеральном округе // *Медицина и образование в Сибири.* – 2013. - №3.

## **НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ОЦЕНКЕ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ШТАММОВ НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫХ ЭНТЕРОВИРУСОВ ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ИХ ЦИРКУЛЯЦИИ НА ТЕРРИТОРИИ МЕГАПОЛИСА**

**Устюжанин А.В., Алимов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г.**

*ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций»  
Роспотребнадзора, Екатеринбург*

В Российской Федерации эпидемиологический надзор за энтеровирусными инфекциями (ЭВИ) рассматривается в качестве одной из составляющих частей надзора за полиомиелитом в постсертификационный период в рамках реализации Национального плана по поддержанию свободного от полиомиелита статуса Российской Федерации. Система Государственного санитарно-эпидемиологического надзора за ЭВИ в России регламентируется соответствующими нормативными документами (МУ 3.1.1.2363-08, СП 3.1.2950-11 «Профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции») и включает в качестве одного из основных направлений мониторинг циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ), который заключается в исследовании клинического материала от больных и проб из объектов внешней среды (сточные воды) как с помощью традиционного вирусологического метода с использованием клеточных культур, так и с применением методов молекулярной диагностики (ПЦР, секвенирование).

Однако решение основной задачи санитарно-эпидемиологического надзора – прогнозирование

вание развития эпидемического процесса по заболеваемости ЭВИ остается весьма затруднительным, поскольку до настоящего времени не разработан алгоритм анализа и интерпретации результатов мониторинга и это диктует необходимость поиска новых подходов к повышению информативности методов исследования эпидемического процесса.

Недостаточность информации, получаемой при существующей системе мониторинга циркуляции НПЭВ, для прогнозирования эпидемического процесса становится очевидной при оценке значимости результатов вирусологического исследования клинического материала от больных ЭВИ и проб из объектов внешней среды.

Так, определение спектра возбудителей, обнаруживаемых у больных ЭВИ, позволяет выявить доминирующий этиологический агент, однако оставляет открытым вопрос о степени его вирулентности, что существенно затрудняет прогнозирование развития эпидемического процесса [1, 2].

Обнаружение энтеровирусов в пробах сточных вод дает лишь весьма приблизительную картину интенсивности циркуляции НПЭВ среди населения. В ряде работ показано преимущественное выделение из сточных вод вакцинных полиовирусов, наличие высокого процента нетипируемых цитопатогенных агентов, несовпадение спектра серотипов, обнаруживаемых в объектах внешней среды и у больных ЭВИ [3]. Существенным недостатком использования клеточных культур для выявления НПЭВ в сточных водах является наличие большой группы некультивируемых и плохо культивируемых серотипов, остающихся за пределами поля зрения исследователей. Применение молекулярно-генетического метода индикации НПЭВ (ПЦР) позволяет значительно повысить процент обнаружения положительных проб, однако попытки дальнейшего генотипирования методом секвенирования не дают положительного результата в связи с тем, что в сточной воде присутствует более одного серотипа НПЭВ [4].

Таким образом, задача совершенствования системы мониторинга НПЭВ остается актуальной и нуждается в дополнении информацией о масштабах циркуляции возбудителей среди здорового населения, степени вирулентности и эпидемиологической значимости циркулирующих штаммов.

Целью настоящего исследования явилась оценка степени вирулентности и эпидемической значимости штаммов НПЭВ по данным молекулярно-генетического мониторинга их циркуляции среди населения г. Екатеринбурга в 2010-2014 гг.

#### **Материалы и методы**

Всего на предмет обнаружения РНК энтеровирусов исследована 421 проба ликвора от больных с диагнозом: «Энтеровирусный менингит» (ЭВМ) и 2098 пробы фекалий, полученных методом случайной выборки в период с июня 2010 г. по сентябрь 2014 г. от клинически здоровых детей в возрасте 3 - 6 лет (индикаторная группа), проживающих на территории г.Екатеринбурга.

Выделение вирусной РНК из исследуемого материала, реакцию обратной транскрипции и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием комплектов реагентов «РИБО-сорб», «РЕВЕРТА-L-100», «АмплиСенс Энтеровирус-207» производства ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва).

Генотипирование обнаруженных энтеровирусов осуществляли методом прямого секвенирования последовательностей участков генома, кодирующих белки VP1 и VP2 на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) по описанной ранее методике и дальнейшего их сравнения с помощью программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) с последовательностями, депонированными в международном банке генетической информации NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) [5, 6, 7].

#### **Результаты**

Спектр серотипов НПЭВ, обнаруженных в пробах ликвора больных ЭВМ за период наблюдения, представлен в Таблице 1.

Таблица 1

## Спектр серотипов НПЭВ, обнаруженных в пробах ликвора больных энтеровирусным менингитом

Год	Кол-во проб	Количество идентифицированных штаммов		Спектр серотипов
		Абс.	%	
2008	45	32	71	CA9 E 5, 6, 7, 11, 17, 30
2009	18	16	88,8	E 9, 14, 30
2011	18	14	78	CA 9 E 6, 9, 17, 18
2012	177	162	91,5	CA 9 CB 1, 2, 3, 4, 5 E 5, 6, 7, 14, 18, 25, 30
2013	123	103	83,7	CA 9 CB 2, 3, 4, 5 E 6, 9, 11, 14, 18, 30
2014	40	39	97,5	CA 9 CB 4, 5 E 2, 6, 14, 18, 30, EV97
Всего	421	366	86,9	

Всего было идентифицировано 18 серотипов НПЭВ, относящихся к виду В. Наибольшее разнообразие серотипов выявлено в 2012 г. и 2013 г. (13 и 11 серотипов, соответственно). На протяжении периода наблюдения ежегодно обнаруживался вирус Коксаки А9; в течение четырех лет подряд - вирусы ЕСНО6 и ЕСНО18. По три года подряд среди этиологических агентов ЭВМ фигурировали вирусы Коксаки В4, В5, ЕСНО14 и ЕСНО30.

Из 366 идентифицированных штаммов подавляющее большинство (73%) было представлено вирусами ЕСНО, что согласуется с данными литературы о преобладании вирусов этой группы в этиологической структуре ЭВМ [8, 9]. Среди вирусов группы ЕСНО ведущая роль принадлежала в 2012 г. вирусу ЕСНО6, а в 2013 г. - вирусу ЕСНО30 (40,1% и 58,5% среди выделенных штаммов, соответственно). Суммарная доля двух указанных серотипов среди всех идентифицированных штаммов равнялась 51,9%.

Следующими по частоте выявления в ликворе больных ЭВМ были вирусы Коксаки А9 и ЕСНО18, обнаруженные в 13,9% и 7,9% случаев, соответственно.

С 2010 по 2014 гг. методом ПЦР было исследовано 2114 образцов фекалий от детей индикаторной группы. РНК НПЭВ была обнаружена в 226 пробах, что составило 10,7% (Табл. 2.).

Таблица 2

## Результаты исследования образцов фекалий клинически здоровых детей в возрасте 3-6 лет на наличие неполиомиелитных энтеровирусов

Год	Кол-во проб	Обнаружено		Типировано		Серотипы
		Абс.	%	Абс.	%	
2010	156	22	14,1	3	13,6	A1, B1, E25
2011	237	24	10,1	7	29,2	A1, 2, 5, 9, 13, EV77
2012	753	86	11,4	35	40,6	A 4, 9, 21, 22, B3, 5, E3, 6, 18, 25
2013	630	62	9,8	30	48,4	A 2, 4, 5, 9, 17, 19, 21, 22, B4, 2, E11, 25, 30
2014	338	32	9,5	9	28,2	A 4, 8, 22, 24, B5, E14
Всего	2114	226	10,7	84	37,2	

Как видно из представленных данных, процент вирусывделителей среди детей индикаторной группы из года в год менялся незначительно. При этом типовой состав обнаруженных возбудителей отличался разнообразием и претерпевал существенные изменения. Всего за период наблюдения была зафиксирована циркуляция 25 серотипов НПЭВ. В 2012 и 2013 гг., когда удалось типировать наибольшее количество штаммов, были выявлены 10 и 13 серотипов НПЭВ, соответственно. Следует отметить, что наибольшее разнообразие серотипов было выявлено среди вирусов Коксаки А (12 из 25 серотипов), которые ранее чрезвычайно редко удавалось обнаружить с помощью вирусологического метода исследования [10, 11]. Следует особо отметить тот факт, что выявление доминирующего серотипа среди циркулирующих штаммов удалось зарегистрировать только в 2012 г., когда из 35 идентифицированных НПЭВ, представленных 10 серотипами, в 14 случаях (40%) был выявлен вирус ЕСНО6. Активная циркуляция этого вируса была зафиксирована с июля по ноябрь включительно.

Суммируя вышеизложенное, можно сделать заключение о том, что спектр серотипов НПЭВ, циркулирующих среди здорового населения, отличается большим разнообразием по сравнению с таковым, обнаруженным в ликворе больных ЭВМ (18 и 25 серотипов, соответственно), в основном, за счет преобладания вирусов Коксаки группы А.

Видовой состав НПЭВ, обнаруженных у больных и клинически здоровых лиц, также имел различия. Так, все серотипы НПЭВ, выявленные у больных ЭВМ, принадлежали виду В, в то время как у лиц с бессимптомной инфекцией обнаруживались энтеровирусы видов А, В и С.

Сравнительный анализ частоты обнаружения отдельных серотипов НПЭВ у больных ЭВМ и практически здоровых лиц показал, что в 2012 году доминирующим серотипом, изолированным как от больных, так и от здоровых лиц практически в равном проценте случаев (41,1% и 41,6%, соответственно) был вирус ЕСНО6. В 2013 сезонный подъем заболеваемости был связан с активным включением в циркуляцию вируса ЕСНО30, на долю которого приходилось 58,5% случаев ЭВМ, однако у здоровых носителей данный серотип обнаруживался в 5 раз реже (12%). Такое существенное различие в частоте обнаружения штамма энтеровируса в группах больных и здоровых лиц могло свидетельствовать в пользу высокой вирулентности включившегося в циркуляцию штамма вируса ЕСНО30, который в течение последних трех лет не обнаруживался на территории г. Екатеринбурга.

Зная долю доминирующего серотипа в этиологической структуре заболеваемости и процент его обнаружения у здоровых вирусоносителей можно получить дополнительную информацию о степени его эпидемиологической опасности путем вычисления показателя риска развития заболевания. Таким показателем является количество инфицированных с бессимптомной или субклинической формой инфекции, приходящихся на один случай заболевания. Известно, что для паралитического полиомиелита в довакцинальный период этот показатель составлял, в среднем, 100:1 [12].

Полученные результаты позволили рассчитать вероятность риска развития ЭВМ у детей индикаторной группы в случае инфицирования вирусами ЕСНО 6 и ЕСНО 30. Для вычислений использовали следующие исходные данные:

1. Показатель заболеваемости ЭВМ на 1000 детского населения в возрасте 3-6 лет;
2. Доля доминирующего этиологического агента ЭВМ среди штаммов, обнаруженных в ликворе больных;
3. Доля доминирующего этиологического агента среди штаммов, обнаруженных в фекалиях клинически здоровых детей индикаторной группы.

В результате соответствующих вычислений было установлено, что риск развития ЭВМ у детей, инфицированных вирусом ЕСНО 6 в 2012 г., составил 79:1, тогда как для инфицированных вирусом ЕСНО 30 в эпидемическом сезоне 2013 г. он был в 12,5 раз выше и составлял 6,3:1 (Табл. 3.).

Расчет соотношения количества инфицированных на один случай заболевания энтеровирусным менингитом у детей индикаторной группы в возрасте 3-6 лет

Год	Заболываемость (на 1000)	Доминирующий серотип	Доля доминирующего серотипа у больных ЭВМ(%)	Заболываемость по доминирующему серотипу (на 1000)	Вирусоносительство (на 1000)	Доля доминирующего серотипа у носителей (%)	Носительство доминирующего серотипа (на 1000)	Количество инфицированных на 1 случай заболевания
2012	1,47	E6	41,1	0,6	114	41,6	47,4	79:1
2013	3,2	E30	58	1,85	98	12	11,7	6,3:1

Суммируя вышеизложенное можно сделать вывод о том, что результаты систематического мониторинга циркуляции НПЭВ среди здорового населения дают информацию о масштабах циркуляции, степени вирулентности включившихся в циркуляцию штаммов, а также позволяют более достоверно оценить вероятность развития неблагоприятной эпидемиологической ситуации по заболеваемости ЭВМ. Соотношение частоты выявления определенного серотипа НПЭВ в фекальном материале практически здоровых лиц и в ликворе больных ЭВМ можно использовать в качестве достоверного показателя степени вирулентности и эпидемиологической опасности циркулирующих штаммов.

Включение в систему государственного санитарно-эпидемиологического надзора за ЭВИ молекулярно-генетического мониторинга циркуляции НПЭВ среди здорового населения позволит более эффективно осуществлять динамическое наблюдение за эпидемическим процессом и своевременно оценивать риск неблагоприятного развития эпидемиологической ситуации.

#### Литература:

1. Устюжанин, А.В. Филогенетический анализ вируса ЕСНО6 – возбудителя серозного менингита на территории г.Екатеринбурга и Свердловской области в период с 2005 по 2012гг. / А.В. Устюжанин, А.В. Резайкин, Т.Э. Снитковская, С.В. Скрыбина, А.Г. Сергеев // Здоровье населения и среда обитания. - 2013. - №9 (246). - С. 35-38.
2. Устюжанин, А.В. Молекулярно-генетическая характеристика энтеровирусов, циркулирующих среди клинически здоровых детей (на территории г. Екатеринбург с 2010 по 2012г.) / А.В. Устюжанин, А.В. Резайкин, А.Г. Сергеев, Я.С. Палицина // Медицинский вестник МВД. – 2013. - №4 (том LXV). – С. 54-57.
3. Пархоменко, В.В. Эпидемиологический надзор за (неполио) энтеровирусами на территории Краснодарского края за 2002-2009гг. / В.В. Пархоменко, Г.К. Рафеенко, И.Н. Шуть [Электронный ресурс] // ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае» URL:<http://www.sgekuban.ru/publication/epid/enterovir.php>
4. Лесников, Н.Т. Организация мониторинга за циркуляцией полио/энтеровирусов в забайкальском крае / Н.Т. Лесников, Л.Г. Днепровская, Е.В. Емакова, О.П. Бондарева // Материалы X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации». Москва 12-13 апреля 2012 г. - Т. 2, - № 1–2
5. Устюжанин, А.В. Анализ филогенетических связей энтеровирусов, выделенных от больных серозным менингитом в г.Екатеринбурге и Свердловской области в 2008 г. / А.В. Устюжанин, А.В. Резайкин, Т.Э. Снитковская, С.В. Скрыбина, А.У. Сабитов, Ю.Б. Хаматова, А.Г. Сергеев // Уральский медицинский журнал. - 2011. - №13(91). - С. 19-24.

6. Arola, A. Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis / A. Arola, J. Santti, O. Ruuskanen, P. Halonen, T. Huypia // *Journal of Clinical Microbiology*. -1996. - Vol.34. - P.313-318.
7. Casas, I. Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products / I. Casas, G.F. Palacios, G. Trallero, D. Cisterna, M.C. Freire, A. Tenorio // *Journal of Medical Virology*. – 2002. – Vol.65. – P.138-148.
8. Новикова, Н.А. Молекулярный мониторинг неполиомиелитных энтеровирусов на территории России в 2008–2011 гг. / Н.А. Новикова, Л.Н. Голицына, С.Г. Фомина, Е.И. Ефимов // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. – 2013. – № 1. – С. 75–78.
9. Rotbart, H.A. Viral meningitis. // *Seminars in neurology*. - 2000. -20(3). -P:277-92
10. Иванова, О.Е., Еремеева, Т.П., Байкова, О.Ю. Исследование сточных вод в доме ребенка как подход к надзору за циркуляцией полиовирусов // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. - 2009. - No1. - С. 12-16.
11. Проскуракова, Н.Б. К вопросу о выделении вирусов из фекалий у здоровых людей // *Вопросы вирусологии*. - 1969. - No3. - С. 356-360.
12. Melnick, J.I., Ledinko, N. Development of neutralizing antibodies against the three types of poliomyelitis virus during an epidemic period; the ratio of inapparent infection to clinical poliomyelitis // *Am. J. Hyg.* - 1953. - Sep;58(2). P. 207-222.

## **НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ САНИТАРНО-ПАЗАРИТОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА НА ЮГЕ РОССИИ**

**Хуторянина И.В., Хроменкова Е.П.**

*ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону*

Среди многих факторов, влияющих на здоровье населения, кроме социально-экономических, большую роль играет состояние окружающей среды [1]. Для выявления зависимости между здоровьем населения и воздействием факторов среды обитания человека необходимо проведение социально-гигиенического мониторинга.

В рамках осуществления социально – гигиенического мониторинга, санитарно – паразитологический мониторинг занимает одну из приоритетных позиций. При данном виде мониторинга осуществляется динамическое изучение состояния степени контаминации объектов окружающей среды в определенных точках, объектах, зонах на протяжении длительного или необходимого периода наблюдения [2].

Риски заражения и уровень заболеваемости населения паразитарными болезнями неразрывно связаны с экологической, в частности эколого – паразитологической, обстановкой на территориях и функционирующих объектах эпидемиологической значимости, а также степенью контаминации возбудителями паразитарных болезней объектов среды обитания человека [3].

Существенную роль играют объекты окружающей среды, способствующие реализации риска заражения населения паразитарными болезнями. [4]. Значимыми являются результаты наблюдений за качеством воды поверхностных водных объектов, почв населенных пунктов и рекреационных зон по паразитологическим показателям как при контрольно – надзорных, так и при мониторинговых исследованиях [5].

### **Материалы и методы.**

Исследования проведены на юге России совместно с органами и учреждениями Роспотребнадзора по Ростовской, Астраханской области, Краснодарскому краю, Республике Адыгея, Республике Карачаево-Черкессия при экспедиционных выездах. В 2011-2014 гг. про-

водили санитарно-паразитологические исследования почвы селитебных зон, песка песочниц и почвы с территории детских образовательных учреждений (ДОУ), сточных вод и их осадков очистных сооружений канализации (ОСК), воды поверхностных водных объектов на отдельных территориях. Исследования осуществляли в соответствии с МУК 4.2.2661-10 «Методы санитарно-паразитологических исследований», МУ 2.1.7.2657-10 «Энтомологические методы исследования почвы населенных мест на наличие преимагинальных стадий синантропных мух», МУК 4.2.1884-04 «Санитарно - микробиологический и санитарно – паразитологический анализ воды поверхностных водоемов».

#### **Результаты и обсуждение.**

Наиболее эпидемиологически значимыми объектами окружающей среды являются почвы населенных мест и вода поверхностных водных объектов.

На протяжении периода проводимых исследований пробы воды поверхностных водных объектов отбирали на участках рек, приуроченных к сбросу сточных вод – условно загрязненных паразитарными агентами, и в зонах рекреации – условно чистых. С целью выявления влияния очистных сооружений канализации на загрязнение водоемов, зонально участки сброса сточных вод были разделены на: место сброса сточных вод, выше места сброса сточных вод, ниже места сброса сточных вод.

В течение 2011 – 2014 гг. в зонах рекреации изучаемых территорий было установлено, что средний экстенсивный показатель (доля положительных проб от числа исследованных) составил 2,78%. Доля нестандартных проб (с жизнеспособными паразитарными патогенами) была 0,92%. По Республике Адыгея эти данные были следующими: экстенсивный показатель - 2,8% (доля нестандартных проб 1,3%), интенсивный показатель обсемененности – 2,5 яиц гельминтов на 25 л воды, цисты лямблий не выявлены. Жизнеспособность выявленных возбудителей гельминтозов составила 64,3%. В Республике Карачаево-Черкессия положительных находок при санитарно – паразитологических исследованиях воды водоемов зон рекреации установлено не было. В Ростовской области экстенсивный показатель контаминации воды водоемов в зонах рекреации составил 0,95% (доля нестандартных проб – 0,46%), интенсивный показатель – 1 яйцо гельминта и 5 цист лямблий на 25 л воды, В Астраханской области: экстенсивный показатель обсемененности - 7,4% (нестандартных проб 1,9%), интенсивный показатель – 3 яйца и личинок гельминтов и 10 цист лямблий на 25 л воды.

В Ростовской области отмечены самые низкая доля положительных результатов санитарно – паразитологических исследований по сравнению с другими изучаемыми территориями на фоне наибольшей рекреационной нагрузки. Наиболее высокие показатели - в Астраханской области. Полученные данные свидетельствуют о невысокой степени контаминации яйцами гельминтов и цистами патогенных кишечных простейших воды водоемов рекреационных зон.

При анализе материалов санитарно – паразитологических исследований воды водоемов в зонах выпуска сточных вод с ОСК установлено, что экстенсивные показатели контаминации воды водоемов возбудителями паразитозов в точках наблюдения составляли в среднем по изученным территориям 22,9% в месте выпуска стоков; 0,68% - выше выпуска; 17,1 % – ниже выпуска. При этом доля нестандартных проб составила соответственно 5,35%; 0,18% и 14,5%.

По Республике Адыгея доля положительных проб в месте выпуска, выше и ниже него соответствовала 60,5; 0 и 23,1%. По нестандартным пробам - 11,1; 0 и 13,9%. Интенсивность контаминации составляла 1, 0 и 2 экземпляра яиц гельминтов и цист патогенных кишечных простейших на 25 л. Жизнеспособность выявленных патогенов - 37,5%. В Республике Карачаево – Черкессия доля положительных проб соответственно точкам отбора (место выпуска, выше выпуска и ниже выпуска составила) 2,3; 2,7; 4,1 %, при наличии нестандартных проб: 0,9; 0,7; 3,1%. Интенсивность контаминации была 1,8 экз/25 л. Жизнеспособность выявленных яиц гельминтов составляла в среднем 56,2%. В Ростовской области экстенсивные показатели контаминации воды водоемов в месте выпуска стоков, выше и ниже его соответственно были: 3,7%; 0 и 1,15%; нестандартных проб – 2,62; 0 и 0,8%. Интенсивность контаминации составила 2,3; 0 и 2,7 экз/ 25л. В Астраханской области экстенсивные показатели контаминации воды водоемов в месте выпуска

стоков, выше него и ниже были соответственно: 0; 0; 25,0%, нестандартных проб 0; 0; 25,0%. Интенсивные показатели соответственно: 0; 0; 1 экз/25л с жизнеспособностью 18,7%.

Из представленных данных видно, что присутствует тенденция увеличения числа как положительных, так и нестандартных проб в месте и ниже выпуска стоков в водоемы, с преимуществом выявления жизнеспособных возбудителей паразитозов в точках ниже сбросов (превышение в 2,7 раза количества нестандартных проб). Имеются особенности установленных показателей на изучаемых территориях. Отмечено, что в Ростовской области превалируют показатели контаминации воды водоемов паразитарными патогенами, отобранной в месте сброса стоков (как положительных, так и нестандартных) по сравнению с другими точками отбора.

Установлена тенденция повышенной выявляемости жизнеспособных возбудителей паразитозов в воде водоемов в точках ниже сбросов сточных вод с ОСК, средней степени выявляемость в точках соответствующих местам сброса, низкая выявляемость в точках, расположенных выше сбросов сточных вод с ОСК. Это подтверждает наличие риска загрязнения воды поверхностных водных объектов возбудителями паразитарных болезней, содержащихся в недостаточно очищенных и обезвреженных сточных водах очистных сооружений канализации, что является прямым показанием к осуществлению минимизации управляемых рисков распространения паразитарного начала в окружающей природной среде.

Почва один из основных компонентов окружающей среды, который имеет большое значение в распространении паразитарных инвазий. В пробах почвы и песка, кроме определения яиц гельминтов и цист патогенных кишечных простейших, проводились исследования на наличие личинок и куколок синантропных мух.

В Ростовской области доля положительных проб соответственно периоду наблюдений (2011-2014 гг.) была 30,0; 12,1; 6,3; 19,0 %. Выявленные жизнеспособные патогены в положительных пробах позволили оценить их в соответствии с эпидемиологическими требованиями как нестандартные и составили 25,0; 6,1; 0; 0%. Результаты свидетельствуют о снижении показателей опасности почвы в отношении риска заражения населения геогельминтозами. В Астраханской области за период наблюдений с 2011 по 2014 гг. доля положительных проб колебалась от 0 до 15,6%, нестандартные пробы (не соответствующие эпидемиологическим требованиям) определены в 2012 году – 11,1% и в 2014 году 3,1%. Показатели свидетельствуют о тенденции поддержания эпидпроцесса при геогельминтозах, передающихся через почву. По Республике Карачаево – Черкессия (2011 -2013 гг.) показатели соответственно были 26,8; 30,0; 0% с долей нестандартных проб 6 7,3; 0; 0%. Ситуация стабильная с тенденцией снижения в последние годы наблюдения. В Краснодарском крае с 2011 по 2014 гг. доля положительных проб составляла 7,14; 13,3; 10,0; 13,3 %. Жизнеспособные возбудители паразитозов ни в одной из проб выявлены не были. Ситуация оценена как наиболее благоприятная в отношении минимизации риска заражения населения гео- и контактными геогельминтозами. В Республике Адыгея установлены наиболее высокие показатели контаминации проб возбудителями геогельминтозов в сравнении с другими территориями: 52,4; 20,0; 53,8; 23,8 (2011-2014 гг.). Доля проб с жизнеспособными патогенами составила 28,6; 20,0; 19,2; 14,3%. На этой территории отмечается наиболее выраженная тенденция проявления возможного риска заражения населения паразитозами, фактором передачи которых является почва.

Спектр выявляемых на всех территориях возбудителей паразитозов в почве был практически идентичен: яйца аскарид, токсокар, остриц. В Республике Адыгея и Карачаево - Черкессия, кроме этого, выявляли яйца дикроцелиума. Следует отметить, что зональная приуроченность наибольшей эпидемиологической значимости почвы при гео- и контактными геогельминтозах определена в отношении территорий селитебных зон населенных пунктов, детских дошкольных учреждений. Пробы почвы, песка территорий ДООУ в 5,0% от числа всех исследованных были положительными с интенсивностью обсеменения в среднем 8 экз./кг и жизнеспособностью выявленных патогенов 25,0% Установлен также приоритет выявляемости в почве обследованных территорий яиц токсокар. Эти данные свидетельствуют о высокой эпидемиологической значимости исследованного субстрата в поддержании потенциального риска заражения людей геогельминтозами, а учитывая несомненную и известную на сегодняшний день значимость возбудителя токсокароза

в патологии человека, можно сделать вывод об эпидемиологической опасности почвы некоторых обследованных территорий для населения.

Интенсивность обсеменения почвы на исследованных территориях составила в среднем за годы наблюдения по территориям Республик Адыгея, Карачаево – Черкессия, Краснодарского края, Ростовской и Астраханской областей: от 2,4 до 5,6; 2,3 – 5,3; 0,1 -0,5; 1,5 -2,4; 0,5 - 2,8 экз/кг.

За весь период наблюдений в исследованных пробах почвы не было выявлено личинок и куколок синантропных мух ни на одной из территорий юга России.

#### **Заключение.**

Полученные данные подтверждают недостаточную эффективность дезинвазии сточных вод на очистных сооружениях канализации, вероятность негативного воздействия ОСК на окружающую природную среду, а так же возможный риск дальнейшего распространения паразитарных патогенов, в том числе в поверхностные водоемы.

Исследования почвы, проведенные с целью определения ее качества по паразитологическим показателям и степени безопасности для человека, показали, что на всех территориях в той или иной степени подтвержден фактами и степенью обсемененности почвы риск осуществления эпидпроцесса при геогельминтозах с вероятностью заражения ими населения. В соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативными показателями степени эпидемической опасности почвы, приведенными в СанПиН 2.1.7.1287-03 «Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы», почву некоторых территорий юга России можно характеризовать как умеренно опасную, по наличию яиц гельминтов и чистую по энтомологическим показателям. Установленные санитарно – паразитологические показатели контаминации почвы возбудителями геогельминтозов дают основание говорить о примерно одинаковой потенциальной эпидемической ее опасности на изученных территориях юга России.

Таким образом, результаты санитарно – паразитологического мониторинга за наиболее эпидемиологически значимыми объектами окружающей среды на юге России подтверждают актуальность динамического наблюдения за степенью выраженности их влияния на реализацию риска заражения населения паразитами. Полученные данные способствуют формированию адекватных выводов и предложений по профилактике паразитарных болезней среди прочих угроз здоровью населения.

#### **Литература:**

1. Г.Г. Онищенко О санитарно-эпидемиологическом состоянии окружающей среды / Г.Г. Онищенко //Гигиена и санитария. - 2013.-№2.-С.4-10.
2. Хроменкова Пособие по санитарной паразитологии: монография / Хроменкова Е.П. Димидова Л.Л. Упырев А.В.; под общ. ред. Т.И. Твердохлебовой.- Ростов-на-Дону: Дониздат, 2014, С.8-9.
3. Хроменкова Е.П. Значимость паразитологических критериев безопасности объектов окружающей среды при санитарно-паразитологическом мониторинге/Хроменкова Е.П. и др.// Дальневосточный журнал инфекционной патологии.- Хабаровск, 2015. - №29. - С. 87-89.
4. Хроменкова Е.П. Особенности загрязнения воды водоемов паразитарными патогенами на Юге России/ Хроменкова Е.П., Димидова Л.Л., Думбадзе О.С.,Упырев А.В, Хуторянина И.В и др. //Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями.-М., 2014., №.15. С 341-343.
5. Хроменкова Е.П. Структура эпидемиологической значимости объектов окружающей среды в санитарной паразитологии/ Хроменкова Е.П., Димидова Л.Л., Твердохлебова Т.И., Упырев А.В., Хуторянина И.В.// Здоровье населения и среда обитания. 2015. № 7 (268). С. 46-49.

## НОВЫЕ ТРАНСМИССИВНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ЗАРАЖЁННОСТЬ *ERLICHIA CHAFFEENSIS* И *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* КЛЕЩЕЙ *IXODES RICINUS* И *DERMACENTOR RETICULATUS* В ПРИГОРОДНЫХ ЛЕСАХ Г. КАЗАНИ

Шамсутдинов А.Ф.<sup>1,2</sup>, Тюрин Ю.А.<sup>1</sup>, Бойко В.А.<sup>1</sup>, Трифонов В.А.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Казань; <sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань; <sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Казань; <sup>4</sup>ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» МЗ РФ, г. Казань

### Введение.

Клещи рода *Ixodes* являются переносчиками ряда возбудителей природноочаговых инфекций, среди которых наиболее изученными в Поволжье являются вирусный клещевой энцефалит и иксодовый клещевой боррелиоз. Вместе с тем, наличие одного механизма передачи и общих переносчиков возбудителей определяют возможность и других передаваемых клещами инфекций. В краевой патологии республики Татарстан официально диагностируются только заболевания Лайм-боррелиозом.

### Материалы и методы.

За период 2010-2015 гг. методом ПЦР (Терцик ДНК-Техология, Россия) обследовано 604 взрослых клещей: *Ixodes ricinus* (194 особей) и *Dermacentor reticulatus* (410 особей), собранных в вегетационный период с мая по сентябрь в лиственных лесах пригородной зоны г. Казани.

Спонтанную заражённость клещей *Erlchia chaffeensis* и *Anaplasma phagocytophilum* определяли используя коммерческие тест-системы: «*E. chaffeensis* – ПЦР – ЭФ», «*A. phagocytophilum* – ПЦР – ЭФ» (производства ООО «НПФ «Эпитол»», Россия).

Заражённость выявлена у 191 особи, что составляет 31,6% от всех обследованных клещей: *Ixodes ricinus* – 80 особей (13,3%) и *Dermacentor reticulatus* – 111 особь (18,3%)

Наибольшее количество клещей были заражены *A. phagocytophilum* – 72 особи (11,9%); меньшая по численности группа клещей была заражена *E. chaffeensis* – 33 особи (5,5%).

У 25 клещей (13,1% от числа заражённых) выявлено микст-инфицирование двумя патогенами.

### Заключение.

Полученные данные показывают высокий процент зараженности иксодовых клещей эрлихиями, анаплазмами, что указывает на необходимость эпизоотического мониторинга и эпидемиологического надзора за сочетанными природными очагами клещевого боррелиоза, гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека, и обосновывает проведение исследований по диагностике эрлихиоза и анаплазмоза среди укушенных клещами.

## **РАЗДЕЛ 2. СОВРЕМЕННЫЕ СРЕДСТВА ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: ОТ РАЗРАБОТКИ ДО ПРОИЗВОДСТВА**

### **РАЗРАБОТКА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ПРЕДПРИЯТИЯ (СОП) СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА**

**Абрамова Е.Г., Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Савицкая Л.В., Генералов С.В.,  
Селезнева А.Г., Жулидов И.М., Комиссаров А.В.**

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»  
Роспотребнадзора, Саратов*

Антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади, производимый в РосНИПЧИ «Микроб», является высококачественным в Российской Федерации лекарственным препаратом в связи с неблагоприятной эпизоотической и эпидемиологической ситуацией по бешенству [1, 2, 3]. Одним из важнейших показателей качества выпускаемого препарата является специфическая активность, определяемая в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах [4]. Неотъемлемой частью контроля специфической активности антирабического иммуноглобулина является использование стандартного образца активности. Отсутствие в настоящее время отраслевого стандартного образца специфической активности антирабического иммуноглобулина диктует обязательное наличие на предприятии-изготовителе Международного стандартного образца иммуноглобулина человеческого против бешенства либо стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности, аттестованного против указанного Международного стандарта ВОЗ [5]. Вышесказанное обусловило актуальность представленного исследования.

Целью исследований явились разработка и метрологическая характеристика стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности антирабического иммуноглобулина.

При изготовлении стандартного образца специфической активности были учтены требования нормативной документации на иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади. Кандидат для изготовления стандартного образца предприятия представлял собой специфический иммуноглобулин, полученный в соответствии с промышленным регламентом на производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади, раствора для инъекций, физико-химические и биологические показатели которого отвечали требованиям фармакопейной статьи предприятия на указанный препарат. Очищенный и стерильный раствор иммуноглобулина разливали по 1 мл в ампулы объемом 2 мл. Полученный СОП хранили в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 [6]. Далее проводили исследования метрологических характеристик СОП. Аттестуемой метрологической характеристикой СОП являлась специфическая активность в Международных единицах (МЕ) в ампуле. Аттестацию СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического проводили в соответствии с НД Р N 002639/01–250210, разделом «Специфическая активность». Специфическую активность СОП определяли в реакции нейтрализации фиксированного вируса бешенства на белых мышах одновременно с определением активности международного образца специфической активности. В качестве образцов сравнения использовали Первый Международный стандартный образец антирабического иммуноглобулина (1-st International Standard for rabies immunoglobulin) с активностью 59 МЕ, Второй Международный стандартный образец иммуноглобулина человеческого против бешенства (2-nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin, human) с активностью 30 МЕ. Анализ результатов и расчет титра иммуноглобулина проводили по методу Reed и Muench [4].

Всего в период с 2010 года по настоящее время было приготовлено и аттестовано 3 серии СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического.

Для расчета среднего значения специфической активности при аттестации СОП использовали следующие формулы:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} - \text{среднее выборки (среднее арифметическое значение показателя), где}$$

$x_i$  - значение показателя каждого образца;  $n$  – объем выборки;

$$S^2 = \frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1} - \text{дисперсия;}$$

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{S^2} - \text{стандартное отклонение среднего результата;}$$

$$(\bar{x} - \Delta\bar{x}) \leq \mu \leq (\bar{x} + \Delta\bar{x})$$

$$(\bar{x} \pm \Delta\bar{x}) = \bar{x} \pm \frac{t(P, f) \times S_r}{\sqrt{n}} - \text{границные значения доверительного интервала среднего}$$

результата (по Стьюденту), где  $t(P, f)$ - коэффициент Стьюдента;  $P$  – доверительная вероятность (95%);  $f$ - число степеней свободы,  $f = n - 1$  при  $P=95\%$  [7].

Результаты исследований по аттестации образцов СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина относительно Международных стандартов представлены в таблице 1. Данные таблицы свидетельствуют о соответствии полученных характеристик требованиям нормативной документации на антирабический иммуноглобулин, согласно которой специфическая активность которого должна иметь значение не менее 150 МЕ/мл.

Таблица 1.

Результаты аттестации СОП активности антирабического иммуноглобулина по показателю «Специфическая активность» с использованием Международных стандартов активности в реакции нейтрализации на белых мышах

Серия СОП	Реципрокный титр активности Международного образца / титр в МЕ	Реципрокный титр активности СОП/титр в МЕ по результатам нескольких экспериментов			Аттестованное значение СОП, МЕ/амп. $(\bar{x} \pm \Delta\bar{x})$
		Образец 1	Образец 2	Образец 3	
32-01-11	1503/59	4391/172	5084/200	4888/176	177,33±13,89
	1260/59	4000/187	3274/153	4375/205	
	1000/59	2828/167	2639/155	3076/181	
32-02-14	278/30	2000/216	1741/188	-	192,10±13,45
	616/30	3563/174	3364/164	-	
	590/30	3408/173	3562/181	4000/203	
	500/30	3585/215	3497/210	3281/197	
32-03-15	1300/59	4000/182	4491/200	4393/199	198,67±16,62
	1455/59	5040/204	4709/191	5769/234	
	2000/59	5270/156	7199/212	7126/210	

Стабильность СОП по показателю «специфическая активность» в процессе хранения подтверждена в долгосрочных испытаниях в течение предполагаемого срока годности (2 года) с использованием образцов СОП серии 32-01-11. Определение специфической активности СОП

проводили по указанной выше методике на момент получения и через 2 года 1 месяц хранения. Значение специфической активности СОП на момент получения составляло  $(177,33 \pm 13,89)$  МЕ/мл, как указано в таблице 1. После хранения СОП в течение 2 лет и 1 месяца величина аттестуемого показателя СОП, по результатам трех последовательных тестов, составила 173, 185 и 175 МЕ/мл, что доказывает стабильность СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического по показателю «специфическая активность» в процессе хранения в течение срока годности (2 года).

Таким образом, в результате исследований разработан СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического, аттестованный с применением Международного стандартного образца иммуноглобулина человеческого против бешенства. СОП предназначен для оценки специфической активности антирабического иммуноглобулина коммерческих серий. СОП утвержден ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора и внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях и в отделе биологического и технологического контроля. По результатам исследований внесены изменения № 4 в Фармакопейную статью предприятия Р N 002639/01–250210 от 09.02.2016 г.

#### Литература:

1. Бешенство. Информационный бюллетень ВОЗ [Электронный ресурс]. – 2015. – № 99. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/ru/>.
2. Мовсисянц, А.А. Проблема смертности людей от бешенства в Российской Федерации в 2010–2011 годах / А.А. Мовсисянц, А.Н. Миронов, В.А. Ведерников, О.С. Хадарцев, С.В. Борисевич // Ведомости НЦ ЭСМП. – 2012. – № 3. – С. 48–52.
3. Симонова, Е.Г. Современные тенденции и особенности контроля за ситуацией по бешенству в Российской Федерации / Е.Г. Симонова, О.С. Хадарцев // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2014. – № 2. – С. 65–68.
4. Meslin, F.X. Laboratory techniques in rabies / F.X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski. – 4 th ed. – Geneva : WHO, 1996. – 469 p.
5. ФС.3.3.1.0038.15. Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади / В кн.: Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Том 3. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. – С. 1126–1137.
6. СП 3.3.2.1248-03 Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов. Санитарно-эпидемиологические правила. – М., 2003. – 19 с.
7. ОФС.1.1.0014.15. Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами / В кн.: Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Том 1. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. – С. 265–315.

## **ВЛИЯНИЕ ЛАКТОГЛОБУЛИНА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К БАКТЕРИОФАГАМ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ И САЛЬМОНЕЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДЕТЕЙ С ОКИ И ДИСБИОЗАМИ**

**Алексанина Н.В., Моисеева О.В**

*ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону*

Острые кишечные инфекции у детей, вызванные патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, остаются актуальной проблемой педиатрии в виду их значительной распространенности, не всегда эффективного применения этиотропных препаратов для их лечения, сопутствующих нарушений качественного и количественного состава микробиоценоза кишечника.

В педиатрической практике ОКИ устойчиво занимают 2-е место после респираторных вирусных инфекций и сопровождаются развитием серьезных осложнений с летальными исходами [1,2].

Широкое распространение антибиотикорезистентных форм возбудителей среди патогенных и условно-патогенных бактерий, затрудняющее профилактику и лечение ОКИ и дисбиозов, обуславливает использование бактериофагов и препаратов иммунных лактоглобулинов для антибактериальной терапии этих заболеваний.

Бактериофаги – биологические препараты антибактериального действия для лечения и профилактики ОКИ и бактерионосительства, применение которых не нарушает нормального биоценоза человека. Используются для лечения кишечных заболеваний у детей любого возраста, не вызывают побочных токсических и аллергических реакций, не имеют противопоказаний к применению, вызывают лизис бактерий [3,4].

Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл разработан в Ростовском НИИ микробиологии и паразитологии. Представляет собой стерильную лиофилизированную фракцию иммуноглобулинов молозивной сыворотки коров, предварительно вакцинированных против комплекса возбудителей – микроорганизмов, вызывающих кишечные инфекции и дисбактериозы. Сочетает в себе свойства этиотропного и патогенетического средства. Нормализует микрофлору кишечника, обладает определенной степенью бифидогенности. При применении в комплексе с антибиотиками предотвращает дисбиотические осложнения антибиотикотерапии [5,6].

В ранее проведенных исследованиях по изучению влияния иммунного лактоглобулина на сальмонеллы и условно-патогенные энтеробактерии в опытах *in vitro* был выявлен переход культур из S- в R-форму, сопровождающийся снижением токсигенных, вирулентных свойств, каталазной активности и повышением чувствительности к антибиотикам. Показано избирательное действие препарата на токсигенные клоны субкультур, ведущее к селекции нетоксигенных вирулентных клонов.

**Целью** данного исследования явилось изучение влияния лактоглобулина против условно-патогенных бактерий и сальмонелл на чувствительность к бактериофагам бактерий родов *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus* и *Pseudomonas*, выделенных от детей с ОКИ и дисбиозами в опытах *in vitro*.

#### **Материалы и методы исследования.**

Материалом для исследований явились 46 штаммов сальмонелл (26 штаммов – *S.typhimurium* и 20 штаммов – *S.enteritidis*), 10 штаммов протеев (7 штаммов – *P.mirabilis* и 3 штамма – *P.vulgaris*), 8 штаммов *K.pneumoniae*, 10 штаммов *P.aeruginosa*.

В работе использованы: бактериофаг сальмонеллезный групп А,В,С,Д,Е жидкий, «Секстафаг» пиополивалентный бактериофаг жидкий, колипротейный бактериофаг жидкий, клебсиеллезный бактериофаг очищенный жидкий, синегнойный бактериофаг жидкий. Препарат – «Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл».

Чувствительность микроорганизмов к бактериофагу проводили путем нанесения капли препарата (0,01мл) на газон-test штамм («Spot-test»). Учет степени лизиса бактерий регистрировали по четырех крестовой схеме. Чувствительность бактерий к фагам оценивали следующим образом: высокая (3-4 креста) чувствительность – полный лизис или незначительный вторичный рост, низкая (1-2 креста) чувствительность – полусливной рост, до 50-10 колоний фага, отрицательный – отсутствие лизиса.

#### **Результаты и обсуждение.**

В ходе исследования было получено 46 штаммов рода *Salmonella*, выделенных от детей больных сальмонеллезом. Все выделенные культуры обладали высокой антибиотикорезистентностью и были чувствительны к сальмонеллезному бактериофагу. Из 46 исследованных штаммов сальмонелл к 32 культурам активность сальмонеллезного фага была высокой и оценена нами на 4-3 креста (через 18-20 часов наблюдали полный лизис бактерий), к 14 культурам (8 штаммов *S.enteritidis* и 6 штаммов *S.typhimurium*) активность сальмонеллезного фага была низкой и оценена нами на 1-2 креста. Также было включено 28 штаммов условно-патогенных микроорганизмов, выделенных от детей с дисбиозами. Все выделенные и взятые в исследование УПМ были резистентны к большинству антибиотиков и проявляли низкую чувствительность к бактериофагам (оценена нами на 1-2 креста).

Для изучения влияния иммунного лактоглобулина на фагочувствительность микроорганизмов отобраны культуры с низкой чувствительностью к фагу. Культуры пассировали в 5% растворе лактоглобулина против условно-патогенных бактерий и сальмонелл в течение 15 дней, что соответствовало схеме терапевтического применения препарата для лечения больных ОКИ. У полученных в процессе пассирования культур (5,10,15 пассажи) и их исходных вариантов изучали чувствительность к взятым в исследование препаратам бактериофагов. Результаты проведенных исследований показали, что при пассажах сальмонелл и условно-патогенных микроорганизмов в иммунном лактоглобулине восстанавливалась чувствительность культур к бактериофагам уже после 5-го пассажа бактерий в препарате и оценена нами 4 креста (через 18-20 часов наблюдали полный лизис бактерий).

#### **Заключение.**

Проведенные исследования показали, что сальмонеллы и условно-патогенные микроорганизмы, выделенные от детей, характеризовались разной степенью чувствительности к препаратам бактериофагов. В опытах *in vitro* установлено положительное воздействие препарата на сальмонеллы и условно-патогенные микроорганизмы, приводящее к восстановлению чувствительности у культур к фагам уже после 5-го пассажа их в препарате. Полученные в ходе эксперимента данные позволяют сделать вывод о целесообразности совместного использования препаратов бактериофагов и иммунных лактоглобулинов для коррекции нарушенного микробиоценоза кишечника при ОКИ и дисбиозах.

#### **Литература:**

1. Воротынцева Н.В., Мазанкова Л.Н. Острые кишечные инфекции у детей. //М. «Медицина», 2001.- с.477.
2. Самсыгина Г.А. Особенности становления биоценоза кишечника у грудных детей и кишечный дисбактериоз.//Consilium Medicum. 2003.-№2.-Р.30-34.
3. Дроздова О.М., Брусина Е.Б. Применение бактериофагов в эпидемиологической практике: взгляд через столетие. //Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010.-№5.- С.20-24.
4. Бактериофаги – антибактериальные препараты будущего: сб. статей.- М.2009.- с.66.
5. Соболева С.В. Лактоглобулины – препараты нового поколения для лечения и профилактики острых кишечных инфекций и дисбактериозов у детей. //Актуальные вопросы инфекционной патологии. Материалы юбилейной конференции, посвященной 100-летию РНИИМП, 23-24 сентября 2009г. Ростов-на-Дону.- С.251-255.
6. Алексанина Н.В., Соболева С.В. Микробиоценоз толстого кишечника детей с диарейными заболеваниями в процессе лечения лактоглобулином против условно-патогенных бактерий и сальмонелл.//Там же. С.302-305.

## **ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ТЕКУЩИХ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАДАЧ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ ЛПУ И РОСПОТРЕБНАДЗОРА**

**Белова И.В., Точилина А.Г., Соловьева И.В., Иванова Т.П., Жирнов В.А.**  
*ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

Быстрая и точная идентификация микроорганизмов является востребованной задачей во многих приложениях человеческой деятельности как научного, так и прикладного характера [1]. Для практических лабораторий лечебно-профилактических учреждений наибольшее значение имеет клиническая диагностика, в частности, точность и скорость идентификации патогенных микроорганизмов, что в конечном итоге определяет успех проводимого лечения. Что касается практических бактериологических лабораторий Роспотребнадзора, они несут большую нагрузку

ку, осуществляя исследования продукции производственно-технического и бытового назначения, товаров, пищевых продуктов, продовольственного и непродовольственного сырья, объектов окружающей среды (вода, почва, воздух), биологических сред и т.п. на наличие/отсутствие бактериального загрязнения, а также проводя расследование вспышек острых кишечных инфекций (ОКИ), пищевых токсикоинфекций (ПТИ), инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [1,2]. В данном случае использование современных методов, позволяющих быстро получить достоверные результаты при большом объеме исследований, обуславливает эффективность и обоснованность проведения дальнейших санитарно-гигиенических и противоэпидемиологических мероприятий.

«Золотым стандартом» в бактериологии является классический метод выделения и идентификации чистой культуры микроорганизмов [3], однако современные методы намного технологичней, требуют меньше времени для получения результата и могут быть стандартизованы. Перечень новых современных методов исследований включает в себя как «культурально-независимые», так и «культурально-зависимые» методы. Среди культурально-независимых методов, позволяющих проводить индикацию и идентификацию микроорганизмов в нативном (исходном) материале, исключая этап выделения чистой культуры, широкое распространение в практических лабораториях получили методы амплификации нуклеиновых кислот, в частности ПЦР [4], используемые для выделения ДНК микробов; методы иммуноферментного анализа для выявления антигенов; методы индикации микроорганизмов путем определения относительного изменения электрического сопротивления среды, происходящего под влиянием процессов роста и жизнедеятельности бактерий, реализованные в различных автоматических анализаторах. «Культурально-зависимые» методы позволяют получить результаты идентификации патогенов из чистой культуры, но в более короткие сроки, чем классическая бактериология. В качестве примера таких методов можно назвать реализованную в автоматических анализаторах детекцию развития культур в присутствии различных химических тест-субстратов с использованием турбидиметрии или колориметрии, а также метод масс-спектрометрии, который стал использоваться для идентификации микроорганизмов относительно недавно. Методика масс-спектрометрии с 2011 г внесена в реестр медицинских технологий, программное обеспечение сертифицировано, а масс-спектрометры имеют регистрационное удостоверение о внесении приборов в государственный реестр изделий медицинской техники и сертификаты Госстандарта России об утверждении средств измерений.

К сожалению, в настоящее время далеко не каждая лаборатория оснащена в полной мере современным и довольно дорогостоящим оборудованием, а ситуации, когда его использование жизненно необходимо, возникают довольно часто. В таких случаях практичным бактериологам целесообразно обращаться за помощью в научно-методические центры, укомплектованные высококвалифицированным персоналом и имеющие соответствующую аппаратуру.

В Нижегородском НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора организован Региональный научно-методический центр по мониторингу за актуальными для ПФО инфекционными болезнями, оснащенный современным высокотехнологичным масс-спектрометром с программным обеспечением, позволяющим осуществлять быструю и точную видовую идентификацию широкого спектра грамотрицательных, грамположительных, спорообразующих бактерий, дрожжеподобных грибов и плесеней.

Метод идентификации с помощью масс-спектрометрии основан на принципе, сходном с методом установления личности по отпечаткам пальца – методом фингерпринта. После ионизации образца под воздействием лазера и детекции всех образовавшихся ионов получается уникальный масс-спектр, который сравнивается с имеющимися в базе данных референсными масс-спектрами микроорганизмов различных видов. По максимально совпадающим масс-спектрам проводится определение вида исследуемого микроорганизма. О достоверности идентификации судят по значению коэффициента совпадения (Score values) - 2,000 – 3,000 – идентификация до вида, 1,999-1,700 – идентификация до рода, 1,699 – 0 – идентификация не прошла) и значению категорий – А – достоверная идентификация до вида, В- достоверная идентификация до рода, С – недостоверный результат. [5] Поставляемая производителем база данных содержит около 6000 референсных

масс-спектров различных видов микроорганизмов, поэтому практически любой бактериальный патоген выделенный из биологического материала больных, из продуктов питания или внешней среды можно идентифицировать до вида в течение нескольких минут.

В качестве иллюстрации взаимодействия практических лабораторий с организованным Региональным научно-методическим центром можно привести следующий случай: в бактериологической лаборатории одной из больниц города из ликвора поступившего с симптомами менингита пациента была выделена чистая культура грамположительных неспорообразующих палочек, которую доставили в ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора для экспресс-идентификации методом масс-спектрометрии. Процедура идентификации микроорганизмов методом прямого нанесения с частичной экстракцией на мишени заняла около десяти минут. Культура была идентифицирована как *Listeria monocytogenes*. Достоверность идентификации обеспечивалась трехкратным нанесением образца на мишень. Получение одинакового результата с высоким коэффициентом совпадения Score от 2,310 до 2,197 в трех точках свидетельствовало о надежности видовой идентификации. Быстрое установление этиологического фактора позволило в тот же день назначить пациенту адекватную антибактериальную терапию.

В другом стационаре методом масс-спектрометрии из смывов и клинического материала от пациентов отделения реанимации были идентифицированы грамотрицательные неферментирующие микроорганизмы *Elizabethkingia meningoseptica* и *Burkholderia cepacia* (Score 2,215-2,196 и 2,4-2,012 соответственно), что позволило скорректировать проводимую терапию, своевременно провести санитарно-гигиенические и противоэпидемические мероприятия, и, в конечном итоге, предотвратить развитие и распространение ИСМП.

Следует отметить, что метод масс-спектрометрии позволяет не только проводить родовую и видовую дифференциацию микроорганизмов, но и выявлять штаммовые отличия (рис 1).

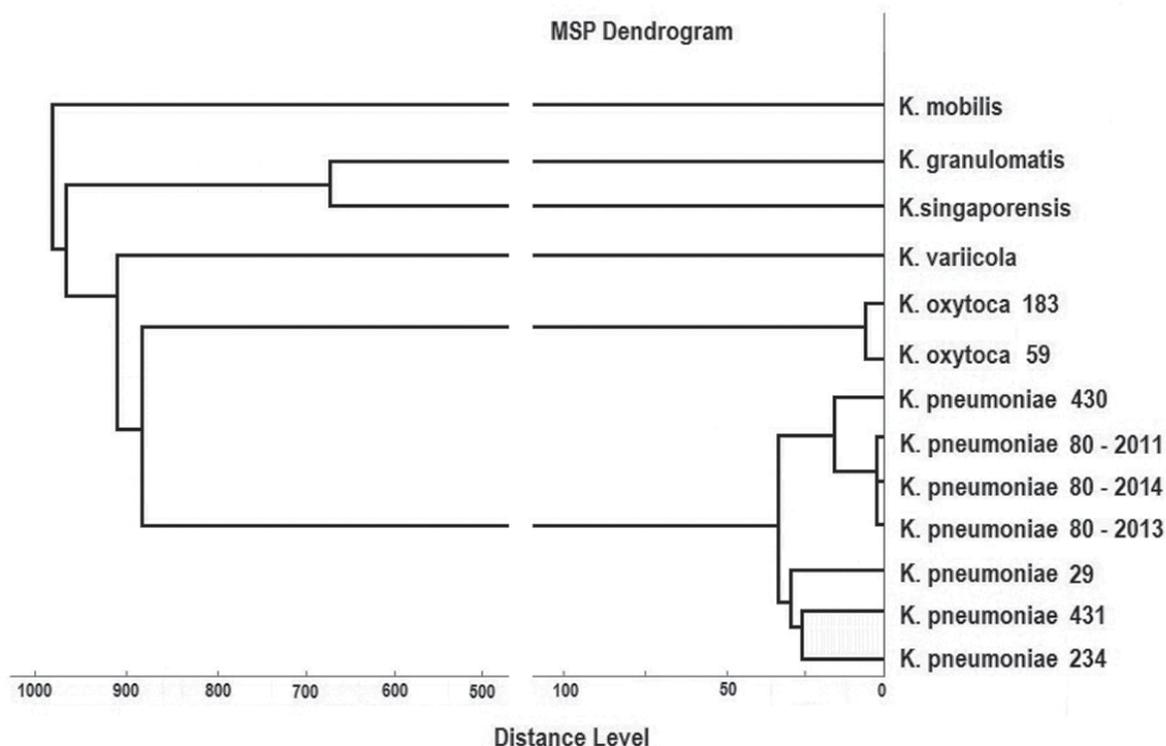


Рис. 1. Иерархическая структура спектров рибосомальных белков микроорганизмов рода *Klebsiella*, различия видовые и штаммовые

В нашем примере масс-спектры одного и того же штамма *K. pneumoniae* 80, выделенного в

разное время, через разное количество пассажей на питательной среде, образуют один кластер, не демонстрируя видимых различий. В то же время, этот штамм отличается от других штаммов данного вида (рис.1). Полученные нами результаты подтверждаются и данными других исследователей. Так, успешная дифференциация на внутривидовом уровне представителей родов *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* и *Pseudomonas* показана в работе Ghyselink с соавт. [6]. В работе S. Barbudde с соавт. масс-спектрометрический анализ корректно объединил серотипы *Listeria monocytogenes* в три линии в соответствии с данными гель-электрофореза в переменном поле [7]. Seibold с соавт. удалось идентифицировать 45 изолятов *Francisella tularensis* на уровне штаммов [8]. Таким образом, метод MALDI TOF масс-спектрометрии имеет большой потенциал в плане изучения особенностей белковых спектров различных микроорганизмов и обнаружения, так называемых, эпид. меток штаммов. Кроме того, программное обеспечение масс-спектрометра позволяет создавать собственные базы данных, содержащие масс-спектры штаммов микроорганизмов, выделяющихся в конкретном регионе (области, районе, больнице и т.п.), что в свою очередь позволяет осуществлять динамичное наблюдение за их циркуляцией, и оценивать эффективность проводимых противоэпидемических мероприятий.

Второй вариант взаимодействия практических бактериологических лабораторий и Регионального научно-методического центра – это характеристика и подтверждение биологических свойств штаммов микроорганизмов для контроля качества питательных сред.

В документах, регламентирующих контроль качества питательных сред, в частности в ГОСТ ISO/TS 11133-1-2014 и МУК 4.2.2316-08 [9,10] предлагается использовать широко доступные коллекционные эталонные штаммы, однако не исключается возможность использования и выделенных в лаборатории культур, при условии, что эти штаммы тщательно охарактеризованы, их культуральные характеристики хорошо изучены и подтверждены в лаборатории более высокого ранга. Кроме того, в контрольном наборе должен находиться штамм с атипичными характеристиками (слабо растущие или биохимически неактивные штаммы) - в данном случае для документального подтверждения правильности видовой идентификации также целесообразно прибегнуть к помощи научно-методического центра, обладающего соответствующим оснащением.

Третий вариант взаимодействия – привлечение научно-методических центров, оснащенных высокопроизводительным наукоемким оборудованием для исследований случаев заболеваний ПТИ, ОКИ, ИСМП в период эпиднеблагополучия и вспышек: экспресс-идентификация методом масс-спектрометрии большого объема выделенных штаммов микроорганизмов в короткий срок позволит более качественно провести дальнейшее расследование по выявлению этиологического фактора заболеваний, а также составить дендрограммы, иллюстрирующие взаимосвязь выделяемых микроорганизмов на основе сходства масс-спектров рибосомальных белков.

В качестве иллюстрации можно привести расследование вспышки пищевой токсикоинфекции, произошедшей в детском оздоровительном лагере. В практическую лабораторию Роспотребнадзора был доставлен собранный в детском лагере материал: смывы, пробы пищевых продуктов, мазки из носа персонала, рвотные массы одного из заболевших детей – всего 27 образцов. Из 12 образцов в ходе классического бактериологического исследования (посев на хромогенной среде) был выделен *S.aureus*. Выделенные штаммы были переданы во ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора. Таксономическая принадлежность штаммов была также подтверждена методом масс-спектрометрии. На основе полученных масс-спектров была составлена предварительная дендрограмма, отражающая сходство профилей рибосомальных белков исследованных штаммов. В качестве контрольных штаммов были использованы два штамма золотистого стафилококка, выделенные из фекальной микрофлоры людей, не имеющих отношения к данной вспышке. По предварительной дендрограмме можно было судить только о том, что штаммы, выделенные при расследовании вспышки, образуют самостоятельный кластер, т.е. схожи по своим свойствам. Для получения более детальной информации в данном случае 12-ти штаммов было явно недостаточно.

Далее в анализ были добавлены штаммы *S.aureus*, выделенные от заболевших в лагере детей, госпитализированных в инфекционную больницу города.

В результате была получена следующая дендрограмма (рис.2).

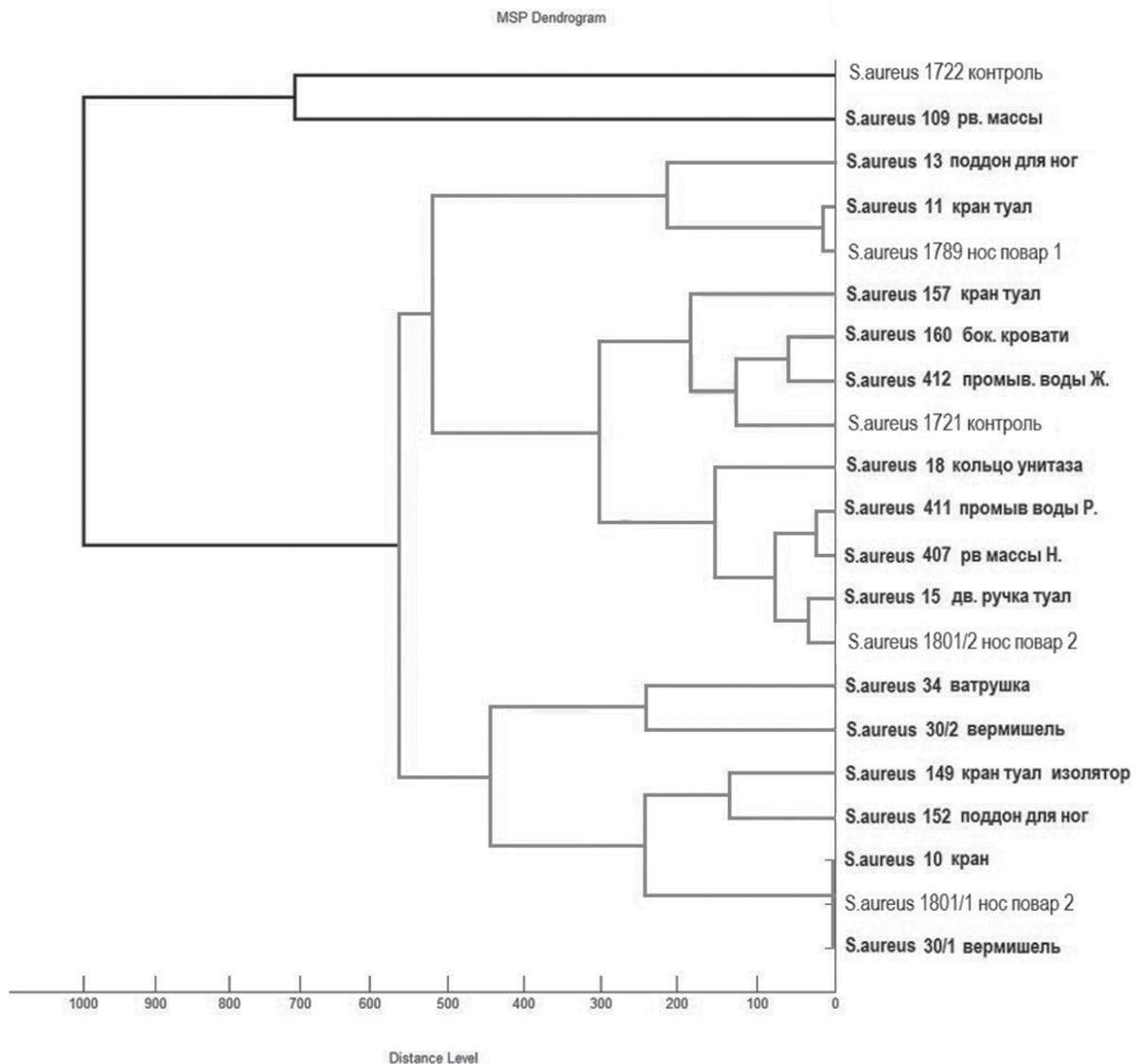


Рис. 2. Иерархическая структура спектров рибосомальных белков штаммов *S.aureus*, выделенных при расследовании вспышки ПТИ в детском оздоровительном лагере.

На рисунке видно, что один из контрольных штаммов и штамм, выделенный из рвотных масс одного из детей, образуют отдельный кластер, и, по-видимому, этот штамм не играет большой роли в возникновении данной вспышки пищевой токсикоинфекции.

Основной массив штаммов, выделенных при расследовании данного случая, образуют самостоятельный кластер, подразделяющийся на три подкластера. Один из подкластеров объединяет штаммы, выделенные из назального мазка одного из поваров и из смывов с объектов внешней среды. А два подкластера замыкаются на штаммы, выделенные из носа второго повара. Один из этих подкластеров образуют штаммы, выделенные из продуктов питания и смывов. Второй подкластер объединяет штаммы, выделенные от больных и из смывов с объектов внешней среды туалетных комнат. Таким образом, в результате анализа обнаружено, что в назальной микрофлоре обоих поваров присутствует золотистые стафилококки со сходными биологическими свойствами. Однако в возникновении и развитии вспышки большее значение имеет штамм, выделенный из назального мазка второго повара. То есть второго повара можно рассматривать как источник инфекции.

В то же время следует обратить внимание на то, что полученные при данном анализе результаты неправомерно использовать в качестве единственного критерия при установлении ис-

точника инфекции и путей распространения вспышки. Только оценив всю совокупность данных, полученных при эпидемиологическом расследовании можно делать соответствующие выводы.

Иллюстрацией к данному положению может служить пример расследования другого случая пищевой токсикоинфекции. После обеда в одном из кафе города в инфекционную больницу обратились с признаками гастроэнтерита несколько пациентов, что инициировало проведение проверки данного заведения службой Роспотребнадзора. В бактериологическую лабораторию были доставлены образцы блюд, приготовленных в кафе, назальные и оральные мазки персонала и биоматериал двух заболевших. В пробах мясных тефтелей было выявлено наличие *S.aureus* только при использовании бактериологического анализатора. Из части образцов биологического материала на плотных питательных средах также удалось выделить штаммы *S.aureus*, их доставили во ФБУН ННИИЭМ для анализа методом масс-спектрометрии.

В результате проведенного анализа была получена следующая дендрограмма. (рис 3).

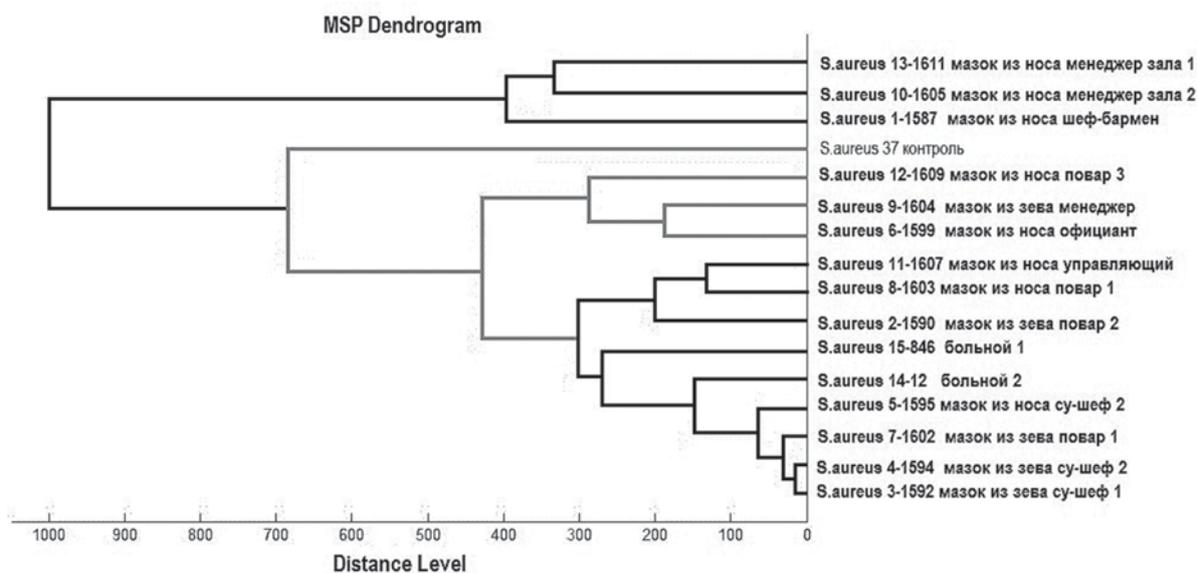


Рис. 3. Иерархическая структура спектров рибосомальных белков штаммов *S.aureus*, выделенных при расследовании вспышки ПТИ в кафе.

В качестве контрольного также использовался штамм, не имеющий отношения к данной вспышке.

Полученные в результате исследования масс-спектры образуют два кластера, в один из которых вошли масс-спектры штаммов, выделенных из назальных мазков менеджеров и шеф-бармена. Штаммы, образующие данный кластер по своим свойствам довольно далеки от остальной группы. Второй кластер образуют масс-спектры штаммов, полученные от поваров, су-шефов, официантов и больных. Причем наиболее близкими по своим свойствам к штаммам, полученным от больных, являются штаммы, выявленные у персонала двух поварских бригад. При анализе данных по вспышке выяснилось, что мясные тефтели были приготовлены за сутки до начала вспышки бригадой №1. Было сделано заключение, что наиболее вероятной причиной возникновения вспышки является обсеменение мясного продукта штаммами стафилококка назальной и оральной флоры поварской бригады №1, которое подтверждалось результатами анализа сходства масс-спектров данных штаммов.

Таким образом, приведенные в статье примеры и результаты взаимодействия клинико-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений и бактериологических лабораторий Роспотребнадзора с Региональным научно-методическим центром доказывают высокую эффективность использования масс-спектрометрии для решения текущих задач в работе практических лабораторий и открывают перспективы для дальнейшего сотрудничества.

#### Литература:

1. Демидов Е.А., Старостин К.В., Попик В.М., Пельтек С.Е. Применение МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов//Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013.- Т.17, №4/1. – С.758-764
2. Петров Е.Ю. Состояние и организация лабораторной службы Управлений Роспотребнадзора по Приволжскому Федеральному округу//Медицинский альманах. – 2008. - №4. – С.24-28.
3. Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С., Ширококов В.П. Медицинская и санитарная микробиология. Учебное пособие. – М.: Медицина, 2008. – 480с.
4. Лопухов Л.В., Эйдельштейн М.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике //КМАХ. – 2000. – Том 2, №3. – С.96 -106.
5. MALDI Biotyper 3.0: Руководство пользователя. – Bruker Daltonics GmbH, 2011 – 119с.
6. Ghyselinck J., Van Hoord K., Hoste B et al. Evaluation of MALDI TOF MS as a tool for high-throughput dereplication//J. Microbiol. Meth.- 2011. – V.86., N3. – P. 327-336.
7. Barbuddhe S.B., Maier T., Schwarz G. et al. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry// Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – V.74, N 17. – P.5402-5407.
8. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M. et al. Identification of Francisella tularensis by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels// J. Clin. Microbiol. – 2010. – V.48, N.4. – P.1061-1069.
9. Методические указания по контролю биологических и микробиологических факторов. Методы контроля бактериологических питательных сред: методические указания № 4.2.2316-08. – М.: Роспотребнадзор. – 2008. – 52 с.
10. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. ГОСТ ISO/TS 11133-1 –2014. – Введ. 2014-30-05. – М.: Стандартиформ, 2015. –16 с.

## **ФАКТОРЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АГРЕССИИ БАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ИСМП**

**Борискина Е.В., Беляева Е.В., Ермолина Г.Б., Никифоров В.А.**

*ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, (ИСМП) являются важной проблемой здравоохранения из-за их широкого распространения, вреда, причиняемого здоровью, и огромного социально-экономического ущерба. Для предупреждения возникновения вспышек и снижения заболеваемости ИСМП необходимы как своевременная лабораторная диагностика, так и изучение биологических характеристик возбудителей для разработки и внедрения в практику научно обоснованной системы борьбы и профилактики ИСМП.

В настоящее время этиологическая структура ИСМП представлена широким спектром патогенов, включая условно-патогенные бактерии, вирусы, грибы, простейшие. Среди бактерий наиболее значимая роль принадлежит стафилококкам и грамотрицательным бактериям (псевдомонадам, ацинетобактерам) [1,2]. В ЛПУ г. Н.Новгорода на основе ретроспективного эпидемиологического анализа (2009-2012 гг.) причинами вспышечной заболеваемости ИСМП были *Staphylococcus spp.* (73,48%), из них *S.aureus* составляли 45,57%, коагулазоотрицательные стафилококки (CoNS) – 27,91%. Второе место занимали представители семейства *Enterobacteriaceae* (10,47%). Доля бактерий семейства *Streptococcaceae* составила 9,74%, удельный вес неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ) был 5,44% и грибов рода *Candida* - 0,87%. Среди CoNS доминировали *S.epidermidis* (42,19%) и *S.haemolyticus* (39,84%) [3].

В процессе адаптации этиопатогены приобрели способность образовывать биопленки, которые не только обеспечивают их выживание во внешней среде, но и определяют устойчивость к

антибиотикам и дезинфектантам, что в конечном итоге способствует их персистенции и активной циркуляции в стационаре. До 60% случаев ИСМП может быть связано с образованием бактериальных биопленок на медицинской аппаратуре и различных поверхностях, бесспорна их роль при инфекциях, связанных с имплантацией [4,5]. Однако до сих пор адаптационные возможности условно-патогенных микроорганизмов с их способностью формировать госпитальные штаммы требуют уточнения.

Цель работы - изучение биологических характеристик штаммов, циркулирующих в ЛПУ г. Н.Новгорода, а именно чувствительности к антимикробным препаратам (антибиотикам и бактериофагам), способности к образованию биопленок, выраженности внеклеточных факторов патогенности и персистенции (протеазной, лизоцимной, гиалуронидазной, антилизоцимной активности).

В работе были использованы 106 штаммов стафилококков, выделенные в 2011-2013 гг.

от больных в Детской городской клинической больнице № 27 (ДС) - 25 штаммов; Специализированной кардиохирургической клинической больнице (КЦ) – 32 штамма и хирургическом кабинете Городской поликлиники № 7 (ПК) – 30 штаммов; Городской клинической больнице №3 (ГКБ 3) – 9 штаммов; роддоме №1 – 4 штамма; НижГМА – 6 штаммов, а также 9 культур грамотрицательных бактерий: 2 штамма *Pseudomonas aeruginosa* из Нижегородской областной детской клинической больницы (НОДКБ); 2 штамма *Enterobacter aerogenes*, 1 - *E.coliaceae* и 1 - *P.pseudoalcaligenes* из Областной клинической больницы (ОКБ) им. Семашко; 2 штамма НГОБ и 1 - *Enterobacter aerogenes* из Нижегородского областного онкологического диспансера (НООД). Все культуры были любезно предоставлены сотрудниками проблемной научной лаборатории микробиологии НИИ профилактической медицины ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России.

Чувствительность к антибиотикам: пенициллинам (бензилпенициллин, оксациллин), аминогликозидам (гентамицин), макролидам (эритромицин), линкозамидам (клиндамицин), хлорамфениколу (левомицетин), гликопептидам (ванкомицин) определяли диско-диффузионным методом. Литическую активность бактериофагов (секстафаг, пиобактериофаг поливалентный, интести-бактериофаг, пиобактериофаг комплексный, стафилококковый бактериофаг производства фирмы «Микроген») оценивали методом «стерильного пятна», учет результатов производили по 4-крестовой схеме с разделением на две группы: чувствительные – интенсивность лизиса «++++», «+++», «++» и устойчивые – отсутствие лизиса и слабочувствительные «+». Пленкообразование бактерий оценивали по [6], активность внеклеточных ферментов определяли по [7,8].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ «Microsoft Excel» и «Biostat 2009» методами параметрической и непараметрической статистики по критериям Стьюдента, Манна-Уитни. Различия между независимыми группами данных считались достоверными при  $p < 0,05$ .

В результате проведенной работы было показано, что все исследованные штаммы стафилококков были чувствительны к ванкомицину, в отношении же других антибиотиков они проявляли различную степень резистентности. Наибольшую устойчивость культуры *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis* показали к пенициллину (от  $77,8 \pm 14,7$  до 100%) и эритромицину (от  $60,0 \pm 21,5$  до 100%). Тест чувствительности к оксациллину является показателем для выявления метициллинрезистентных стафилококков. Так, по нашим данным, наиболее часто резистентность к оксациллину проявляли *S.haemolyticus* из КЦ и ДС (70-77% штаммов) и *S.epidermidis* из КЦ ( $62,5 \pm 21,0\%$ ). Однако выделенные в ДС и ПК культуры *S.epidermidis* в 80% случаев были чувствительны к оксациллину, так же как *S.hominis* и *S.haemolyticus* из ПК.

В отношении остальных апробированных антибиотиков культуры стафилококков реже проявляли резистентность, так к клиндамицину и гентамицину были чувствительны *S.aureus*, *S.hominis*, *S.lugdunensis*, *S.simulans*, 78-87% штаммов *S.epidermidis* и 75-82% штаммов *S.haemolyticus*. Чувствительными к действию хлорамфеникола были 75,0% штаммов *S.aureus*, 64,3% штаммов *S.haemolyticus*, 91,3% штаммов *S.epidermidis*, 66,7% штаммов *S.hominis* и в 100% случаев культуры *S.lugdunensis* и *S.simulans*.

Следует отметить большую долю полирезистентных штаммов (с устойчивостью к двум и более антибиотикам). Среди стафилококков полирезистентными были 55,6% *S.aureus*, 85,7% *S.epidermidis*, 86,1% *S.haemolyticus*, 87,5% *S.hominis*, 50% *S.simulans* и *S.capitis*.

Все исследованные штаммы *S.aureus* были устойчивы к пиобактериофагу комплексному и за единичными исключениями – к остальным бактериофагам. Что касается CoNS, то доля устойчивых штаммов колебалась для секстафага от 78,0±11,7%, пиобактериофага поливалентного от 50,0±20,4%, интести-бактериофага от 66,7±14,8%, для пиобактериофага комплексного от 88,9±6,6%, стафилококкового бактериофага от 65,5±8,4% до 100% - в зависимости от ЛПУ.

Штаммы *S.epidermidis* были полирезистентны ко всем фагам, за единичными исключениями к стафилококковому бактериофагу и пиобактериофагу поливалентному.

Штаммы *S.haemolyticus* из ДС также проявляли полирезистентность к бактериофагам, кроме единичных случаев чувствительности к секстафагу, пиобактериофагу поливалентному и стафилококковому бактериофагу. Однако доля устойчивых штаммов *S.haemolyticus* из КЦ составляла от 70,0 до 90,0%, а для стафилококкового бактериофага – 20,0±10,1%.

Штаммы *S.hominis*, *S.lugdunensis* и *S.simulans* также были полирезистентны к действию бактериофагов, за исключением 1 культуры *S.lugdunensis* из ПК.

Антибиотикорезистентность грамотрицательных бактерий была оценена к аминогликозидам (гентамицин, амикацин), фторхинолонам (ципрофлоксацин), цефалоспорином (цефепим, цефтазидим), карбапенемам (имипенему) и хлорамфениколу. Штаммы *P.aeruginosa* из НОДКБ были устойчивы к действию антибиотиков и бактериофага псевдомонас аэругиноза. Штаммы НГОБ из НООД проявляли устойчивость к амикацину, цефалоспорином и ко всем исследованным бактериофагам. Штаммы из ОКБ им. Семашко были чувствительны к хлорамфениколу, имипенему, гентамицину, цiproфлоксацину и устойчивы к воздействию секстафага и пиобактериофага комплексного. Полирезистентными к антибиотикам были 77,8% штаммов исследованных грамотрицательных бактерий.

Способность к пленкообразованию исследуемых штаммов стафилококков и НГОБ оценивали по прилипанию клеток к лункам пластикового планшета и интенсивности их окрашивания кристалвиолетом, которая измерялась в единицах оптической плотности (ОП) при длине волны 540 нм. Все исследованные культуры обладали способностью к формированию биопленки, которую считали низкой при  $OP_{540} < 0,5$ , средней при значениях  $OP_{540} 0,5-1,0$  и высокой при  $OP_{540} > 1$ . Штаммы *S.aureus* обладали средней и высокой способностью к пленкообразованию – от 0,63 до 1,29; штаммы *S.haemolyticus* - средней (0,53±0,06), которая была достоверно выше, чем у *S.epidermidis* из КЦ - в 1,9 раза ( $p=0,0263$ ), из ПК - в 1,5 раза ( $p=0,0412$ ), из ДС - в 2,9 раза ( $p=0,0041$ ). Остальные штаммы CoNS, в основном, отличались низкой способностью к пленкообразованию.

Из грамотрицательных бактерий средние значения пленкообразования были выявлены у штаммов *P.aeruginosa* из НОДКБ и *E.aerogenes* из НООД.

Поскольку хронические инфекции практически всегда связаны с формированием биопленки, то наличие средней и высокой способности к пленкообразованию у культур бактерий, выделенных при ИСМП, является угрожающим фактором, обеспечивающим как колонизацию больных этиопатогенами, так и выживание бактерий во внешней среде ЛПУ.

У исследованных культур был определен уровень выраженности факторов патогенности (протеазная, лизоцимная, гиалуронидазная активности) и персистенции (антилизоцимная активность).

Протеолитической активностью (ПА) обладали все исследованные штаммы *S.epidermidis* и *S.lugdunensis*, 8 из 9 штаммов *S.aureus*, 5 из 6 штаммов *S.hominis* и 50% штаммов *S.simulans* и *S.haemolyticus*. ПА оценивали как высокую при значениях 5,0 е.а./мл и выше, среднюю – при 1,0-4,9 е.а./мл, низкую – при 0,1-0,9 е.а./мл, очень низкую – менее 0,1 е.а./мл. У штаммов *S.aureus* был отмечен средний уровень ПА от 1,3±0,6 е.а./мл (ДС) до 4,3±4,2 е.а./мл (КЦ). Культуры *S.hominis* из КЦ также показали среднюю ПА – 1,6±0,6 е.а./мл. Штаммы *S.lugdunensis* и *S.simulans* из ПК проявили очень низкую ПА. Что касается *S.haemolyticus*, то культуры из КЦ и ДС показали очень низкую, а культуры из ПК – среднюю ПА – 1,2±0,5 е.а./мл. Во всех стационарах уровень ПА у *S.haemolyticus* был достоверно ниже, чем у изолятов *S.epidermidis* - 3,2±1,2 е.а./мл (КЦ), 1,9±0,5 е.а./мл (ДС), 5,3±0,8 е.а./мл (ПК) при  $p=0,0007$ ,  $p=0,0027$  и  $p=0,0015$ , соответственно. Наибольшую ПА проявил штамм *P.aeruginosa* (НОДКБ) – 93,6 е.а./мл.

Таким образом, наиболее агрессивными протеолитическими свойствами обладали

*P.aeruginosa*, *S.aureus*, *S.epidermidis* независимо от того, в каком стационаре они были выделены.

Как известно, лизоцимная активность (ЛА) микробов создает селективные преимущества для патогенов в экологической нише и частично ассоциируется с высокой вирулентностью культур бактерий, вызывающих длительное и тяжелое течение инфекционного процесса. В наших исследованиях ЛА обладали 55,6% *S.aureus* (из них 80% - средней и высокой) и 46,2% CoNS, причем высокой и средней ЛА из них обладали 38,9% штаммов. Таким образом, выраженная ЛА была в большей степени присуща *S.aureus* – 44,5% штаммов с высокой и средней активностью, чем CoNS (17,9% штаммов со средней и высокой ЛА).

Гиалуронидазную активность (ГА) как фактор патогенности с инвазивной функцией оценивали в полуколичественном тесте по диаметру зон лизиса гиалуроновой кислоты в агарозе вокруг лунок с внеклеточными продуктами исследованных штаммов. ГА обладали 8 из 9 культур *S.aureus* и 75 из 78 штаммов CoNS. Наибольшую ГА проявили культуры из КЦ: *S.epidermidis* (8,9±4,5 мм), *S.hominis* (3,3±0,6мм), *S. haemolyticus* (2,7±0,2 мм), *S.aureus* (3,6±1,2 мм), а также культуры из ПК: *S.epidermidis* (5,0±0,8 мм), *S.haemolyticus* (4,7±2,5 мм). Остальные культуры показали значения ГА от 1,5 до 2,2 мм.

Антилизоцимная активность (АЛА) рассматривается в качестве одного из факторов персистенции бактерий [9]. Известно, что АЛА < 2 мкг/мл у возбудителей соответствует благоприятному течению заболеваний, а повышение антилизоцимной активности микроорганизмов более 2 мкг/мл свидетельствует об их высоком патогенном потенциале [10]. В наших исследованиях наиболее высокие показания АЛА были у культур из КЦ: *S.aureus* (11,15±2,30 мкг/мл), *S.epidermidis* (6,43±2,71 мкг/мл), *S.haemolyticus* (7,84±1,81 мкг/мл) и *S.hominis* (3,61±1,32 мкг/мл), а также у *S.aureus* из ДС (5,64±2,55 мкг/мл). Уровень АЛА у *S.epidermidis* из ПК (6,70±1,14 мкг/мл) был достоверно выше, чем у *S.haemolyticus* (2,37±1,01 мкг/мл), *S.lugdunensis* (0,46±0,45 мкг/мл) и *S.simulans* (0,94±0,94 мкг/мл) при  $p=0,0179$ ,  $p=0,0085$  и  $p=0,0196$ , соответственно. Следует отметить, что АЛА отсутствовала у 2 из 9 штаммов *S.aureus*, а также 9 из 29 штаммов CoNS из ПК, 5 из 29 штаммов CoNS из КЦ и 18 из 20 штаммов CoNS из ДС. Следовательно, наиболее выраженным потенциалом персистенции в виде АЛА обладали культуры стафилококков из КЦ.

Таким образом, исследование выделенных от больных бактерий выявило наличие факторов патогенности, персистенции и полирезистентности к антимикробным средствам, что способствует циркуляции бактерий в стационарах, являясь предпосылкой возникновения неблагоприятной эпидемиологической ситуации, результатом которой являются случаи регистрации ИСМП.

#### Выводы:

1. Культуры стафилококков, НГОБ и энтеробактерий, выделенные от больных в ЛПУ г. Н.Новгорода, отличались полирезистентностью к антимикробным средствам в 50-100% случаев. Наиболее часто исследованные штаммы проявляли устойчивость к пенициллинам, макролидам и практически ко всем бактериофагам.
2. Способность к пленкообразованию выявлена у всех исследованных штаммов стафилококков, наиболее высокая – у *S.aureus*, *S.haemolyticus* и *S.simulans*. У всех исследованных культур *S.epidermidis* способность к формированию биопленки была достоверно ниже, чем у *S.haemolyticus*.
3. Среди доминирующих в ЛПУ CoNS культуры *S.epidermidis* отличались более высоким уровнем ПА по сравнению с *S.haemolyticus*.
4. Наиболее высокими показателями гиалуронидазной, протеазной и антилизоцимной активностей обладали *S.aureus* из КЦ, *S.epidermidis* из КЦ и ПК.

#### Литература:

1. Руководство по медицинской микробиологии. Книга III, том 2. Оппортунистические инфекции: клинико-эпидемиологические аспекты / Кол. авторов // Под ред. А.С.Лабинской, Е.Г.Волиной, Е.П.Ковалевой. – М.: БИНОМ, 2014 год. – 880 с.

2. Брико, Н.И. Эпидемиологическая безопасность – важнейшая составляющая обеспечения качества и безопасности медицинской помощи / Н.И.Брико, Е.Б.Брусина, Л.П.Зуева и др. // Вестник Росздравнадзора. – 2014. - №3. - С.27-32.
3. Широкова, И.Ю. Эпидемиологические и микробиологические особенности инфекций, обусловленных коагулазоотрицательными стафилококками : дис. ... канд. мед. наук : 14.02.02 / Широкова Ирина Юрьевна. – Н. Новгород, 2014. – 177 с.
4. Зубков, М.Н. Диагностика и антимикробная терапия катетер-ассоциированных инфекций кровотока / М.Н.Зубков // Хирургия. – 2008. - № 1. – С.18-22.
5. Корниенко, М.А. Способность стафилококков различных видов к образованию биопленок и их воздействие на клетки человека / М.А.Корниенко, В.Н.Копыльцов, Н.В.Шевлягина и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016. - №1. – С.18-25.
6. Кузнецова, М.В. Формирование биопленок нозокомиальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* / М.В.Кузнецова, Н.В.Николаева, С.М.Розанова, Т.И.Карпунина // Журнал микробиологии. – 2011. - №4. - С. 8-14.
7. Ермолина, Г.Б. Исследование факторов патогенности бактерий, выделенных от детей в многопрофильном стационаре / Г.Б. Ермолина, Е.А. Нестерова, О.А. Баранова, Е.В. Беляева // Современные проблемы эпидемиологии: сборник статей, посвященных 65-летию кафедры эпидемиологии Нижегородской гос. мед. академии - Н.Новгород.: НГМА, 2007. - С.62-67.
8. Беляева, Е.В. Биологическая характеристика бактерий, колонизирующих слизистые оболочки дыхательных путей, при хронических заболеваниях / Е.В.Беляева, Е.В.Борискина, Г.Б. Ермолина и др. // Медицинский альманах. – 2009. - №2(7). - С. 114-117.
9. Андриященко, С.В. Молекулярные механизмы взаимодействия бактерий с лизоцимом и их роль в микросимбиозе / С.В.Андриященко, Н.Б.Перунова, О.В.Бухарин // Успехи современной биологии. – 2015. – Т.135, №5. – С.453-463.
10. Бухарин, О. В. Персистенция патогенных бактерий / О.В.Бухарин. - М.: Медицина, 1999. - 364 с.

## **КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ**

**Вакарина А.А., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф.**

*ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, Тюмень*

История изучения бактериофагов и анализ их применения в медицине позволяют с уверенностью сказать, что бактериофаги чрезвычайно востребованы в лечении самых разнообразных инфекционных заболеваний человека [1,2,3,4,5,6,7,8,9]. Но применять бактериофаги без предварительной оценки их литического действия не допустимо, так как благодаря феномену фаговой или лизогенной конверсии, бактериофаги играют важную роль в эволюции бактерий и приобретении ими новых свойств, в том числе резистентность к антибактериальным препаратам [10,11].

На сегодняшний день в лабораторной практике для определения чувствительности бактерий к бактериофагам преимущественно используются две методики постановки теста: определение фаголитической активности бактериофага на твердой питательной среде по оценке степени лизиса культуры [12] и постановка реакции в жидкой питательной среде, когда чувствительность культуры к бактериофагу определяется по интенсивности мутности [13]. Проведенный нами анализ литического действия пибактериофага поливалентного на плотной и в жидкой питательной среде, выявил достоверное различие результатов этих методик. Установлено, что литическая способность бактериофага при исследовании на мясопептонном агаре с культурами *S.aureus* и *K.pneumoniae* менее выражена, чем при использовании жидкой питательной среды – мясо-пептонного бульона. Этот факт свидетельствует о несовершенстве существующих методик и необходимости разработки способа, позволяющего исключить субъективизм в оценке литической активности бактериофагов [14].

Таким образом, целью нашего исследования явилась разработка метода, позволяющего количественно оценить литическую активность бактериофагов в отношении некоторых бактерий по оптической плотности.

#### Материалы и методы

Отработка методики количественной оценки литической активности бактериофагов проводилась на 36 штаммах *Staphylococcus aureus* и 36 культурах *Escherichia coli*. Идентификация микроорганизмов проводилась классическим бактериологическим методом и с помощью настольного времяпролетного масс-спектрометра с матричной лазерной десорбцией Microflex по белковым спектрам. Для проведения дальнейших исследований брали культуры с показателем score более 2 (коэффициент достоверности).

В работе использовались стафилококковый и коли-протейный бактериофаги производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ г. Пермь.

Для приготовления рабочей суспензии исследуемого микроорганизма использовали чистую суточную агаровую культуру. Микробную массу брали бактериологической петлей с плотного питательного агара, помещали в стеклянную пробирку, содержащую 4,5 мл стерильного физиологического раствора, и тщательно гомогенизировали. Плотность инокулята измеряли на денсиметре, доводили до 0,5 ЕД по МакФарланду, что соответствовало  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. Исследование литической активности бактериофагов проводили в стерильных пластиковых плоскодонных планшетах для иммуноферментного анализа. На изучение одной культуры микроорганизма (включая контроли) отводили 8 лунок одного ряда (по вертикали). В лунки А, В, С D, Е, вносили 150 мкл мясо-пептонного бульона, 50 мкл испытуемого специфического бактериофага и 20 мкл приготовленной суспензии микроорганизмов (табл.1). Таким образом, испытуемый микроорганизм и специфический бактериофаг исследовали пятикратно. В лунку F вносили 150 мкл мясо-пептонного бульона и 50 мкл бактериофага – фон реакции взаимодействия этих компонентов и контроль стерильности, в лунки G и H - 150 мкл мясо-пептонного бульона и 20 мкл приготовленной суспензии микроорганизмов – контроль роста испытуемого микроорганизма. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 10-12 часов. Измеряли оптическую плотность на фотометре микропланшетного формата Multiscan FC при длине волны 450/620 нм после удаления пленки.

Таблица 1

Схема постановки реакции определения количественной оценки литической активности бактериофагов

А	150 мкл питательного бульона 50 мкл бактериофага 20 мкл бактерии в концентрации 0,5 ЕД по Мак-Фарланду	Литическая активность бактериофага
В	150 мкл питательного бульона 50 мкл бактериофага 20 мкл бактерии в концентрации 0,5 ЕД по Мак-Фарланду	Литическая активность бактериофага
С	150 мкл питательного бульона 50 мкл бактериофага 20 мкл бактерии в концентрации 0,5 ЕД по Мак-Фарланду	Литическая активность бактериофага
D	150 мкл питательного бульона 50 мкл бактериофага 20 мкл бактерии в концентрации 0,5 ЕД по Мак-Фарланду	Литическая активность бактериофага
Е	150 мкл питательного бульона 50 мкл бактериофага 20 мкл бактерии в концентрации 0,5 ЕД по Мак-Фарланду	Литическая активность бактериофага
F	150 мкл питательного бульона 50 мкл бактериофага	Контроль стерильности и ячейка для измерения фоновой оптической плотности

G	150 мкл питательного бульона 20 мкл бактерии в концентрации 0,5 ЕД по Мак-Фарланду	Контроль роста и с п ы т у е м о г о микроорганизма
H	150 мкл питательного бульона 20 мкл бактерии в концентрации 0,5 ЕД по Мак-Фарланду	Контроль роста и с п ы т у е м о г о микроорганизма

Показатель литической активности (ЛА) рассчитывали по формуле: вычисляли среднее значение пяти показателей оптической плотности (ОП среднее) - в лунках А,В,С,Д,Е и вычитали оптическую плотность фона среды (ОП фона) - лунки F.

$$ЛА = ОП \text{ средняя} - ОП \text{ фона}$$

Для определения числового показателя литической активности бактериофага по оптической плотности из каждой опытной лунки микропланшета сделан высев на чашку Петри с мясо-пептонным агаром. После инкубации при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 10-12 часов подсчитано количество выросших колоний. По соотношению количества выросших колоний и показателя оптической плотности вычислено значение литической активности бактериофага.

### Результаты исследований и их обсуждение

Сопоставление результатов количества выросших колоний при высеве из лунок и сравнение измерений оптической плотности позволило определить значение показателя литической активности бактериофага чувствительного к испытуемой культуре микроорганизмов. Исследуемый микроорганизм оценивали как чувствительный к бактериофагу при значении показателя ЛА не более 0,045+0,025. При этом значения ОП контроля роста микроорганизма (лунки G,H) должен превышать показатель ОП средняя более чем в 2 раза, тогда бактериофаг оценивается как обладающий высокой литической активностью. При значении выше указанного показателя ЛА – микроорганизм считают устойчивым к исследуемому бактериофагу, а его литическую активность – низкой. Постановка реакции не учитывалась, если ОП фона было более 0,3.

Результаты измерения оптической плотности при определении литической активности стафилококкового бактериофага в отношении микроорганизмов *S. aureus* выборочно (12 штаммов) и подсчет выросших колоний культуры *S. aureus* после воздействия стафилококкового бактериофага с контролем роста культуры без добавления бактериофага представлены в таблице 2.

Исходя из выше изложенного определено, что штаммы бактерий *S. aureus* 2891, 2879, 2887, 2902, 2898, 2838, 2841, 2929, 2880 отнесены к чувствительным к стафилококковому бактериофагу (показатель ЛА в интервале 0,026 – 0,061 и КОЕ/мл среднее от 5,4 до 20,2). А штаммы 2917, 2904, 2897 определены как устойчивые к данному фагу (показатель ЛА в интервале 0,299 – 0,42 и КОЕ/мл среднее от 109,6 до 240,4).

Результаты измерения оптической плотности, характеризующей литическую активность коли-протейного бактериофага в отношении микроорганизмов *E. coli* также выборочно и количество выросших колоний культуры *E. coli* после воздействия коли-протейного бактериофага с контролем роста культуры без добавления бактериофага представлены в таблице 3. Аналогично оценены по чувствительности к бактериофагам бактерии *E. coli*. Штаммы *E. coli* 2841, 2056, 2907, 2785, 2902, 2785, 2784, 2923, 2908 оцениваются как чувствительные к коли-протейному бактериофагу, а микроорганизмы *E. coli* 2910, 2920, 2098 – устойчивые к данному фагу.

По описанной методике оформлена заявка на изобретение. Техническим результатом предлагаемого изобретения является повышение надежности, достижение достоверности полученного результата за счет количественной оценки чувствительности микроорганизмов к бактериофагам, разработка четких цифровых значений для определения литической способности бактериофагов.

Разработанная нами методика позволяет изучать литическую активность бактериофага в жидкой питательной среде с количественной оценкой чувствительности.

Результаты измерений оптической плотности при исследовании  
литической активности стафилококкового бактериофага в отношении  
микроорганизмов *Staphylococcus aureus*.

№ штам-ма	2891	2879	2887	2917	2904	2902	2898	2838	2841	2929	2880	2897
А	0.206	0.223	0.234	0.432	0.595	0.236	0.235	0.238	0.253	0.229	0.224	0.298
В	0.231	0.222	0.230	0.234	0.372	0.228	0.220	0.299	0.249	0.256	0.226	0.327
С	0.229	0.231	0.231	0.246	0.469	0.239	0.262	0.236	0.240	0.246	0.227	0.304
Д	0.242	0.228	0.231	0.243	0.433	0.216	0.227	0.252	0.235	0.236	0.230	0.314
Е	0.243	0.237	0.233	0.402	0.251	0.309	0.239	0.267	0.256	0.242	0.234	0.255
Ф ОП фона	0.204	0.184	0.201	0.192	0.218	0.204	0.200	0.206	0.186	0.201	0.194	0.193
Г	0.862	0.902	1.033	0.567	0.585	0.585	0.657	0.602	0.721	0.733	1.260	0.599
Н	0.790	0.971	0.953	0.566	0.627	0.499	0.583	0.755	0.616	0.997	0.986	0.695
ОПр.	0.23	0.228	0.23	<b>0.31</b>	<b>0.42</b>	0.245	0.236	0.258	0.247	0.242	0.228	<b>0.299</b>
ОПр.-ОП фона	0.026	0.044	0.029	<b>0.118</b>	<b>0.202</b>	0.041	0.036	0.052	0.061	0.041	0.034	<b>0.106</b>
Количество выросших колоний (КОЕ/мл) после воздействия бактериофага (А,В,С,Д,Е) и контроль роста культуры без бактериофага (Г,Н)												
А	1	4	15	150	300	35	30	26	28	2	5	230
В	3	5	6	68	250	8	5	28	20	9	7	247
С	2	8	12	100	280	14	7	15	15	8	5	157
Д	8	7	14	92	270	3	5	19	11	6	9	170
Е	13	12	13	138	102	41	6	7	9	7	10	99
Ф	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Г	С л и в н о й р о с т											
Н	С л и в н о й р о с т											
Среднее КОЕ А,В,С,Д,Е	5.4	7.2	10.0	<b>109.6</b>	<b>240.4</b>	20.2	10.6	19.0	16.6	6.4	7.2	<b>180.6</b>

Таблица 3

Результаты измерений оптической плотности при исследовании литической активности коли-протейного бактериофага в отношении микроорганизмов *E. coli*.

№ штамма	2841	2056	2907	2910	2785	2902	2785	2784	2923	2908	2920	2098
A	0.190	0.229	0.201	0.415	0.218	0.221	0.212	0.222	0.208	0.206	0.401	0.286
B	0.207	0.218	0.202	0.520	0.215	0.212	0.205	0.203	0.205	0.206	0.292	0.287
C	0.206	0.221	0.209	0.463	0.261	0.222	0.217	0.282	0.209	0.223	0.315	0.359
D	0.205	0.304	0.221	0.446	0.207	0.225	0.205	0.211	0.239	0.230	0.388	0.301
E	0.209	0.238	0.212	0.329	0.207	0.204	0.210	0.252	0.218	0.231	0.265	0.322
F	0.189	0.179	0.177	0.174	0.184	0.180	0.184	0.195	0.201	0.177	0.178	0.182
G	0.849	0.931	0.667	0.602	0.539	0.521	0.498	0.611	0.626	0.875	0.876	1.029
H	0.966	0.866	0.542	0.541	0.934	0.588	0.483	0.585	0.717	1.160	0.910	0.967
ОПср.	0.203	0.242	0.209	<b>0.434</b>	0.222	0.217	0.209	0.234	0.216	0.219	<b>0.332</b>	<b>0.311</b>
ОПср.- ОП ф.	0.014	0.063	0.032	<b>0.26</b>	0.038	0.037	0.025	0.039	0.015	0.042	<b>0.154</b>	<b>0.129</b>
Количество выросших колоний (КОЕ/мл) после воздействия бактериофага (А,В,С,Д,Е) и контроль роста культуры без бактериофага (G,H)												
A	0	23	1	240	2	2	2	7	1	0	300	155
B	0	9	3	280	0	0	9	0	0	2	180	167
C	0	7	5	300	6	3	3	15	3	0	200	208
D	2	15	7	310	9	7	0	4	11	8	270	188
E	1	18	5	295	3	1	2	13	8	10	110	180
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	Сливной рост											
H	Сливной рост											
Среднее КОЕ (А,В,С, D,E)	0.6	14.4	4.2	<b>285.0</b>	4.0	2.6	2.0	7,8	4.6	4.0	<b>212.0</b>	<b>178,3</b>

Литература:

1. Делягин В.М. Бактериофаготерапия на современном этапе./ Делягин В.М. //Актуальная проблема на современном этапе.-2015.-№3. -С.132-136.
2. Ширева Ю.В. Оптимизация применения бактериофагов в терапии аэробного вагинита./ Ю.В. Ширева, Т.И. Карпунина, О.В. Белоусова //Медицинский альманах.- 2009.- №4(9)- ноября С.126-128.
3. Белопольская Х.А. Возможности фаговой терапии гинекологической инфекции./ Х.А. Белопольская, И.С. Сидорова, Л.С. Шахгиреева, А.А. Белопольский. // Трудный пациент.-2014.- №8-9.- С. 6-9.
4. Казьянин А.В. Бактериофаги: опыт производства и применения / А.В.Казьянин, Е.В. Орлова, М.Г. Ефимова, Е.В. Функнер, О.И. Шитова // Фармация.- 2010.- №3.- С. 36-37.
5. Падруль М.М.«Ренессанс» фаготерапии воспалительных процессов/ М.М. Падруль, Е.Г. Кобаидзе, А.А. Олина, Г.К. Садыкова. //Современные проблемы науки и образования.-2015.-№1.- С. 1358-1370.
6. Грищук В.В. Применение поливалентного бактериофага «секстафаг » в комплексном лечении инфицированного панкреонекроза./ В.В. Грищук, А. П. Колеватов // Медицинская наука и образование Урала.- 2008.-№3.- С. 58-59.
7. Худогова З.П.Эффективность использования стафилококкового бактериофага в топической терапии хронического тонзиллита /З.П. Худогова, А.Н. Евстропов, Н.Г. Васильева, М.А. Рымша, И.В. Подволоцкая, М.В. Шоларь //Российская оториноларингология.-2011.-№6(55).-С.175-180.
8. Лазарева Е.Б. Бактериофаги - история вопроса и современное состояние фаготерапии./ Е.Б. Лазарева, Д.Д. Меньшиков // Медицинский алфавит.-2014.-№4.- С. 43-48.
9. Мидленко В.И. Микробиологическое обоснование применения бактериофагов для лечения больных с инфекционными осложнениями в клинике травматологии и ортопедии/ В.И. Мидленко, С.Н. Золотухин, Г.А. Шевалаев, И.М. Ефремов, Ю.В. Пичугин //Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности».- Ульяновск .-2013.-Т.2.- С.40-44.
10. Федеральные клинические (методические) рекомендации. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике.- Москва, 2014.- С. 1-54.
11. Асланов Б.И. Роль бактериофагов в горизонтальном генетическом обмене среди возбудителей инфекций в стационарах./ Б.И. Асланов, А.А. Долгий, А.Е. Гончаров, А.И. Архангельский.// Эпидемиология, микробиология, инфекционные и паразитарные болезни.-2012.-№4(45).- С.38-41
12. Майская Л.М. Методика определения фагочувствительности штаммов, выделенных от больных, к препаратам бактериофагов /Л.М. Майская О.С.Дарбеева, Р.Л. Парфенюк, А.Д. Гвоздева, В.Ф.Малышева //Научно-практический журнал БИО препараты.-2003.-№2(10).- С. 22-23.
13. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования./ Под редакцией М.О. Биргера// Москва «Медицина».-1982.- С.118-119.
14. Катаева Л.В., Вакарина А. А., Нижегородцева Н.Ф. Оценка литической активности некоторых бактериофагов. //Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы международной научно-практической конференции. Ульяновск, 23-25 апреля 2013 г. Т. II.- С. 17-22.

## РАЗЛИЧНЫЕ ПОДХОДЫ К ГЕНОТИПИРОВАНИЮ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСОВ

Ванькова О.Е., Бруснигина Н.Ф., Григорьева Г.И.

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород

Герпесвирусные инфекции являются одной из ведущих проблем современного здравоохранения. Вирусы семейства *Herpesviridae*, в частности, цитомегаловирусы остаются одной из главных причин мертворождаемости, самопроизвольных выкидышей, преждевременных родов, младенческой смертности. По данным отечественных и зарубежных специалистов от 0,5 до 5% детей появляются на свет с врожденной цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ), из них около 90% являются бессимптомными носителями [1, 2].

Серьезной проблемой является заражение цитомегаловирусом (ЦМВ) реципиентов крови. В России доноры пока не обследуются на ЦМВИ. В то же время известно, что при переливании крови от серопозитивных доноров заражается от 15 до 40% детей и 2-3% взрослых. Еще более сложные проблемы связаны с трансплантацией органов, поскольку фактором передачи инфекции может быть не только перелитая кровь, но и орган. Пациенты, перенесшие трансплантацию органов, нуждаются в приеме иммуносупрессивных препаратов, что повышает риск инфицирования и развития ЦМВИ. По данным литературы частота выявления цитомегаловирусов среди пациентов, перенесших трансплантацию печени, варьирует от 23 до 85%, при этом у 15-40% из них развивается активная форма ЦМВИ [3; 4; 5].

Исследования зарубежных авторов свидетельствуют о том, что штаммы ЦМВ человека являются близкородственными. Гомология ДНК различных штаммов составляет 90-95%. Генетические различия среди ЦМВ штаммов равномерно распределены по всему геному, но в особенных регионах наблюдается высокий уровень мутаций. Эти области не случайным образом распределены внутри вирусного генома, что гарантирует существование четких геномных вариантов, или «генотипов», при этом полиморфные последовательности встречаются как в кодирующих, так и в некодирующих регионах.

Генетическая изменчивость ЦМВ позволяет вирусу реализовать способы иммунного уклонения (например, изменение антигенных эпитопов), создавать вирусные структуры с большей способностью адаптироваться (структурные белки), увеличивать тропизм к клеткам организма-хозяина, повысить эффективность репликации вируса, изменить чувствительность к фармацевтическим препаратам. На данный момент работы по генотипированию ЦМВ проводятся только за рубежом, где большое внимание уделяется проблеме определения роли различных генотипов в развитии определенных клинических форм ЦМВИ. Активно ведутся работы по разработке вакцины для профилактики врожденной ЦМВИ. Основным контингентом вакцинирования рассматриваются женщины детородного возраста [6 - 10].

Работы по генотипированию вируса открывают новые перспективы в области эпидемиологического надзора за ЦМВИ среди ЦМВ-инфицированных, особенно беременных, новорожденных, детей первого года жизни и пациентов перенесших трансплантацию органов. Информация о циркулирующих ЦМВ генотипах необходима для получения объективной информации о региональных тенденциях ЦМВИ, выявления источников инфекции, постановки диагноза на ранних стадиях.

**Цель работы** - оценить различные варианты генотипирования цитомегаловирусов, циркулирующих среди населения г. Нижнего Новгорода.

### **Материалы и методы.**

Обследовано 420 детей в возрасте от 1 месяца до 16 лет – пациентов ФГБУ «Нижегородского НИИ детской гастроэнтерологии» Минздрава России, ГУ Нижегородской областной детской клинической больницы, городских детских больниц №№1, 27, 39 (Н.Новгород), детских отделений

ГБУЗ НО «Инфекционной больницы № 23 Нижнего Новгорода» и Кстовской ЦРБ. Материалом для исследования служили образцы мочи, слюны, слезного отделяемого, крови.

Отбор, транспортировку и хранение клинического материала проводили в соответствии с МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» Исследования осуществляли методом ПЦР с использованием коммерческих тест-систем производства ЦНИИЭ (г. Москва). Экстракцию ДНК из биологических субстратов проводили в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который позволяет контролировать этапы ПЦР-исследования и оценивать адекватность взятия материала и его хранение. Аналитическая чувствительность тест-системы «АмплиСенс» соответствовала 5копий ДНК ЦМВ на  $10^5$  клеток.

В работе использованы методические подходы к генотипированию ЦМВ по двум вариабельным генам gB и gN.

Секвенирование проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit на секвенаторе ABI Applied Biosystems (США).

Олигонуклеотиды были синтезированы в фирме «ДНК синтез» (г.Москва). Для проведения ПЦР реакции использовались полимеразы производства Bio-Rad (США) и Takara (США). Детекцию продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле с последующей регистрацией результатов с использованием программы «Bio-test» и Image Lab 5.0.

#### **Результаты и обсуждение.**

Единой системы генотипирования до сих пор не существует, но показано, что для дифференциации клинических изолятов в качестве потенциальных эпидемиологических маркеров чаще используют наиболее изученные гипервариабельные гены: UL55 gB, UL73 gN, UL73 gO, UL144-TNRF [10, 12].

Был проведен анализ и подбор оптимальной пары праймеров для генотипирования по генам: gB, gN. На основе анализа данных литературы были выбраны и апробированы на контрольном штамме ЦМВ AD169 несколько пар праймеров. Критерием отбора были чистота нарабатываемого фрагмента, оптимальная температура отжига праймеров, размер получаемого фрагмента.

Для гена gB было исследовано 14 пар праймеров и 5 пар праймеров для гена gN, предложенных различными авторами (Табл. 1).

Для проведения дальнейших работ по валидации метода генотипирования ЦМВ на клинических образцах были отобраны следующие пары праймеров: к гену gB, предложенная Chou S. Et al в 1991 году и к гену gN, предложенная Pignatelli S. et al в 2003г. В таблице 2 представлены последовательности отобранных праймеров и их сравнение с последовательностями 7 штаммов ЦМВ (Табл.2).

Обе пары праймеров были протестированы на клинических образцах, взятых от новорожденных и детей в возрасте от 1 месяца до 16 лет. В связи с тем, что при исследовании не проводилось культивирование вируса на культуре клеток, была проведена работа по подбору оптимальных условий проведения ПЦР реакции, и оптимального количества образца необходимого для проведения исследования.

Для пяти образцов, полученных от детей с подтвержденным клиническим диагнозом ЦМВИ, было проведено секвенирование фрагментов гена gB. Все пять последовательностей были депонированы в международной базе данных Gene Bank, Acc № KP238130, KP260503-KP260506. Четыре образца относились к генотипу gB1 и один к генотипу gB3.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости продолжения исследований по генотипированию клинических изолятов ЦМВ, циркулирующих в различных группах риска.

Таблица 1.

Праймеры, используемые разными исследователями, в генотипировании ЦМВ  
по генам gB и gN

Последовательность праймеров	Источник
gB up1 5' tgg aac tgg aac gtt tgg c 3' gB lo1 5' gca cct tga cgc tgg ttt gg 3' gB lo1a 5' gaa acg cgc ggc aat cgg 3'	[11]
gB up2 5' gat ctc ctg gga tat aca gga cg 3' gB lo2 5' gaa tyg ctg arg gyt tga tct tg 3' gB up3 5' acr ttc tgg gaa gcc tgg gaa cg 3' gB lo3 5' gag ttc ctt gaa gac ctc tag 3'	[12]
gB up4 5' cct cat cgc tgc tgg att 3' gB lo4 5' tga ctc cca cca cat ctc 3' gB up5 5' att tgg ccc geg acg aac at 3' gB lo5 5' ctc cgt act tga ggg tag tg 3'	[13]
gBNF 5'-gga tct ggt gcc tgg tag tc-3' gBNR 5'-cga ata aga tcc gta ccc tg - 3' CLZ F 5'-tgt tct ggc aag gta tca aga a-3' CLZ R 5'-gtg aac tgc agc tgg gcg ta-3'	[14]
gB1 forward 5'tca cca ttc ctc tcr tac gac 3' gB1 reverse 5'cac cat ggc tga ccg ttt gg 3' gB2 forward 5'ctt taa ggt acg ggt cta cca a 3' gB2 reverse 5'gaa ctg tag cat tgg gca aac t 3' gB3 forward 5' ccg gtg tga act cca cgc g 3' gB3 reverse 5' gat tgg ctt tca rgy gac agg 3' gB4 forward 5'tcg tgc aac ttc tact ca taa tg 3' gB4 reverse 5'cgt tac gcg ttg aga gga gat 3'	[15]
gB F 5' tggaaactggaacgtttggc 3' gB R 5' gcacctgacgctggtttgg 3'	[16]
gN up 5' tgg tgt gat gga gtg gaa c 3' gN lo 5' tag cct ttg gtg gtt gc 3'	[17]
gN105672F 5'-cgc gac agt acc agt tga ga-3' gN106306R 5'-cta cac cta cgt cac cat c-3' gN105672F 5'-cgc gac agt acc agt tga ga -3' gN106179R 5'-ctt acc ccg ccg gaa cac-3'	[18]
gNF 5'-ttg ggt cgg tca aca tgg taa g-3' gNR 5'-ggt ggt tgc agt aaa gtt ctg ga-3'	[19]

Таблица 2.

Сравнение отобранных праймеров для генов gB и gN с последовательностями  
7 штаммов ЦМВ

праймеры gB	tggaa <b>ct</b> ggaacgtttggc	gcacctgacgct <b>g</b> gtttgg
fix-bac	tggaa <b>ct</b> ggaacgtttggc	gcacctgacgct <b>t</b> gtttgg

toledo	tggaactggaacgtttggc	gcacctgacgctggttgg
ad169	tggaatggaacgtttggc	gcacctgacgctggttgg
towne	tggaactcgaacgtttggc	gcacctgacgctggttgg
merline	tggaactcgaacgtttggc	gcacctgacgctggttgg
tr-bac	tggaactcgaacgtttggc	gcacctgacgctggttgg
davis	tggaactcgaacgtttggc	gcacctgacgctggttgg
праймеры gN	tggtg <del>t</del> gatggagtggaa <del>c</del>	gc <del>a</del> accaccaccaaaggcta
fix-bac	tggtg <del>c</del> gatggagtggaa <del>c</del>	gc <del>a</del> accaccaccaaaggcta
toledo	tggtg <del>c</del> gatggagtggaa <del>c</del>	gc <del>g</del> accaccaccaaaggcta
ad169	tggtg <del>t</del> gatggagtggaa <del>c</del>	gc <del>a</del> accaccaccaaaggcta
towne	tggtg <del>t</del> gatggagtggaa <del>c</del>	gc <del>a</del> accaccaccaaaggcta
merline	tggtg <del>t</del> gatggagtggaa <del>c</del>	gc <del>g</del> accaccaccaaaggcta
tr-bac	tggtg <del>t</del> gatggagtggaa <del>a</del>	gc <del>a</del> accaccaccaaaggcta
davis	tggtg <del>t</del> gatggagtggaa <del>c</del>	gc <del>a</del> accaccaccaaaggcta

Различные авторы по-разному оценивают влияние определенного генотипа ЦМВ на формирование клинической формы ЦМВИ. На сегодняшний день не удалось проследить четкой взаимосвязи между генотипом ЦМВ и клиническим проявлением инфекции, но знания о спектре циркулирующих генотипов ЦМВ и их иммуногенных свойствах необходимы для эпидемиологического надзора за ЦМВИ и разработки эффективной ЦМВ вакцины.

#### Литература:

1. Жебрун А.Б. Распространенность герпесвирусных инфекций у детей и взрослых в С.-Петербурге по данным сероэпидемиологического исследования/ А.Б Жебрун, Л.В. Куличева, К.Д. Ермоленко и др.// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2013. - № 6. - С. 30-36.
2. Cannon M. J. Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic/ M.J. Cannon, K. F. Davis // BMC Public Health.-2005.-№5.-70с
3. Stratta R.J. Cytomegalovirus infection and disease after liver transplantation. An overview/ R.J. Stratta, M. S. Shaeffer, R. S. Markin et al// Dig. Dis. Sci. -1992.- №37(5).-P. 673-88.
4. Kim C. K. Clinical usefulness of human cytomegalovirus antigenemia assay after kidney transplantation/ C. K. Kim, J. H. Song, S. M. Kim et al // Transplantation.- 2003.-№ 75(12).- P. 2151-5
5. Beam E. Cytomegalovirus disease is associated with higher all-cause mortality after lung transplantation despite extended antiviral prophylaxis/ E. Beam, T. Lesnick, W. Kremers// Clin. Transplant.- 2015.- Epub ahead of print
6. Bradley A. J. Genotypic analysis of two hypervariable human cytomegalovirus genes/A.J. Bradley, I. J. Kovacs, D. Gatherer et al// J. Med. Virol.-2008.-№80(9).-P.1615-1623
7. Pignatelli S. Intrauterine cytomegalovirus infection and glycoprotein N (gN) genotypes/ S. Pignatelli, P. Dal Monte, G. Rossini et al// J. Clin. Virol.- 2003.- №28(1).-P.38-43
8. Pignatelli S. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains/
9. S. Pignatelli, P. Dal Monte, G. Rossini, M. P. Landini// Rev. Med. Virol.-2004.-№14(6).-P.383-410
- Pignatelli S. Cytomegalovirus gN genotypes distribution among congenitally infected newborns and their relationship with symptoms at birth and sequelae/ S. Pignatelli, T. Lazzarotto, M. R. Gatto et al// Clin. Infect. Dis.-2010.-Vol.1.-№51(1).-P.33-41.
- 10.Pignatelli S. Recent knowledges on the linkage of strain specific genotypes with clinical manifestations of human citomegalovirus disease/ S. Pignatelli// Recenti. Prog. Med.-2011.-№102.-P.5-10.

11. de Albuquerque D.M. Genotyping of human cytomegalovirus using non-radioactive single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis/ D.M. de Albuquerque, S.C. Costa // J Virol Methods.- 2003.- № 9.-P.25-8
12. Barbi M. CMV gB genotypes and outcome of vertical transmission: study on dried blood spots of congenitally infected babies/ M. Barbi, S. Binda, S. Caroppo et al// J Clin Virol.- 2001.- №21.-Vol 1.-P.75-9
13. Shepp D.H. A fifth human cytomegalovirus glycoprotein B genotype/ D.H. Shepp, M.E. Match, S.M. Lipson et al// Res Virol.- 1998.- Vol 149(2)- P.109-14
14. Grosjean J. Direct genotyping of cytomegalovirus envelope glycoproteins from toddler's saliva samples/ J. Grosjean, S. Hantz, S. Cotin et al// J Clin. Virol.- 2009.-№46(4).- P.43-8
15. de Vries J.J. Rapid genotyping of cytomegalovirus in dried blood spots by multiplex real-time PCR assays targeting the envelope glycoprotein gB and gH genes/ J.J. de Vries, E. Wessels, A.M. Korver // J. Clin Microbiol. -2012.-№50(2).- P.232-7
16. Chou S. W. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization related epitopes/ S. W. Chou, K. M. Dennison // J. Infect. Dis.-1991.-№163(6).-P.1229-1234.
17. Lisboa L.F. Analysis and clinical correlation of genetic variation in cytomegalovirus/ L.F. Lisboa, Y. Tong, D. Kumar et al// Transpl. Infect. Dis.- 2012.- №14(2).-P.132-40
18. Grosjean J. Direct genotyping of cytomegalovirus envelope glycoproteins from toddler's saliva samples/ J. Grosjean, S. Hantz, S. Cotin // J. Clin. Virol.- 2009.-№46.- Suppl 4.-P.43-48

## **К ВОПРОСУ О ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ДЛЯ НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Василенко Е.И., Курилова А.А., Ковтун Ю.С., Катунина Л.С.**

*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»*

*Роспотребнадзора, Ставрополь*

Непрерывное культивирование представляет собой производственный микробиологический процесс, при котором загрузка питательной среды и выгрузка продукта совмещены во времени. В непрерывных процессах культура микроорганизмов должна постоянно находиться в экспоненциальной фазе роста, что обеспечивается непрерывной подачей в биореактор свежей питательной среды с постоянной скоростью. Объем культуры поддерживается на постоянном уровне путем непрерывного отлива части культуральной жидкости, содержащей клетки и продукты их жизнедеятельности. При этом можно управлять действием любого фактора среды. Фундаментальным принципом непрерывных процессов служит равновесие между приростом биомассы за счет деления клеток и их убылью в результате разбавления свежей средой. Непрерывная система культивирования характеризуется более высокой однородностью выращенной культуры, что является одним из основных условий при приготовлении сывороток и вакцин [1; 2; 3].

Наиболее простым в технике исполнения и перспективным с точки зрения расширения возможностей управления процессом является мембранный биореактор, в котором развивающаяся популяция получает постоянную или циклическую подпитку субстратом через полупроницаемую мембрану, через нее же происходит постоянное удаление метаболитов. Сочетание ферментера с мембранным разделителем для удаления продуктов метаболизма бактерий увеличивает концентрацию клеток и продлевает длительность активной фазы роста за счет уменьшения ингибирующего эффекта [4].

Преимущество метода непрерывного культивирования состоит в стандартности условий проведения процесса, высокой производительности, возможности тонкого управления кинетикой роста популяции и изучения основных закономерностей прохождения во времени микробиологических процессов на клеточном уровне. Наряду с периодическим методом, непрерывное культивирование является наиболее перспективным и развитым, несмотря на большое число параметров, требующих контроля [1; 5; 6].

Первые работы отечественных и зарубежных ученых по глубинному культивированию, относящиеся на 1947-1953 годы, проводились со штаммом *Brucella abortus* 19 ВА с применением казеиново-грибной среды, триптически-казеиново-дрожжевого и печеночно-мясного бульонов, сепарированного молока с казеином, питательных сред на основе ферментативного гидролизата говяжьего мяса и сред, содержащих мясной пептон и дрожжевой экстракт [1].

Для культивирования чумного микроба вакцинного штамма EV в условиях аэрации и «подкормки» культуры в реакторе глюкозой, как основным источником углерода, успешно использовалась жидкая питательная среда на основе кислотного гидролизата казеина, гидролизата из сгустков крови и сухих кормовых дрожжей [7; 8; 9].

Для непрерывного культивирования штамма *Vibrio cholerae* 569В Инаба исследователями использовалась питательная среда из казеиновых аминокислот. Было установлено, что оптимальными условиями для экспрессии чужеродного адгезина CFA1 в клетках холерного вибриона являются культивирование на CFA-агаре в течение 24 ч и последующее выращивание в течение 18 ч при 37 °С в триптиказо-соевом бульоне. Был разработан режим глубинного культивирования холерных вибрионов с добавлением 0,2-0,3 % глюкозы и раствора аммиака в качестве регуляторов оптимальных значений pH [10].

L.T. Callahan с соавт. (1983) осуществляли глубинное культивирование штамма *V. cholerae* 569В Инаба в комплексной питательной среде из аминокислот с дробным добавлением глюкозы при переходе микробной популяции в экспоненциальную фазу роста, что позволило увеличить удельную скорость роста и сократить время генерации [11].

О.А. Волох с соавт. (2008) выращивали холерный вибрион в реакторе с 250 дм<sup>3</sup> бульона из ферментативного перевара казеина или Хоттингера с подкормкой глюкозой и аммиаком. Авторы указывают на необходимость использования при масштабированном культивировании богатых питательных сред, дополнительных источников углерода, контроля pH среды и времени культивирования [12].

Для культивирования холерных вибрионов были разработаны питательные среды на основе панкреатического перевара фибрина и автолизата пекарских дрожжей [13]. При непрерывном культивировании *V. cholerae* М-41 серовара Огава на питательной среде из фибрина в условиях аэрации и подкормки раствором глюкозы было получено  $158 \cdot 10^9$  м.к./мл биомассы [14; 15].

А.Я. Самуйленко с соавт. (2013) глубинным методом выращивали сальмонеллы и пастереллы на питательной среде, содержащей перевар Хоттингера (%): пептон – 0,5; натрий хлористый – 0,3; двузамещенный фосфат натрия – 0,5. Перед засевом в среду добавляли 0,1 % глюкозы в пересчете на сухое вещество в виде 40 % раствора [2].

Для глубинного культивирования *Lactobacillus paracasei* А.С. Дерунец с соавт. (1992) использовали питательную среду следующего состава (г/л): глюкоза – 110,0; дрожжевой экстракт (Merck VM983953813) – 15,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2,0; MgSO<sub>4</sub> – 0,1; MnSO<sub>4</sub> – 0,05. Подпитка в непрерывном режиме культивирования осуществлялась средой такого же состава, но с пониженным содержанием дрожжевого экстракта (5 г/л), при этом осуществляли автоматическую подтитровку 25 % раствором аммиака до значений кислотности среды 6,0-6,4 [6].

При непрерывном культивировании бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 было отмечено повышение биологической активности штамма-продуцента в типовом лабораторном ферментере (V=200 мл) на минеральной среде с формальдегидом (концентрация 2 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Концентрация растворенного кислорода поддерживалась на уровне 70-75% [16].

Для непрерывного культивирования *Rhodobacter sphaeroides* DBCΩ в режиме турбидостата использовалась среда Ормеруда при заданной оптической плотности 0,2. Для обеспечения анаэробных условий в реактор непрерывно подавали аргон (20 мл/мин) [17].

Для культивирования клона SFM4CHO («HyClone»), продуцента рекомбинантного фактора свертываемости крови, группой ученых предлагается вносить в базовую питательную среду 6 ммоль/л L-глутамина [18].

В работах последних лет зарубежными авторами для непрерывного культивирования каждого конкретного микроорганизма предлагается питательная среда определенного состава. Так, А. Wilming (2013) для непрерывного культивирования *B. Licheniformis* штамма γ-PGA, произво-

дящего протеазу, использовалась питательная среда, содержащая в 1 л: глюкозы – 20,0 г; MOPS-кислоты – 52,3 г (0,25 моль);  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  – 0,05 г;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0,53 мг;  $ZnCl_2$  – 0,26 мг;  $H_3BO_3$  – 0,01 мг;  $NiSO_4 \cdot 6H_2O$  – 0,66 мг;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  – 0,31 мг;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  – 0,65 мг;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 1,01 г;  $CaCl_2 \cdot H_2O$  – 0,026 г;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,05 г;  $(NH_4)_2SO_4$  – 7,0 г;  $K_2HPO_4$  – 3,4 г; цитрата натрия – 3,8 г; канамицина – 50 мг. Компоненты среды добавляли последовательно. Цитрат натрия был использован в качестве хелатирующего агента для предотвращения осаждения и сохранения беспрепятственной подачи в биореактор [19].

Для культивирования пневмококка серотипа 14 штамма 5287 группой ученых предложена питательная среда на основе кислотного гидролизата казеина и содержащая на 1 л (г): глюкозу – 20,0;  $K_2HPO_4$  – 5,0;  $NaHCO_3$  – 1,0; L-глутамин – 0,62; аспарагин – 0,1; холин – 0,01; и 2 мл раствора солей, составом (г/л):  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 250,0;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 2,5;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,4;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  – 0,18, а так же 10,0 мл HCl [20].

C. W. Kim (2014) предложено культивировать микроводоросли *Nannochloropsis gaditana* CCMF 526 в модифицированной среде F/2, содержащей в пять раз более высокую концентрацию нитрата натрия. Среда состоит из 30 г/л морской соли, помимо которой содержит:  $NaNO_3$  – 375,0 мг/л;  $NaH_2PO_4 \cdot 9H_2O$  – 5,0 мг/л;  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  – 3,15 мг/л;  $Na_2$ ЭДТА·2H<sub>2</sub>O – 4,36 мг/л;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  – 9,8 мкг/л;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  – 6,3 мкг/л;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 22,0 мкг/л;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  – 10,0 мкг/л;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  – 180,0 мкг/л; витамин B<sub>12</sub> – 0,5 мкг/л; биотин – 0,5 мкг/л; тиамин – 100,0 мкг/л [21].

Для фототропных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* KD131 D.-H. Kim с соавт. (2013) предложили культивирование при 30 ° C в модифицированном бульоне SISTROM, содержащем (на 1 л):  $(NH_4)_2SO_4$  – 4 ммоль, L-аспарагиновой кислоты – 0,3 ммоль и лактата – 20 ммоль [22].

*Rhodospiridium toruloides* культивировали в хемостате на питательной среде, содержащей (г/л): глюкозы – 18,0;  $(NH_4)_2SO_4$  – 5,0;  $KH_2PO_4$  – 1,0;  $Na_2HPO_4$  – 1,0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 1,5; дополненной 10 мл на литр раствором микроэлементов, (г/л):  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  – 4,0;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,55;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,10;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  – 0,076;  $H_2SO_4$  (18 M) – 0,1 мл, при ограничении концентраций глюкозы и сульфата аммония до 13,5 г/л и 5 г/л, соответственно [23].

*Chlorella pyrenoidosa* FACEB9 выращивали на синтетической питательной среде следующего состава (мг/л):  $NaNO_3$  – 250,0;  $KH_2PO_4$  – 175,0;  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  – 75,0; NaCl – 25,0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 75,0;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  – 25,0;  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  – 5,0;  $H_3BO_3$  – 2,86;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  – 1,81;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,22;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  – 0,079;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  – 0,39;  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  – 0,049 [24].

P. Feng с соавт. (2014) для культивирования *Scenedesmus obliquus* были предложены различные питательные среды: BG11, её модифицированный вариант – среда BG-11 ( $NaNO_3$  – 1 г/л,  $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$  – 0,06 г/л), F/2 и BBM [25].

S.-H. Но (2014) для выращивания микроводоросли *Desmodesmus* sp. F2 предложено использовать питательную среду, содержащую, (ммоль/л):  $NaNO_3$  – 4,4;  $CaCl_2$  – 0,17;  $MgSO_4$  – 0,3;  $K_2HPO_4$  – 0,22;  $KH_2PO_4$  – 0,65; NaCl – 0,43; а также витамины и минералы [26].

Рядом авторов для выращивания штамма ATCC *Clostridium acetobutylicum* 824 была предложена питательная среда следующего состава (на 1 л): NaCl – 0,01 г; ацетата аммония – 2,2 г;  $K_2HPO_4$  – 0,5 г;  $KH_2PO_4$  – 0,5 г; биотина – 0,01 мг; п-аминобензойной кислоты (RAVA) – 1 мг;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,2 г;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  – 0,01 г; цитрата  $NH_4Fe$  – 11,1 мг; глюкозы – 60 г. В дальнейшем состав среды был модифицирован, увеличено количество глюкозы и добавлен дрожжевой экстракт в количестве 3 г/л [27; 28].

Для выращивания культуры *Chlorella protothecoides* SAG 21-7b использовалась базовая питательная среда, содержащая (на 1 л):  $(NH_4)_2HPO_4$  – 0,1 г;  $K_2HPO_4$  – 0,2 г;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,5 г;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  – 0,3 г;  $(NH_4)_2SO_4$  (вместе с  $(NH_4)_2HPO_4$ ) – 1,5 г; витамин B<sub>1</sub> – 2,5 мг; витамин B<sub>12</sub> – 0,01 мг;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 16,8 мг;  $H_3BO_3$  – 14,4 мг;  $Na_2$ ЭДТА·2H<sub>2</sub>O – 20 г;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  – 1,57 мг;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 8,82 мг;  $MnCl_2 \cdot 2H_2O$  – 1,18 мг;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  – 1,19 мг;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0,54 мг; глюкозы – (16,6±0,7) г [29].

Из вышеизложенного следует, что крупномасштабное культивирование микроорганизмов в непрерывном режиме является современным и перспективным методом получения биомассы в промышленном производстве биологических препаратов. При этом для культивирования микро-

организмов используют ферментаторы различной емкости, оборудованные системой подачи и перемешивания, а также контрольно-измерительными приборами. При непрерывном культивировании микроорганизмов одновременно стремятся к увеличению выхода биомассы и сохранению биологических свойств бактерий. Отвечая основным питательным потребностям выращиваемых микроорганизмов, применяемые для непрерывного культивирования питательные среды имеют, как правило, сложный состав, включая большое число компонентов. Практически в состав каждой из используемых сред входит глюкоза, зачастую авторы считают необходимым обогащение витаминами и минералами. Таким образом, сложность питательных сред можно отнести к особенностям процессов непрерывного культивирования микроорганизмов. Оптимизация же состава ферментационных и посевных сред относится к основным направлениям оптимизации процессов непрерывного культивирования.

#### Литература:

1. Акимов, Е.К. Микробиологические подходы к процессам культивирования микроорганизмов / Е.К. Акимов, А.К. Галиуллин // Ученые записки казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. - № 216. – С. 15-20.
2. Влияние способов культивирования на выход биомассы и качество вакцин для ветеринарной медицины / А.Я. Самуйленко, А.А. Раевский, И.В. Павленко [и др.] // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. - № 9. – С. 165-170.
3. A study on large scale cultivation of *Microcystis aeruginosa* under open raceway pond at semi-continuous mode for biodiesel production / V. Ashokkumar, E. Agila, Z. Salam [et al.] // Bioresource Technology. – 2014. - № 18. – P. 186-193.
4. Boyaval, P. Propionic acid production in a membrane bioreactor / P. Boyaval, Ch. Corre, M.-N. Mades // Enzyme and Microbial Technology. – 1994. - № 10. – P. 156-163.
5. Very high density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE bioreactor. Part I. Effect of the cell density on the process / M.F. Clincke, C. Molleryd, Y. Zhang [et al.] // Biotechnology. – 2013. № 29. – P. 754-767.
6. Дерунец, А.С. Высокоплотностное непрерывное культивирование молочнокислых бактерий в мембранном биореакторе / А.С. Дерунец, В.Д. Смирнова, А.В. Белодед // Известия высших учебных заведений. Пищевая промышленность. – 1992. № 1. – С. 11-12.
7. Шпилевая, Э.Г. Культивирование чумного микроба аппаратным способом на агаре из сухих кормовых дрожжей: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Шпилевая Элла Георгиевна. – Ставрополь, – 1983. – 220 с.
8. Тинкер, А.И. К вопросу об оптимальных условиях лиофильного высушивания живой противочумной вакцины из штамма EV выращенной на твердых питательных средах: дис. ... канд. мед. наук / Тинкер А.И. – Ставрополь, – 1964. – 186 с.
9. Тинкер, А.И. Влияние сублимационного (лиофильного) высушивания на штамм EV чумного микроба: дис. ... док. мед. наук / Тинкер А.И. – Ставрополь, – 1971. – 351 с.
10. Использование рекомбинантных штаммов для одновременного получения нескольких очищенных основных протективных антигенов холерного вибриона / Т.Л. Захарова, С.П. Заднова, Л.Ф. Ливанова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. - № 2(100). – С. 68-71.
11. Callahan, L.T. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence III / L.T. Callahan, S.H. Richardson // Infect. Immunology. – 1983. - № 7(4). – P. 67-72.
12. Изучение биокинетических особенностей и оптимизация условий культивирования штаммов холерного вибриона – продуцентов протективных антигенов, перспективных для внедрения в производство / О.А. Волох, И.А. Шепелёв, С.П. Заднова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2008. - № 1(95). – С. 52-55.
13. Разработка питательных сред на основе непищевого сырья для глубинного культивирования штаммов холерного вибриона / А.К. Никифоров, М.В. Антонычева, О.А. Волох [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. - № 1. – С. 85-88.

14. Пат. 2425866 Российская Федерация, С12N1/20. Питательная среда для глубинного культивирования холерного вибриона / Антонычева М.В., Нижегородцев С.А., Еремин С.А. [и др.]; заявитель и патентообладатель ФКУЗ Российский науч.-исслед. противочумный ин-т «Микроб» Роспотребнадзора. – № 2010121691/10 ; заявл. 27.05.2010 ; опубл. 10.08.2011, Бюл. № 22.
15. Методы и технологии культивирования холерного вибриона (обзор) / С.А. Еремин, Ю.А. Алешина, А.В. Комиссаров [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. - № 4. – С. 95-101.
16. Смолягина, Т.А. Биологическая активность бактерий *Pseudomonas sp.* В-6798 в условиях периодического и непрерывного режимов культивирования / Т.А. Смолягина, О.М. Минаева, Е.Е. Акимова // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2011. - № 3. – С. 67-70.
17. Ельцова, З.А. Сравнительная характеристика штаммов с редуцированным фотосинтетическим аппаратом пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* при непрерывном культивировании / З.А. Ельцова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. - № 3. – 621 с.
18. Разработка процесса непрерывного культивирования клеток продуцентов CHO – продуцентов рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII / А.Н. Морозов, Г.Д. Сидельников, И.М. Емельянов [и др.] // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. – 2015. - № 7. – С. 26-31.
19. Metabolic studies of  $\gamma$ -polyglutamic acid production in *Bacillus licheniformis* by small-scale continuous cultivations / A. Wilming, J. Begemann, S. Kuhne [et al.] // Biochemical Engineering Journal. – 2013. - №15. – P. 29-37.
20. Improved capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 using continuous cultivation / V.Gogola-Kolling, R. Zanardo, T. Carmo [et al.] // Biochemical Engineering Journal. – 2014. - № 15. – P. 16-22.
21. Effect of monochromatic illumination on lipid accumulation of *Nannochloropsis gaditana* under continuous cultivation / C. Kim, M. Sung, K. Nam [et al.] // Bioresource Technology. – 2014. - №10. – P. 30-35.
22. Continuous cultivation of photosynthetic bacteria for fatty acids production / D. Kim, J. Lee, Y. Hwang [et al.] // Bioresource Technology. – 2013. - № 15. – P. 277-282.
23. Kinetics continuous cultivation of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* / H. Shen, Z. Gong, X. Yang [et al.] // Journal of Biotechnology. – 2013. - №17. – P. 85-89.
24. Continuous cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* using anaerobic digested starch processing wastewater in the outdoors / H. Chu, X. Tan, Y. Zhang [et al.] // Bioresource Technology. – 2015. - № 11. – P. 40-48.
25. Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production / P. Feng, K. Yang, Z. Xu [et al.] // Bioresource Technology. – 2014. - № 16. – P. 406-414.
26. Ho, S. Exploring the high lipid production potential of a thermotolerant microalga using statistical optimization and semi-continuous cultivation / S. Ho, C. Chen, Y. Lai, W. Lu, J. Chang // Bioresource Technology. – 2014. - № 8. – P. 128-135.
27. Integrated bioprocess for long-term continuous cultivation of *Clostridium acetobutylicum* coupled to pervaporation with PDMS composite membranes / W.Hecke, P.Vandezande, S. Claes [et al.] // Bioresource Technology. – 2012. - № 6. – P. 368-377.
28. Hecke, W. Pervaporative recovery of ABE during continuous cultivation: Enhancement of performance / W. Hecke, T. Hofmann, H. Wever // Bioresource Technology. – 2013. - № 3. – P. 421-429.
29. Wang, Y. Mixotrophic continuous flow cultivation of *Chlorella protothecoides* for lipids / Y. Wang, H. Rischer, N. Eriksen, M. Wiebe // Bioresource Technology. – 2013. - № 10. – P. 608-614.

## ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Галичева А.Л.  
ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,  
Ростов-на-Дону

В период седьмой пандемии холеры при широком использовании специфических холерных фагов в идентификации представителей вида *Vibrio cholerae*, определении вирулентности и фаго-типа различные исследователи столкнулись с фактом возникновения таких форм бактерий, когда при сохранении признаков вида и рода они становились устойчивыми к фагу.

Явление фагоустойчивости микробов теснейшим образом переплетается с лизогенностью. Несомненно, что во многих случаях пребывание микробов во внешней среде сопровождается их глубокой изменчивостью, возникающей под действием окружающей микрофлоры и бактериофагов [1].

В то же время иметь в данный период эффективный фаг для идентификации циркулирующих штаммов холерных вибрионов весьма важно в оценке изменчивости холерного вибриона и определения их роли, учитывая то обстоятельство, что общей закономерностью является неразрывная связь эволюции паразита и его хозяина [2]. Многолетние наблюдения различных исследователей позволили выяснить причины фагорезистентности бактерий и констатировать факт того, что утрата чувствительности холерного вибриона к гомологичному бактериофагу обеспечивает бактериальной клетке экологическую устойчивость на пути эволюции. Показано, что угнетение физиологических функций или нарушение клеточного метаболизма и условий внутриклеточного развития фага являются одной из причин возникновения их фагорезистентности [1,3].

Специфический исход взаимодействия фаг-бактерия контролируется наличием гомологии зон рецепции фага и клетки, наличием и соответствующей функциональной активностью у бактерии ферментативных систем, синтезирующих элементы паразита, под контролем фаговой ДНК, а также существованием у клетки систем рестрикции-модификации различной специфичности [4, 5]. Нарушение нормального функционирования данных систем взаимодействия фага и бактериальной клетки может быть одной из причин возникновения фагорезистентных вариантов среди обнаруживаемых из объектов внешней среды штаммов *Vibrio cholerae El Tor* [3].

Так же одной из причин снижения или потери чувствительности к холерным фагам может являться носительство гомоиммунных умеренных фагов, которые обуславливают феномен несовместимости, заключающийся, как правило, в том, что бактерии приобретают иммунитет к родственному типовому бактериофагу [4, 6].

Естественная коэволюция бактерий и фагов может облегчить получение новых литических фагов против фагоустойчивых бактерий, появляющихся в результате действия других фагов или естественных изменений в бактериальных популяциях [4].

Для идентификации холерных вибрионов прочно вошёл в практику метод определения фагочувствительности изучаемых культур с помощью холерных диагностических фагов. Но в настоящее время появилось большое число резистентных штаммов к диагностическим препаратам (до 77,4%).

Поэтому в центре внимания специалистов Роспотребнадзора оказалась проблема совершенствования диагностического препарата холерного фага, эффективно лизирующего холерные штаммы при проведении идентификации патогенного микроба.

**Цель работы:** отбор диагностических фагов для идентификации холерных вибрионов.

В работе использовано 175 музейных, устойчивых к диагностическим холерным фагам штаммов *Vibrio cholerae El Tor*, выделенных в 2001-2015 гг. из различных источников, а также 30 штаммов *Vibrio cholerae Classical*. Все изученные штаммы различались генетическими свойствами:  $ctx^+tcp^+$ ,  $ctx^-tcp^+$ ,  $ctx^-tcp^-$ .

Для изучения и сохранения биологического разнообразия бактериофагов, а также для выполнения научных исследований по проблеме «Холера и патогенные вибрионы» в Ростовском-на-Дону противочумном институте собрана коллекция холерных фагов разного происхождения. Из данной коллекции изучены 25 холерных фагов по чувствительности к отобраным штаммам. Критерием отбора фагов является лизис фагоустойчивых штаммов холерных вибрионов Эль Тор, выделенных в различные годы от людей и из внешней среды. Изучение свойств фагов проводили общепринятыми методами [7].

Питательные среды для экспериментов включали бульон и 0,7%, 1,5% агар Мартена (рН 7,6 – 7,8).

При отборе холерного фага для диагностики возбудителя холеры мы учитывали следующие показатели: максимально высокую репродуктивную активность в отношении вибрионов Эль Тор; специфичность литического действия; степень лизиса гомологичных бактерий, продолжительность культивирования, скорость размножения, посевные дозы бактерий и фагов.

В результате проведенной работы были отобраны четыре холерных бактериофага, лизирующие холерные вибрионы, устойчивые к коммерческим диагностическим фагам. Изучаемые фаги в цельном и в разведении наносили на газон холерных культур. Предлагаемые бактериофаги имеют различный спектр литической активности в отношении холерных вибрионов Эль Тор и Classical. Диапазон литической активности у фагов составил: у фага №1 – 57,5%, фага №6 – 64,6%, фага №7 – 66,3%, фага «М» – 83,3%. Данные фаги в процессе исследования образовали четыре варианта лизиса (таб. 1).

Таблица.1

Варианты лизиса штаммов *V. cholerae* O1 холерными бактериофагами

Микроорганизмы	Холерные бактериофаги			
	№6	«М»	№1	№7
<i>V. cholerae</i> O1 биовара <i>Classical</i>	+(-)	+	-	-
<i>V. cholerae</i> O1 биовара <i>El Tor</i>	+(-)	-	+	+
	+(-)	-	+	-
	+(-)	-	-	+
<i>V. cholerae</i> O1 двух биоваров	+	-	-	-

Примечание: «+» - наличие лизиса, «-» - отсутствие лизиса.

В процессе изучения было установлено, что 37 штаммов из 174 приобрели чувствительность к фагу эльтор в процессе хранения. Из числа взятых штаммов 20 культур (11%) сохранили устойчивость ко всем фагам.

По данным электронно-микроскопического исследования новые холерные бактериофаги относились по морфологии корпускул: фаги №1, №6 и фаг «М» к III морфогруппе [8] и типу С [9] семейства Podoviridae; фаг № 7 к V морфогруппе [8] и типу А [9] семейства Myoviridae.

Специфичность фагов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, которые не лизировали испытуемые фаги.

При изучении действия инактивирующих агентов – хлороформа и повышенной температуры было установлено, что к действию хлороформа холерные фаги устойчивы и инактивировались при температуре 65-70° С в течении 30 мин.

Попытки использовать данные холерные фаги в различных вариантах смесей не были успешными, так как происходило снижение диапазона литической активности и титров фа-

гочастиц до  $10^5$ - $10^7$  БОЕ/мл, в то время как у монофагов титры сохранялись на уровне  $10^8$ - $10^{10}$  БОЕ/мл.

Одним из важных моментов в технологии изготовления диагностических препаратов являются используемые при этом тест-штаммы. До настоящего времени для производства диагностических фагов использовался токсигенный индикаторный штамм *Vibrio cholerae El Tor 75*. Для размножения и контроля новых рас диагностических бактериофагов необходимо было найти новые авирулентные тест-штаммы. Одним из наиболее перспективных тест-штаммов для размножения новых рас диагностических холерных бактериофагов мы использовали нетоксигенную культуру *Vibrio cholerae El Tor 19546*, которая была депонирована в ГКПБ «Микроб» под № КМ-276.

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что изученные холерные фаги, обладающие избирательной литической активностью, могут быть применены для диагностики фагоустойчивых штаммов холерных вибрионов. Актуальность использования метода фаговой диагностики заключается в том, что он исключает применение дорогостоящей аппаратуры и большие материальные затраты. Техническая простота и доступность отличают его и позволяют в кратчайший срок (12-18 часов) получить ответ.

Литература:

1. Ломов Ю.М., Сомова А.Г., Кудрякова Т.А. Холерные фаги. Ростов-на-Дону; 1990. 159 с.
2. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Гаевская Н.Е., Качкина Г.В., Кругликов В.Д., Зубкова Д.А., Ускова Н.Н., Парагова М.С. Характеристика холерных фагов, выделенных из поверхностных водоёмов и стоков г. Ростова-на-Дону в ходе мониторинга с 2008 по 2012 гг. Холера и патогенные для человека вибрионы. Ростов-на-Дону, 2013; 26: 168-172.
3. Овчинникова М.М., Аленкина Т.В., Коровкина Г.И., Грачёва И.В. Изучение некоторых причин фагорезистентности эпидемически неопасных штаммов *V. cholerae eltor* к бактериофагу диагностическому холерному *ctx*<sup>+</sup>. Холера и патогенные для человека вибрионы. Ростов-на-Дону, 2010; 23: 62-66.
4. Labrie S.J., Samson J., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol.* 2010 May; 8(5): 317-27.
5. Tock M.R., Dryden DT. The biology of restriction and anti- restriction. *Curr Opin Microbiol.* 2005 Aug; 8 (4): 466-72
6. Каттер Э., Сулаквелидзе А. Бактериофаги: биология и практическое применение / Пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. Москва: науч. мир, 2012. 636 с.
7. Адамс М. Бактериофаги: Пер. с англ. – М., 1961. – 522 с.
8. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. – М.: Наука, 1968. –170 с.
9. Ackerman H.B. // *Microbiol. Sci.* – 1987. – Vol.4, №17. – P.210-214.

## **РАЗРАБОТКА ПРОГРАММЫ ДЛЯ ЭВМ ДЛЯ РАСЧЕТА РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА НА БЕЛЫХ МЫШАХ**

**Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Савицкая Л.В., Лобовикова О.А.,  
Никифоров А.К., Гаврилова Ю.К.**  
ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт  
«Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

В настоящее время при производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина уровень активности антирабических сывороток и готового препарата определяют *in vivo* в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах [1]. Реакция нейтрализации на белых мышах является «золотым стандартом» определения активности титра специфических антител в антирабической сыворотке. Данный метод основан на нейтрализации постоянной дозы предварительно протитрованного инфицирующего вируса бешенства рядом последовательных раз-

ведений исследуемой сыворотки или иммуноглобулина. Для определения  $LD_{50}$  вируса мышам вводят интрацеребрально по 0,03 мл суспензии вируса; каждое разведение вводят группе из шести животных. Как правило, используют пять разведений иммуноглобулина или сыворотки. Регистрируют число мышей, погибших в период между пятым и четырнадцатым днем после заражения. Расчет титра антител и  $LD_{50}$  вируса проводят по методу Рида и Менча [1]. Метод Рида и Менча основан на логической предпосылке, что животное, погибшее при заражении каким-либо разведением вируса, погибнет и при заражении любым более низким разведением. Анализ результатов по методу Рида и Менча предполагает проведение достаточно объемной статистической обработки: определение значений кумулятивных данных, процента летальности, исходного разведения и эффективной дозы.

Целью работы явилась разработка программы для ЭВМ, которая могла бы автоматизировать, ускорить и упростить вычисление титра специфических антител антирабического иммуноглобулина, а также сократить возможное количество ошибок при вычислении.

Анализ имеющихся компьютерных программ, используемых для статистической обработки данных, показал отсутствие доступного программного обеспечения, обеспечивающего автоматическое определение эффективной или полуметальной дозы. При этом программа должна обеспечивать статистическую обработку результатов реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышях, осуществляемой согласно требованиям нормативной документации на иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий. Программа должна быть предназначена для использования в операционной системе Windows 2000-XP на компьютерах платформы IBM PC и не требовать дополнительной установки.

Разработанная программа для расчета результатов реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышях полностью соответствует указанным задачам. Программа написана на языке программирования Delphi и представляет собой скомпилированный файл с расширением \*.exe размером 430 KB. Программа не требует предварительной установки, имеет стандартный оконный интерфейс (рис.1).

Рис.1. Интерфейс программы для расчета результатов реакции нейтрализации на белых мышях по методу Рида и Менча.

Окно программы условно разделено на четыре части. Первая часть предназначена для ввода исходных данных, необходимых для определения титра антирабического иммуноглобулина: разведения препарата (осуществляется ввод обратных значений титров), количества выживших и павших мышей в каждой группе исследуемого разведения. Вторая часть аналогична первой и служит для ввода данных, необходимых для определения активности вирусодержащей жидкости. Расчет вводимых данных осуществляется нажатием соответствующих кнопок, расположенных в нижней части интерфейса программы. Нажатие одной кнопки вычисления, например, титра антител обеспечивает проведение вычисления кумулятивных данных, процента летальности и в завершение выдает результат в виде обратного значения титра антител. Предусмотрен раздел для вычисления активности специфических антител в международных единицах, для этого следует указать обратное значение титра и количество международных единиц для стандартного образца специфической активности. Последняя часть интерфейса программы необходима для расчета рабочего разведения вируса перед постановкой реакции нейтрализации. Таким образом, программа упрощает работу исследователя не только после получения результатов, но и в ходе планирования эксперимента.

Литература:

1. Laboratory techniques in rabies, 4th edition/ edited by Meslin F.-X., Kaplan M., Koprowski H. – Geneva: WHO, 1996. – 476 p.

## **МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ ПЕРОКСИДАЗНЫЕ КОНЬЮГАТЫ И МЕТОД ПРЯМОГО DOT-ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В ДИАГНОСТИКЕ ХОЛЕРЫ**

**Евдокимова В. В., Алексеева Л. П.**

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,  
Ростов-на-Дону*

В иммунодиагностике особо опасных инфекций современным направлением является использование тест-систем с визуальным учетом результатов. В качестве основы для изготовления иммунологических тестов, предназначенных для обнаружения антигена, наиболее стандартизованными и универсальными являются моноклональные антитела (МКА), которые отличаются высокой специфичностью. К числу чувствительных и наглядных методов детекции холерного вибриона и его факторов вирулентности относится твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) и его вариант на нитроцеллюлозной мембране - dot-ИФА. К настоящему времени в нашей стране разработан целый ряд экспериментальных диагностикумов, предназначенных для выявления холерного вибриона и его факторов вирулентности иммуноферментными методами [1-5], но в лабораторной практике они не используются. Прямой иммуноферментный анализ является наиболее перспективным методом, т.к. за короткий промежуток времени возможно обнаружить возбудителя холеры в исследуемой пробе. Метод dot-ИФА позволяет в одной постановке на небольшом участке мембраны исследовать большое количество проб.

В Ростовском-на-Дону противочумном институте получены экспериментальные серии пероксидазных конъюгатов на основе видоспецифических моноклональных антител (МКА), направленных к эпитопам О-полисахарида холерных вибрионов О1серогруппы (ПХ-МКА О1) и соответственно серогруппы О139 (ПХ-МКА О139). Моноклональные конъюгаты показали в dot-ИФА высокую чувствительность порядка 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>м.кл./мл, и строгую специфичность в отношении штаммов *V. cholerae* О1, *V. cholerae* О139 при отсутствии перекрестных реакций с представителями близкородственных и гетерологичных микроорганизмов [6]. Цель данной работы – подобрать оптимальный режим постановки dot-ИФА с применением моноклональных пероксидазных конъюгатов для выявления холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп как в стационарных, так и в полевых условиях без приборного обеспечения.

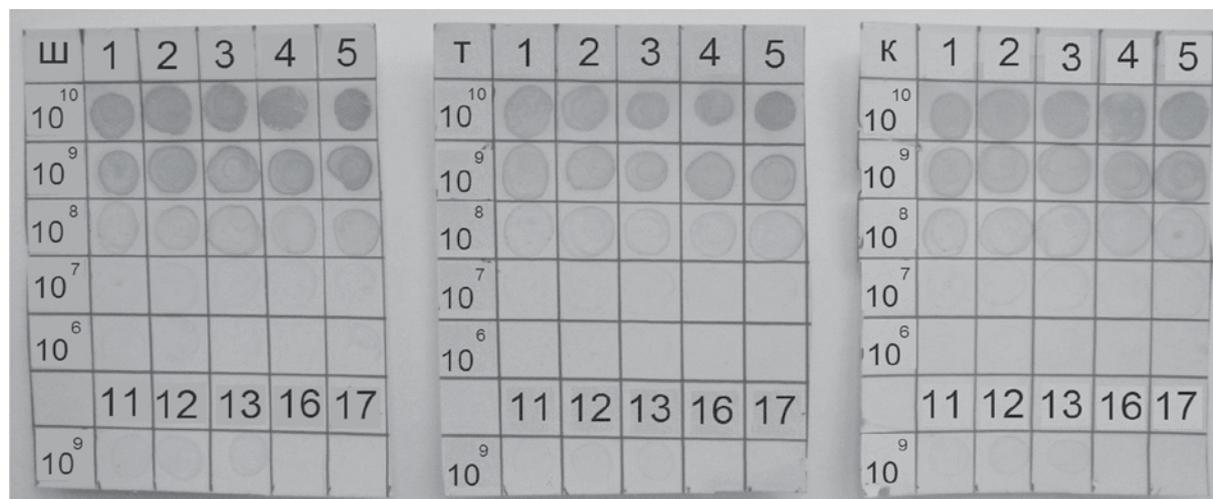
Материалы и методы. В работе использовали штаммы возбудителя холеры (*V. cholerae* O1 - 5 шт., *V. cholerae* O139 – 5 шт.) и близкородственных микроорганизмов (*E. coli* – 1 шт., *Aeromonas* – 1 шт., *V. cholerae* не O1/не O139 – 1шт), полученные из музея живых культур. Бактериальные взвеси обеззараживали кипячением в течение 30 минут с последующей проверкой на специфическую стерильность. Источником иммуноглобулинов служили культуральные жидкости (КЖ) гибридомы F8G12 (патент № 2425874) [7], продуцирующей МКА к О-антигену *V. cholerae* O1, и гибридомы 3E4 (патент № 2425875) [8], продуцирующей МКА к О-полисахариду *V. cholerae* O139. МКА были накоплены *in vitro* в виде культуральных жидкостей, из которых выделяли иммуноглобулиновую фракцию преципитацией сульфатом аммония [9, 10]. Конъюгацию очищенных иммуноглобулинов с пероксидазой хрена ( $RZ > 3$ , акт  $> 250$  ед/мг, ДИА-М) проводили по методу Nakane P.K. [11] в соотношении 2:1 соответственно. Для постановки dot-ИФА по стандартной методике [12] использовали нитроцеллулозную мембрану (НЦМ) с диаметром пор 0,45 мкм (Bio-Rad). Все манипуляции с мембранами проводили с помощью анатомического пинцета, не касаясь ее руками.

**Результаты и обсуждение.** Основная задача исследования заключалась в подборе оптимального режима постановки dot-ИФА, а именно - сравнение различных значений температуры и времени инкубации антигена с экспериментальными препаратами пероксидазных конъюгатов. Мембрану сенсибилизировали антигеном в объеме 2 мкл на точку из бактериальных взвесей следующих концентраций: 1010, 109, 108, 107, 106 мк. кл./мл. Блокирование свободных сайтов проводили в термостате (37°C), при комнатной температуре (20-25°C) в стационарных условиях и на шейкере в течение 30 мин. Конъюгаты МКА-O1 и МКА-O139 использовали в рабочих разведениях, которые устанавливали в предварительных опытах. Мембрану погружали в раствор конъюгата и выдерживали при разных режимах (комн. t° - 20 мин., термостат 37°C – 20 мин., шейкер/комн. t° - 20 мин.; комн. t° - 40 мин., термостат 37°C – 40 мин., шейкер/комн. t° - 40 мин.), затем отмывали. Оценку реакции проводили визуально по интенсивности окрашивания точек-дотов. Результат считали отрицательным, если на месте нанесения антигена пятно не проявляется (может проявляться незначительное фоновое светло-бежевое окрашивание). Результат считали положительным, если на месте нанесения антигена появляется коричневое пятно с четким контуром. При отработке режима постановки dot-ИФА установили, что для специфического связывания сенсибилизированного антигена с пероксидазными конъюгатами недостаточно 20 минут инкубации. Выявление холерных вибрионов возможно только при инкубации антигена с мечеными МКА в течение 40 минут. Однако, для выявления *V. cholerae* O1 с помощью моноклонального пероксидазного конъюгата (ПХ-МКА O1) применимы все три варианта 40-минутной инкубации (рисунок 1), тогда как для обнаружения штаммов *V. cholerae* O139 оптимальным является вариант инкубации мембран в рабочем растворе пероксидазного конъюгата (ПХ-МКА O139) - 40 минут на шейкере при комнатной температуре (20-25°C) (рисунок 2).

Из представленных результатов следует, что чувствительность метода dot-ИФА остается на уровне  $2 \cdot 10^6$  м.кл./точку для ПХ-МКА O1 при указанных режимах инкубации с антигеном (комн. t° - 20 мин., термостат 37°C – 20 мин., шейкер/комн. t° - 20 мин.; комн. t° - 40 мин., термостат 37°C – 40 мин., шейкер/комн. t° - 40 мин.) и для ПХ-МКА O139 при режиме - шейкер/комн. t° - 40 мин.

Таким образом, результаты экспериментов позволяют говорить о перспективности dot-иммуноферментного анализа как экспресс-метода для идентификации и дифференциации холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп. Применение моноклональных пероксидазных конъюгатов обеспечивает высокую специфичность метода, исключает возможность перекрестных реакций, необходимость использования дорогостоящих антивидовых конъюгатов. Прямой метод dot-ИФА на мембране сокращает время анализа до 70-90 минут. Визуальная оценка результатов, простота и экономичность данного теста обуславливают его практическую значимость и возможность применения для диагностики возбудителя холеры в полевых условиях при исследовании большого количества штаммов. На основании полученных результатов можно говорить о целесообразности внедрения препаратов в лабораторную практику как в стационарных, так и в полевых услови-

ях. Преимущества прямого варианта dot-ИФА иммуноферментного анализа позволяют использовать его в качестве альтернативы или в дополнение к другим диагностическим экспресс-тестам детекции холерных вибрионов, а также в научных целях.

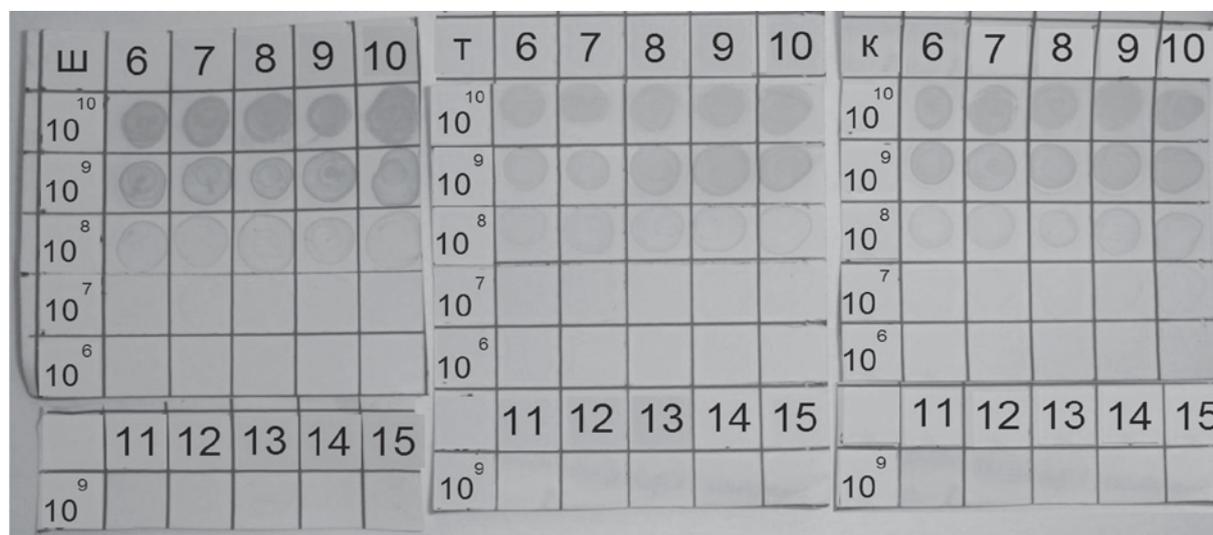


А

Б

В

Рис. 1. DOT-ИФА с ПХ-МКА O1: А – инкубация антигена с пероксидазным конъюгатом в течение 40 минут при комнатной температуре (20-25°C) на шейкере; Б – инкубация антигена с пероксидазным конъюгатом в течение 40 минут в термостате при 37°C; В – инкубация антигена с пероксидазным конъюгатом в течение 40 минут при комнатной температуре (20-25°C). 1-5 – штаммы *V. cholera* O1: 18895, 18252, 18963, 18512, 18826. 11- *E.coli*, 12 – *Aeromonas*, 13 – *V. cholera* не O1/не O139, 16-17 – штаммы *V. cholera* O139.



А

Б

В

Рис. 2. DOT-ИФА с ПХ-МКА O139: А – инкубация антигена с пероксидазным конъюгатом в течение 40 минут при комнатной температуре (20-25°C) на шейкере; Б – инкубация антигена с пероксидазным конъюгатом в течение 40 минут в термостате при 37°C; В – инкубация антигена с пероксидазным конъюгатом в течение 40 минут при комнатной температуре (20-25°C). 1-5 – штаммы *V. cholera* O139: 16485, 16131, 16070, 17916, 16488. 11- *E.coli*, 12 – *Aeromonas*, 13 – *V. cholera* не O1/не O139, 16-17 – штаммы *V. cholera* O1.

Продолжение исследований предусматривает широкую апробацию методом dot-ИФА экспериментальных (лиофильно высушенных) образцов моноклональных пероксидазных конъюгатов в процессе мониторинговых исследований на холеру и при поступлении культур в институт на идентификацию.

Литература:

1. Терешкина Н.Е. Изучение капсульных и бескапсульных форм *Vibrio cholerae* O139 с использованием поли- и моноклональных антител: автореф. дис. канд. мед. наук : 03.00.07. Терешкина Наталия Евгеньевна. Саратов; 2004; 23 с.
2. Сырова Н.А. Получение, характеристика и биотехнологические аспекты применения поли- и моноклональных антител к антигенам *Vibrio cholerae* O1 Инаба и Огава: автореф. дис...канд. биол. наук : 03.00.07, 03.00.23. Сырова Наталия Алексеевна. Саратов; 2005; 23 с.
3. Федорова В.А., Терешкина Н.Е., Сырова Н.А. и др. Конструирование экспериментальных иммуноферментных тест-систем с использованием моноклональных антител к *V. cholerae* O139. В кн.: Матер. IX съезда Всерос. науч.-практ. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. М.; 2007; Т.3: 89.
4. Маркина О.В. Изучение токсинопродуцирующей способности штаммов *Vibrio cholerae* O1 и *Vibrio cholerae* O139 с помощью иммуноферментного анализа и культуры клеток: автореф. дис...канд. биол. наук: 03.00.07. Маркина Ольга Владимировна. Ставрополь; 2008; 22 с.
5. Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Терешкина Н.Е. и др. Получение и
6. применение моноклональных антител для обнаружения холерного токсина. В кн.: Матер. XI Межгос. науч.-практ. конф. «Соврем. технологии в совершенствов. мер предупр. и отв. действий на ЧС в области обществ. здравоохран. сан.-эпид. характера». Саратов; 2012; 162 – 164.
7. Алексеева Л.П., Козлова Г.А., Маркина О.В., Кретенчук О.Ф., Яговкин М.Э., Бурша О.С. Использование моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации холерных вибрионов O1, O139 в реакции дот-иммуноанализа. Клиническая лабораторная диагностика. 2013; 3: 26 – 29.
8. Алексеева Л.П., Евдокимова В.В., Фатеева О.Ф. Штамм культивируемых гибридных клеток животных *Mus. Musculus* L - продуцент моноклональных антител, специфичных к о-антигену холерных вибрионов O1 серогруппы. Патент РФ № 2425874, 2011.
9. Алексеева Л.П., Маркина О.В., Фатеева О.Ф., Яговкин М.Э. Штамм культивируемых гибридных клеток животных *Mus. Musculus* L - продуцент моноклональных антител, специфичных к ЛПС холерных вибрионов O139 серогруппы. Патент РФ № 2425875, 2011 г.
10. Антитела: Методы. В 2 кн. Кн.1 /Пер. с англ.; Под ред. Д. Кэтти. – М.: Мир; 1991; 287 с.
11. Reik L.M., Maines S.L. A simple non-chromatographic purification procedure for monoclonal antibodies. *J. Immunol. Meth.* 1987; 100: 123.
12. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem Cytochem.* 1974; 22: 1084-1091.
13. Bode L., Beutin L., Kuhlner H. Nitrocellulose-enzyme-linked immunosorbent assay (NC-ELISA) – a sensitive technique for the rapid visual detection of both viral antigens and antibodies. *J. Virol. Methods.* 1984; 8(1-2): 111- 121.

## ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ АНТИГЕНОВ БАКТЕРИОФАГОВ Т4-ТИПА - КОМПОНЕНТОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

**Зимин А.А.<sup>1</sup>, Ашина Н.В.<sup>1</sup>, Назипова Н.Н.<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>-ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Московская область; <sup>2</sup>-ФГБУН Институт математических проблем биологии РАН, Пущино, Московская область*

Бактериофаг Т4 и родственные ему бактериофаги являются не только классическими объектами молекулярной биологии, но и составной частью антибактериальных препаратов для фаговой терапии в медицине и ветеринарии. Одним из существенных для применения в терапии параметров является антигенность и иммуногенность бактериофагов. Типичным представителем в фаговых препаратах для антибактериальной терапии являются бактериофаги Т4 типа. Антигенность этих бактериофагов определяется их основным антигеном - белком, продуктом гена нос. Исследование эволюции поверхности частиц бактериофагов важная задача, как с точки зрения фундаментальной науки, так и исходя из нужд медицинской и ветеринарной практики.

В настоящее время определено 1864 геномов бактериофагов (данные на 27.02.2016 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Анализ этих геномов показал большое влияние горизонтального переноса генов (ГПГ) между фаговыми геномами на их происхождение и эволюцию. Одновременно в фаговых геномах обнаруживаются гены и генетические кластеры, происходящие из бактериальных геномов бактерий-жертв бактериофагов. Учитывая широкий охват таксонов бактерий-жертв трудно себе представить вариабельность всей совокупности фаговых геномов - она ничем не ограничена. Мозаичность геномов бактериофагов может отражаться и в гипервариабельности отдельных фаговых белков, которые могут содержать домены, доставшиеся им за счет ГПГ. Такая ситуация показана для поверхностных доменов структурных белков бактериофагов, которые часто участвуют в связывании и деградации углеводов. В большинстве случаев функция подобных белков пока не показана. Недавно было обнаружено, что у 25% белков вирионов представителей отряда Caudovirales или хвостатых бактериофагов обнаруживаются Ig-подобные домены.

Одним из наиболее известных и наиболее изученных подобных примеров является белок Нос бактериофага Т4, который прикрепляется к поверхности капсида фага Т4 в капсомере, образованном экспонируемыми доменами белка 23 бактериофага. Данные структуры образуют розетку из шести одинаковых субъединиц, в центре которой после завершения морфогенеза головки и присоединяется основной антиген фага – белок Нос. Некоторые из гипервариабельных Ig-подобных белков могут быть его гомологами. Он определяет высокую иммуногенность и антигенность внешней части капсида. Предполагается, что он определяет связывание фага Т4 с поверхностью кишечника макроорганизма, а также, возможно, участвует во взаимодействии с поверхностью кишечной палочки (15). Белок Нос также используется для фагового дисплея, то есть для создания связывания с новой специфичностью для применения в биотехнологии и медицине, в первую очередь для получения искусственных вакцин нового поколения.

Бактериофаг Т4 – большой вирус, инфицирующий *Escherichia coli* относится к подсемейству Tevenvirinae (Teequatrovirinae) семейства Myoviridae отряда Caudovirales (12). Он состоит из вытянутой икосаэдрической головки и сокращающегося отростка, заканчивающегося базальной пластинкой, к которой присоединены шесть длинных фибрилл. Головка (капсид), содержащая внутри себя геномную двухцепочечную ДНК длиной 171000 пар нуклеотидов (п.н.), построена из трех белков продуктов генов 20, 23 и 24.

Шесть белков 23 образуют основные капсомеры, из которых сформированы 20 граней икосаэдра, 11 вершин капсида образованы пентамерами белка 24, а специальная порталная вершина, к которой присоединяется отросток, образована двенадцатью копиями белка 20 (1). Существуют также два декорирующих белка: Нос (от: head outer capsid protein) и Soc (от: small outer capsid protein), которые присоединяются уже к собранному капсиду (2, 3). Белки Нос и Soc не требуются

для сборки капсида. Делеция одного или обоих генов, их кодирующих, не приводит к снижению продукции фага, его жизнеспособности или инфекционности при стандартных лабораторных условиях.

Белок Нос присоединяется к центру капсомера, образованного гексамерами белков 23; это не сказывается существенным образом на стабильности капсида (4). С помощью криоэлектронной микроскопии было показано, что молекула белка Нос имеет форму гантели. Вероятно, два шара гантели представляют собой два функциональных модуля. Один из них, консервативный, взаимодействует с поверхностью капсида (5), а удаленный от капсида вариабельный модуль взаимодействует с поверхностью бактериальной клетки (6). Аминокислотная подпоследовательность ESRNG, ответственная за присоединение к капсиду, локализована в 25-ти С-концевых аминокислотах, которые содержат консервативную предсказываемую петлю, окруженную двумя бета-структурами, ориентирующими петлю на взаимодействие с основным капсидным белком (5). Структурная организация консервативного модуля формирует точку опоры на поверхности вируса, а вариабельный модуль может быть приспособлен к взаимодействию с разнообразными поверхностями, включая поверхность бактериальной клетки.

Анализ последовательности белка Нос бактериофага T4 показал, что он состоит из четырех тандемных иммуноглобулин-подобных (Ig-подобных) доменов (6). Три первых домена имеют типичную Ig-подобную укладку, которая обычно состоит из семи бета-цепей, уложенных в два антипараллельных бета-листа, упакованных в бета-сандвич (7, 8).

Все известные Ig-подобные домены объединены в четыре группы: Ig-домены (I-Set), фибронектин3-домены (FN3), бактериальные Ig-подобные домены (Big2), домены полицистита печени (PKD, polycystic kidney disease) (9).

Первые два домена белка Нос сходны по аминокислотной последовательности с PKD-доменами, а третий домен сходен с I-Set-доменами (4). Четвертый домен имеет иммуноглобулин-подобную упаковку, сходную с доменами телокина (10). Роль белка Нос для развития бактериофага и для его организации до сих пор не установлена.

Белки Нос различных бактериофагов, родственных T4, гетерогенны по длине и могут содержать разное число доменов, сходных по аминокислотной последовательности и по структуре (11).

#### **Цели работы.**

Природа гетерогенности белков Нос, а также пути их формирования в нынешнем виде, могут быть исследованы путем сравнительного анализа аминокислотных последовательностей. Такие исследования могут быть более интересными, если будут опираться на структуру белка. В цели данной работы входило сравнительное исследование белка Нос – основного антигена бактериофага T4 и родственных ему бактериофагов T4-типа и построение его структуры путем моделирования. Полученные данные могут послужить основой для таксономии и для мониторинга фагов этого типа в природе.

#### **Методы исследования.**

**Сравнение аминокислотных последовательностей белков** Нос бактериофагов T4 -типа с базами данных белковых последовательностей проводили на сервере NCBI (17) алгоритмом PSI-BLAST (16) с уровнем достоверности результатов E-value < 0.0001. При этом позиционный итерационный поиск аналогов отдельных доменов производился до тех пор, пока каждая последующая итерация обнаруживала в базе данных GenBank новые локальные сходства. На основе полученных данных был осуществлен филогенетический анализ отдельных доменов белков Нос бактериофагов подсемейства Tevenvirinae (Teequatrovirinae). Для этого предварительно были проведены выравнивания последовательностей с помощью программы ClustalX (18), филогенетическое дерево строилось с помощью пакета программ Mega4 (19).

**Исследование третичной структуры белка** Нос фага N4 проводили с использованием интернет ресурсов Bioinformatics Web Servers - University of Reading (IntFOLD2), а также Genome3D (Phyre2) (13,14).

## **Результаты.**

### **Биоинформационное исследование белков Нос бактериофагов T4 – типа.**

На настоящее время (01.03.2016) в базе данных Национального центра биотехнологических исследований Национальной медицинской библиотеки Национальных институтов здоровья США присутствует 86 геномов бактериофагов подсемейства *Tevenvirinae* ID: 1198136 (*Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Caudovirales; Myoviridae*) при этом описано 25,232 генов.

Можно считать, что прямых гомологов белка Нос на настоящее время минимум 86. При этом надо учесть белки, кодируемые соседней рамкой считывания (они проявляют выраженное сходство) их может быть еще 86. То есть разнообразие, которое можно рассматривать около 150 ныне известных белков.

Фаги, родственные T4, выделены уже из большого числа различных биотопов. Это и сточные воды городов и сельских населенных пунктов, и ЖКТ человека, мыши, свиньи, лошади и ряда других животных. Можно предполагать, что это лишь очень небольшая часть разнообразия данных вирусов, которое реально существует в природе. Эти фаги играют существенную роль, по крайней мере, в развитии микробиоценоза желудочно-кишечного тракта человека и млекопитающих животных, в том числе тех, которые используются для приготовления пищи. Поэтому методы их таксономии имеют существенную практическую направленность. В данной работе мы предлагаем подход, который согласуется с протеомным подходом таксономии T4-подобных вирусов (12) и который может оказаться и более удобным для практического использования. В качестве генетического маркера выбраны белки, содержащие иммуноглобулин-подобные домены. Эти маркеры существуют в геномах почти всех представителей подсемейства *Tevenvirinae*, обитающих в ЖКТ человека и сельскохозяйственных животных. Таксономия, основанная на числе и качестве Ig - доменов, по результатам нашего исследования хорошо согласуется с протемной классификацией и может быть основой для мониторинга различных таксономических групп *Tevenvirinae* в ценозах. Мониторинг при этом можно производить как с помощью специфического ПЦР, так и с помощью иммуно-химических методов анализа.

### **Структура белка Нос фага T4.**

Для исследования варибельности данного белка было бы удобно полагаться на структурные исследования, но для ЯМР данный белок велик по размеру, а кристаллизовать его пока не видится возможным, так как переход от 3 домена к 4 домену белка фага T4 является гнущимся элементом. Последнее свойство пока не позволило провести успешную кристаллизацию этого белка. Накопленные к настоящему времени данные об аминокислотных последовательностях белков и появление все большего количества информации об их пространственной организации предоставляет широкую возможность для применения методов моделирования на основании гомологии аминокислотных последовательностей исследуемых белков с белками с известными структурами.

Для построения возможных 3D структур Нос белка было использовано 19 различных белков с известной пространственной организацией. Основные 5 моделей с P-value 1.296E-1 и Global model quality score 0,186 были построены на основании суперпозиции с белком 4p99A. Белок 4p99A принадлежит к Ca<sup>2+</sup> - стабилизируемым адгезинам также, как и белок Нос состоит из 4 доменов (*Mrafp\_rii tetra-tandemer. Chain: a, b, c, d.*) и служит для прикрепления антарктической бактерии *Marinomonas primoryensis* к поверхности льда. Учеными из группы Форестера Ровера из Сан-Диего была опубликована работа, показывающая аффинность белка Нос к гликанам, его способность к адгезии к O-связанным остаткам гликана и, следовательно, его возможной роли во взаимодействии фага T4 с гликанами, присутствующими в слизистых оболочках живых существ, возможно, осуществляя тем самым функцию их защиты от патогенных бактерий (15). Учитывая эти данные, а также гомологию Нос белка к белку 4p99A, можно сделать предположение о возможности участия C – концевой области белка Нос, складывающегося в форме 3-х щупальцев или лепестков цветка в прикреплении к розетке из 6-ти белков, продуктов гена 23, на поверхности капсида фага, а палочковидной N-концевой части в прикреплении к гликанам слизи. Более

того наш анализ позволил предположить возможность связывания ионов кальция в области второго домена. Можно предположить, что ионы кальция участвуют в образовании комплекса Нос-белок - кальций  $2+$  - гликан слизи кишечника. Модель структуры представлена на рисунке 1.



Рис. 1. Моделирование структуры белка Нос, бактериофага Т4. Стрелками и надписями показано расположение четырех домена данного белка.

#### **Выводы.**

1. Исследование показало, что число иммуноглобулин-подобных доменов в белке Нос разных бактериофагов подсемейства *Tevenvirinae* (*Teequatrovirinae*) варьирует от одного до десяти и определяет антигенные свойства белка. Использование в качестве критерия для классификации бактериофагов количества доменов в белке Нос приводит к распределению всех кишечных бактериофагов подсемейства на 8 групп (табл. 1):

- бактериофаги, не имеющие белка Нос,
- бактериофаги, имеющие однодоменные варианты белка,
- бактериофаги, имеющие двухдоменные варианты белка,
- бактериофаги, имеющие трехдоменные варианты белка,
- бактериофаги, имеющие четырехдоменные варианты белка,
- бактериофаги, имеющие четырехдоменные варианты белка с С-концевым удлинением третьего домена,
- бактериофаги, имеющие пятидоменные варианты белка,
- бактериофаги, имеющие шестидоменные варианты белка.
- бактериофаги, имеющие десятидоменные варианты белка.

2. С-концевой домен имеется во всех белках Нос и является наиболее консервативной частью этих белков. Это указывает на его функциональную и структурную консервативность и связано с его участием в прикреплении к капсиду фага. Этот домен имеет сходство с адгезивными белками – селектинами. Подпоследовательность ESRNG в его составе общая для всех исследованных

гомологов. Это также косвенно свидетельствует о его участии 4-го домена в присоединении к розетке, образованной 6 субъединицами белка 23 на поверхности капсида.

Таблица 1.

Классификация белков - продуктов гена *hsc*

Число доменов	Примеры фагов	Длина белка в а.к.
1	Enterobacteria phage RB43 Klebsiella phage KP15 Acinetobacter phage Acj61	61 -106
2	Aeromonas phage 31 Aeromonas phage 44RR2.8t Klebsiella phage KP15	177 – 180
3	Aeromonas phage 65 Shigella phage SP18 Enterobacteria phage Bp7	264 – 288
4	Enterobacteria phage T4 Enterobacteria phage vB_EcoM-VR7 Shigella phage Shf12	376 – 377
4 с удлинением С-концевого домена	Enterobacteria phage RB49 Enterobacteria phage Phi1 Enterobacteria phage JSE	404
5	Enterobacteria phage JS10 Enterobacteria phage RB30 Enterobacteria phage RB69	469 – 474
6	Enterobacteria phage CC31 Enterobacter phage PG7 Edwardsiella phage PEi26	509 – 511
9	Escherichia phage slur14	664
11	Serratia phage PS2	1107

3. При анализе первых трех доменов белка Нос бактериофага Т4 было обнаружено выраженное сходство с белками-компонентами иммунной системы млекопитающих. Это может указывать на то, что кровь является нормальной средой для существования в ней фага. В связи с этим возможна его молекулярная мимикрия под компоненты иммунной системы. Наличие подобных доменов в белках отростков других бактериофагов может говорить о широком распространении такой молекулярной мимикрии среди фагов.

4. Сравнительный анализ отдельных доменов белка Нос бактериофага RB49 показал, что он вместе с белками Нос бактериофагов Phi1, JSE и ряда других образует обособленную группу. Для этой группы характерно отсутствие сходства второго и третьего доменов белка Нос с иммуноглобулинами и иммуноглобулин-подобными белками, а также с соответствующими доменами белков Нос фага Т4 и ряда других родственных бактериофагов. Это говорит о существенном отличии в антигенных и других свойствах белка Нос фага RB49 (а также Phi1, JSE и ряда других фагов).

5. Белок Нос фага RB43 и родственных ему фагов имеет только С-концевой домен и вероятно поверхность капсида таких фагов менее антигена и менее иммуногена.

6. Методом молекулярного наложения (моделирования) построена структурная модель белка Нос бактериофага Т4. Первые три домена на молекуле имеют форму фибриллы, а четвертый домен форму цветка с тремя лепестками. Последнее коррелирует с формой розетки (капсомера) на поверхности фага, образованного 6 молекулами основного белка капсида, продукта гена 23.

### **Обсуждение.**

Все эти наблюдения, говорящие о разительной вариабельности этого белка между группами фагов внутри подсемейства *Tevenvirinae* (*Teequatrovirinae*) позволяют надеяться на возможность широкого использования данного подхода, как в практической таксономии бактериофагов, так и для изучения роли различных групп этих фагов в физиологии микробиоценозов кишечника человека и других млекопитающих животных. Анализ данных последовательностей позволяет разработать специфическую полимеразную цепную реакцию для мониторинга различных групп этих бактериофагов, в том числе и в режиме реального времени. Опора на данные исследования в таксономии фагов этого подсемейства позволит за счет сиквенирования третьего поколения определять вклад в каждой из таксономических групп фагов этого подсемейства в ценоз кишечника человека или сельскохозяйственных животных. Тем самым предложена основа для формирования тонкого метода исследования «темной материи» - бактериофагов в физиологию человека и других млекопитающих.

### **Благодарности.**

Работа была частично поддержана грантами РФФИ №№15-07-05783, 13-04-00991, 09-04-10132.

### **Литература:**

1. Fokine, A. Structural and functional similarities between the capsid proteins of bacteriophages T4 and HK97 point to a common ancestry / Fokine A., Leiman P.G., Shneider M.Мю, Ahvazi B., Boeshans K.M., Steven A.C., Black L.W., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G. // *Proc Nat. Acad. Sci. USA*. - 2005. - V. 102. - p. 7163–7168.
2. Ishii, T. Binding of the structural protein Soc to the head shell of bacteriophage T4 / Ishii T., Yamaguchi Y., Yanagida M. J. // *Mol. Biol.* - 1978. - V. 120. - p. 533–544.
3. Ishii, T. The two dispensable structural proteins (Soc and Hoc) of the T4 phage capsid; their purification and properties, isolation and characterization of the defective mutants, and their binding with the defective heads in vitro / Ishii T., Yanagida M. J. // *Mol. Biol.* - 1977. - V. 109. - p. 487–514.
4. Ross, P.D. Assembly-dependent conformational changes in a viral capsid protein. Calorimetric comparison of successive conformational states of the gp23 surface lattice of bacteriophage T4 / Ross P.D., Black L.W., Bisher M.E., Steven A.C. // *J. Mol. Biol.* - 1985. - V. 183. - p. 353–364.
5. Sathaliyawala, T. Functional analysis of the highly antigenic outer capsid protein, Hoc, a virus decoration protein from T4-like bacteriophages / Sathaliyawala T., Islam M.Z., Li Q., Fokine A., Rossmann M.G., Rao V.B. // *Mol. Microbiol.* - 2010. - V. 77. - N 2. - p. 444–455.
6. Bateman, A. A member of the immunoglobulin superfamily in bacteriophage T4 / Bateman A., Eddy S.R., Mesyanzhinov V.V. // *Virus Genes*. - 1997. - V. 14. - p. 163–165.
7. Halaby, D.M. The immunoglobulin fold family: sequence analysis and 3D structure comparisons / Halaby D.M., Poupon A., Mornon J. // *Protein Eng.* - 1999. - V. 12. - p. 563–571.
8. Bork, P. The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core / Bork P., Holm L., Sander C. J. // *Mol. Biol.* - 1994. - V. 242. - p. 309–320.
9. Jing, H. Archaeal surface layer proteins contain beta propeller, PKD, and beta helix domains and are related to metazoan cell surface proteins / Jing H., Takagi J., Liu J.H., Lindgren S., Zhang R.G., Joachimiak A., Wang J.H., Springer T.A. // *Structure*. - 2002. - V. 10. - p. 1453–1464.
10. Bateman, A. Members of the immunoglobulin superfamily in bacteria / Bateman A., Eddy S.R., Chothia C. // *Protein Sci.* - 1996. - V. 5. - N 9. - p.1939–1941.
11. Зимин, А.А. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей отдельных доменов белков Нос бактериофагов подсемейства *Teequatrovirinae* / Микулинская Г.В., Нигматуллина Л.Ф., Назипова Н.Н. // *Математическая биология и биоинформатика*. - 2012. - Том 7, - N 2, - стр. 611–631.
12. Lavigne, R. Classification of Myoviridae bacteriophages using protein sequence similarity / Lavigne R., Darius P., Summer E.J., Seto D., Mahadevan P., Nilsson A.S., Ackermann H.W., Kropinski A.M. // *BMC Microbiol.* - 2009. - V. 9. - Article No. 224.
13. Buenavista, M. T. Improvement of 3D protein models using multiple templates guided

by single-template model quality assessment / Buenavista M. T., Roche, D. B. & McGuffin, L. J. // Bioinformatics, - 2012. - 28, - p. 1851-1857.

14. Roche, D. B. The IntFOLD server: an integrated web resource for protein fold recognition, 3D model quality assessment, intrinsic disorder prediction, domain prediction and ligand binding site prediction / Roche, D. B., Buenavista, M. T., Tetchner, S. J. & McGuffin, L. J. // Nucleic Acids Res. - 2011, - V39, - p 171-6.

15. Barra, J.J. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity / Barra J.J., Auroa R., Furlana M., Whitesona K. L., Erbb M. L., Pogliano J., Stotlanda A., Wolkowicza R., Cuttina A.S., Dorana K. S., Salamonc P., Youled M., Rohwer F. // PNAS. - V. 110, - N26, - p. 10771-10776.

16. Altschul, S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // Nucleic Acids Res. - 1997. - V. 25. - p. 3389 - 3402.

17. Basic Local Alignment Search Tool. Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> . (дата последнего обращения 29.02.2016).

18. Jeanmougin, F. Multiple sequence alignment with Clustal X / Jeanmougin F., Thompson J.D., Gouy M., Higgins D.G., Gibson T.J. // Trends Biochem. Sci. - 1998. - V. 23. - p. 403-405.

19. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. // Mol. Biol. Evol. - 2007. - V. 24. - p. 1596-1599.

## **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ ПРОТИВОХОЛЕРНЫХ ВАКЦИН**

**Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Мишанькин Б.Н., Филиппенко А.В.,  
Беспалова И.А., Галичева А.Л.**

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт  
Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону*

Продолжительные и частые эпидемии холеры, появление новых генетически измененных модифицированных штаммов, вызывающих более тяжелые клинические формы, расширение спектра и повышение уровня антибиотикорезистентности привлекают внимание медицинских кругов к этому заболеванию [1]. В этой связи остается актуальной угроза выноса инфекции из эндемичных стран и реальность возникновения заносных эпидемических очагов, что требует от учреждений здравоохранения и региональных центров Санэпиднадзора постоянной готовности к экстренному проведению мероприятий по локализации и ликвидации очагов холеры [2].

В настоящее время зарегистрированными в мире являются 3 вакцины:

Убитая оральная химическая вакцина WS/rBS (Dukoral, Швеция) рекомендована ВОЗ к применению с 1999 г. и состоит из смеси четырех препаратов убитых целых клеток *Vibrio cholerae* O1 (сероваров Инаба и Огава и классического и Эль тор биоваров), в которые затем добавляли очищенную рекомбинантную субъединицу В холерного токсина (ХТ) [3]. Поскольку ХТ дает перекрестную реакцию с антигенами *Escherichia coli*, эта вакцина также обеспечивает кратковременную защиту от энтеротоксигенных штаммов кишечной палочки, что представляет дополнительное преимущество для путешественников. Она обеспечивает защитный эффект в течение 3 лет у 50-60% привитых, но не защищает от *V. cholerae* O139. Эта вакцина имеется в наличии более чем в 60 странах.

Бивалентная O1 и O139 цельноклеточная оральная вакцина mORCVAX, модифицированная версия вакцины WS/rBS без субъединицы В (Shanchol) недавно была разработана во Вьетнаме [4]. Пероральная двукратная вакцинация давала защиту от инфекции через 8-10 дней после последнего приема вакцины у 66% взрослых. Среди детей 1-5 лет протективный эффект составлял 68%. Эта же вакцина была лицензирована для Индии под названием Shanchol, и кроме Индии применяется в Индонезии [5,6].

В Российской Федерации на базе противочумного института «Микроб» производят лицензированную на национальном уровне таблетированную холерную бивалентную химическую вакцину, которая представляет собой смесь холерогена-антитоксина и О-антигенов, полученных из инактивированных бульонных культур *V. cholerae* O1 классического биовара штаммов 569В или КМ-76 серовара Инаба и М-41 серовара Огава [7]. Под влиянием вакцинации у привитых наблюдается продукция вибриоцидных антител к обоим сероварам холерных вибрионов и секреторных антител, которые обнаруживаются через 6 месяцев.

Несмотря на перечисленное выше, идеальной вакцины, которая бы отвечала всем требованиям ВОЗ, до сих не существует. Атенуированные вакцины способны индуцировать мощный протективный ответ после однократного применения, но могут оказывать и негативное действие на больных с ослабленным иммунитетом. Убитые вакцины с успехом продемонстрировали свой потенциал по защите населения эндемичных районов или районов, переживших природный катаклизм, однако не способны обеспечить долгосрочную защиту и не подходят для детей в возрасте до двух лет. Кроме того, они принимаются в несколько доз [8]. Поэтому работы по созданию противохолерной вакцины, которая бы обеспечивала формирование длительного напряженного антибактериального и антитоксического иммунитета ведутся постоянно не только в России, но и во всем мире.

С развитием новых технологий и внедрения их в медицинскую практику стало возможным создание живых холерных вакцин нового поколения и новых химических вакцин.

Атенуированные вакцинные штаммы имеют более полный набор антигенов, что позволяет им вызывать формирование напряженного иммунитета, они более активно захватываются М-клетками пейеровых бляшек. Первым аттенуированным живым вакцинным штаммом стал А-В+*V. cholerae* Texas Star-SR (США). Наилучшие результаты в клинических испытаниях показал штамм *V. cholerae* CVD 103-HgR, полученный в США - аттенуированный дериват классического штамма Инаба 569 В, однако выпуск живой аттенуированной оральной вакцины на его основе был прекращен в 2004 г. В настоящее время вакцина CVD 103-HgR готовится к повторному запуску в производство и к лицензированию в США под эгидой PaxVax [9]. Кандидатом в живые холерные вакцины является «CholeraGarde» - живой аттенуированный штамм *V. cholerae* O1 биовара Эль тор серовара Инаба, известный также как «Peru-15», который был получен из штамма *V. cholerae* O1 С6709, выделенного от больного в Перу. В США и Бангладеш проведены испытания с целью определения его протективного действия и дальнейшей разработки однодозовой вакцины, защищающей детей младшего возраста и людей других возрастных групп от холеры [10]. При попытке упростить состав противохолерных вакцин нового поколения шведскими учеными был получен новый нетоксигенный вакцинный штамм *V. cholerae* O1, стабильно экспрессирующий на поверхности антигены сероваров Огава и Инаба. Такой эффект был достигнут в результате включения структурного гена *wbeT* без его функционального промотора в хромосому штамма O1 Инаба. Низкие уровни экспрессии гена *wbeT* сделали возможным целевое частичное переключение с одного серовара на другой. Этот штамм MS1342, являющийся кандидатом в вакцину, потенциально способен заменить три вирулентных штамма, которые используются в современном производстве противохолерных вакцин. Оральная иммунизация мышей бактериальными клетками MS1342 индуцировала выработку у животных Огава-специфичных, Инаба-специфичных и перекрестно-реагирующих сывороточных антител. Сделан вывод, что такой штамм может быть положен в основу убитой цельноклеточной противохолерной вакцины, обеспечивающей защиту от холеры, вызванной *V. cholerae* O1 как серовара Инаба, так и серовара Огава [11]. В Саратовском противочумном институте «Микроб» из авирулентного штамма *V. cholerae* Эль тор приготовлен вакцинный штамм *V. cholerae* КМ-184, который не имеет гена, кодирующего синтез субъединицы А холерного токсина, а несет гены, детерминирующие экспрессию иммуногенной субъединицы В и фактора колонизации CFAI из *E. coli*. Штамм приживается в тонком кишечнике экспериментальных животных, вызывает синтез антибактериальных и антитоксических антител как в сыворотке крови, так и в слизистой оболочке тонкого кишечника [12]. Сконструированы атоксигенные штаммы холерного вибриона *V. cholerae* Эль тор Инаба М 569 и *V. cholerae* Эль тор Огава 5/65, являющиеся продуцентами O1-антигена. Для продукции O139 антигена показана

возможность использования нетоксигенного штамма *V. cholerae* O139 M377. Эти штаммы рассматриваются как перспективные для создания отечественной современной химической вакцины против холеры [13].

Другое направление вакцинопрофилактики холеры связано с разработкой безопасных неживых вакцин (химических, «теней», везикул, конъюгированных, трансгенных и т.д.).

За рубежом разработана технология получения вакцин на основе пустых клеток грамотрицательных бактерий с полностью сохраненными поверхностными структурами – «теней» [14]. Исследования американских ученых выявили индукцию стабильного иммунного ответа у мышей после иммунизации везикулами внешней мембраны холерного вибриона [15]. Кубинскими авторами предложен новый кандидат в вакцину против холеры в форме таблеток, содержащих термически убитые целые клетки штамма *V. cholerae* C7258, ЛПС, манноза-чувствительный гемагглютинин и белок U внешней мембраны [16,17]. Для конструирования искусственных вакцин иркутскими исследователями были использованы наружные мембраны (НМ) клеток возбудителя холеры, получаемые в результате разрушения и инактивации вибрионов Эль тор мочевиной с последующей обработкой их трипсином [18]. В Ростовском-на Дону противочумном институте проводится оценка перспективности использования мембранного белка OmpT для профилактики экспериментальной холеры [19]. Результаты доказывают эффективность этого препарата в тесте активной защиты белых мышей и при заражении взрослых кроликов в изолированную петлю тонкого кишечника, что говорит о целесообразности дальнейшего изучения протективных и иммуногенных свойств OmpT белка наружных мембран возбудителя холеры.

Возникновение нового серовара 0139 «Бенгал» холерного вибриона инициировало исследования по разработке вакцины, включающей в себя антигены «Бенгал» или моновакцины против этого штамма. На Кубе был генетически модифицирован вирулентный штамм *V. cholerae* O139 CRC266, в результате чего один из полученных штаммов, обозначенный TLP01, стал полностью аттенуированным и обладал иммуногенностью [20]. В Индии созданы комбинированные бивалентные и тривалентные холерные вакцины, состоящие из смеси лиофилизированных клеток вакцинных штаммов 01-0139 серогрупп [21]. В институте «Микроб» создана таблетированная форма оральной экспериментальной вакцины, в состав которой входят O-антиген 0139 и холероген-анатоксин B [22,23]. Методом конъюгации в авирулентный штамм *V. cholerae* O139, содержащий O139 антиген и полисахаридную капсулу, были введены рекомбинантные плазмиды. Полученный штамм *V. cholerae* KM182(pIEM3)(pCFAI) обладал выраженными иммуногенными и протективными свойствами [24]. На штаммах *V. cholerae* O139 серогруппы MO45 и KM137 отработана технология концентрирования протективных антигенов, получены 3 серии экспериментальной вакцины против холеры, вызванной возбудителем O139 серогруппы [25,26].

Потребность в вакцинах, которые могли бы одновременно обеспечивать защиту населения от нескольких инфекций, легла в основу разработки комбинированных вакцин. Американскими исследователями при использовании «теней» *V. cholerae* был сконструирован мультисубъединичный штамм, коэкспрессирующий порин B и полиморфный белок D мембраны *Chlamydia trachomatis* [27]. Полученные данные демонстрируют способность мультисубъединичной вакцины индуцировать перекрестный иммунитет против хламидий и вибриоцидный иммунный ответ, что указывает на возможность разработки комбинированной вакцины широкого спектра действия.

Привлекательным для исследователей является разработка вакцинных препаратов на растительной основе. Китайскими учеными заложена основа для исследования возможности использования субъединицы B холерного токсина при разработке съедобной вакцины против холеры на основе томатов [28]. Японскими авторами создана оральная вакцина на основе риса, обладающая значительными преимуществами перед обычными вакцинами. В этой вакцине, получившей название MisoRice, субъединица B холерного токсина концентрируется в органеллах накопления запасных питательных веществ в зёрнах риса. Она индуцировала специфичный к токсину ответ сывороточных IgG и мукозальных IgA с нейтрализующей активностью. Кроме того, вакцина MisoRice сохраняла стабильность и иммуногенность при комнатной температуре в течение полугода лет и была защищена от переваривания пепсином *in vitro* [29,30].

Перспективными в плане совершенствования иммунопрофилактики холеры являются новые системы доставки антигенов к слизистым («искусственные клетки», липосомы, микросферы, микрокапсулы), действие которых может заключаться в усилении захвата антигенного материала М-клетками, сохранении или восстановлении как нативных свойств антигенов, так и возможности регулирования скорости их высвобождения, стимуляции функции лимфоцитов внутри пейеровых бляшек и т.д.

Также при создании профилактических препаратов, в том числе и противохолерных, необходимо учитывать клеточные и молекулярные взаимодействия антигенов в многокомпонентных вакцинах, их «конкуренцию» и синергизм [31]. Разработчикам вакцин необходимо учитывать новые требования, предъявляемые к вакцинным препаратам: однократное введение (интраназальное или подкожное), не требующее воды или буфера, независимость от холодовой цепи, возможность использования для вакцинации детей младше 2 лет, способность формирования напряженного длительного иммунитета.

Таким образом, идея создания вакцины, обеспечивающей формирование продолжительного и напряженного иммунитета к холере, заставляет исследователей искать новые подходы к совершенствованию специфической профилактики этой инфекции.

#### Литература:

1. Desai, S.N. An overview of cholera vaccines and their public health implications / S.N. Desai, J.D. Clemens // *Curr. Opin. Pediatr.* - 2012. - Vol.24, N1. - P.85-91.
2. Онищенко, ГГ. Специфическая профилактика холеры в современных условиях / ГГ. Онищенко, В.В. Кутырев, Т.Н. Щуковская и др. // *Проблемы особо опасных инфекций.* - 2011. – Вып. 107. – С. 5-12.
3. Borde, A. Preparation and evaluation of a freeze-dried oral killed cholera vaccine formulation / A. Borde, A. Larsson, J. Holmgren, E. Nygren // *Eur. J. Biopharm.* - 2011. - Vol.79, N3. - P.508-518.
4. Saha, A. Safety and immunogenicity of a killed bivalent (O1 and O139) whole-cell oral cholera vaccines Shanchol, in Bangladeshi adults and children as young as 1 year of age / A. Saha, M.I. Chowdhury, F. Khanan et al. // *Vaccine.* - 2011. - Vol.29, N46. - P. 8285-8292.
5. Lopez-Gigosos, R.M. Vaccination strategies to combat an infectious globe: oral cholera vaccines / R.M. Lopez-Gigosos, E. Plaza, R.M. Diez-Diaz, M.J. Calvo // *J. Glob. Infect. Dis.* - 2011. - Vol.3, N1. - P.56-62.
6. Bhattacharya, S.K. 5 year efficacy of a bivalent killed whole-cell oral cholera vaccine in Kolkata, India: a cluster randomised, double-blind, placebo-controlled trial / S.K. Bhattacharya, D. Sur, M. Ali et al. // *Lancet Infect. Dis.* – 2013.- Vol.13, N12 - P.1050-1056.
7. Щуковская, Т.Н. Специфическая профилактика холеры на современном этапе / Т.Н. Щуковская, А.К. Никифоров, В.В. Кутырев // *Холера и патоген. для чел-ка вибрионы: Матер. совещ. специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенств. эпидемиол. надзора за холерой.* - Ростов-на-Дону, 2011. - №24. - С.163-166.
8. Pastor M., Pedraz J.L., Esquisabel A. The state-of-the-art of approved and under-development cholera vaccines / M. Pastor, J.L. Pedraz, A. Esquisabel // *Vaccine.* - 2013; Vol. 31, N38. - P. 4069-4078.
9. Chen, W.H. Safety and immunogenicity of single-dose live oral cholera vaccine strain CVD 103-HgR prepared from new Master and Working Cell Banks / W.H. Chen, R.N. Greenberg, M.F. Pasetti et al. // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2014.- Vol.21, N1. - P.66-73.
10. Chowdhury, M.I. Development of Peru-15 (CholeraGarde), a live-attenuated oral cholera vaccine: 1991-2009 / M.I. Chowdhury, A. Sheikh, F. Qadri // *Expert Rev. Vaccines.* - 2009. - Vol.8, N12. - P.1643-1652.
11. Lebens, M. Construction of novel vaccine strains of *Vibrio cholerae* co-expressing the Inaba and Ogawa serotype antigens / M. Lebens, S.L. Karlsson, S. Kallgard et al. // *Vaccine.* - 2011. - Vol.29, N43. - P.7505-7513.
12. Щуковская, Т.Н. Специфическая профилактика холеры на современном этапе /

- Т.Н. Щуковская, А.К. Никифоров, В.В. Кутырев //Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер. совещ. специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенств. эпидемиол. надзора за холерой. - Ростов-на-Дону. - 2011. - №24. - С.163-166.
13. Алешина, Ю.А. Исследование процессов культивирования атоксигенных штаммов холерного вибриона и концентрирования их О-антигенов / Ю.А. Алешина, С.А. Еремин, А.В. Комиссаров и др. //Соврем. технологии обеспеч. биол. безопасности: Матер. III науч.-практ. школы-конф. молодых ученых и специал.-тов научно-исследов. организаций Роспотребнадзора. - Оболенск, 2011. - С.251-254).
  14. Jechinger, W. Bacterial Ghosts as Carrier and Targeting Systems for Antigen Delivery /W. Jechinger, W. Haidinger, S. Paukner et al. //Vaccine Delivery Strategies /G. Dietrich, W. Goebel (ed.) – Horison Scientific Press, Wymondham, UK, 2002. - P. 163-184.
  15. Schild, S. Characterization of Vibrio cholerae outer membrane vesicles as a candidate vaccine for cholera / S. Schild, E.J. Nelson, A.L. Bishop, A. Camilli //Infection and immunity – 2009. - Vol. 77, N. 1. - P. 472–484.
  16. Lopez, Y. Pharmacology and toxicology of an oral tablet whole cells inactivated cholera vaccine in Sprague Dawley rats /Y. Lopez, J.F. Infante, S. Sifontes et al. //Vaccine. - 2011. - Vol.29, N19. - P.3596-3599.
  17. Fernández, S. Evaluation of enteric-coated tablets as a whole cell inactivated vaccine candidate against Vibrio cholerae /S. Fernández, G. Aco, J. Castaco et al. // Travel. Med. Infect. Dis. – 2013. - Vol.11, N2. - P.103-109.
  18. Марков, Е.Ю. Клеточные мембраны холерного вибриона как основа высокоиммуногенного вакцинного препарата против холеры / Е.Ю. Марков, Л.Я. Урбанович, Р.С. Колесник и др. //Бюллетень ВСНЦ ССО РАМН. - 2004. - №1.-С.127-132.
  19. Мишанькин, Б.Н. Мембранный белок OmpT холерного вибриона как возможный компонент химической вакцины /Б.Н. Мишанькин, И.А. Иванова, О.В. Дуванова и др. // Цитокины и воспаление.- 2014.- Том 13, №1. – С.114.
  20. Ledyn, T. TLP01, an mshA mutant of Vibrio cholerae O139 as a vaccine candidate against cholera / T. Ledyn, B. Ferrón, C. Pírez et al. //Microbes Infect. – 2012. – Vol.14, N11. - P.968-978.
  21. Mahalanabis, D. A randomized, placebo-controlled trial of bivalent killed, whole-cell, oral cholera vaccine in adults and children in a cholera endemic area in Kolkata, India /D. Mahalanabis, A.L. Lopez, D. Sur et al. //PLoS ONE. - 2008. - Vol.3, N6. - P.e2323.
  22. Щуковская, Т.Н. Вакцинопрофилактика холеры: современное состояние вопроса /Т.Н. Щуковская, Л.В. Саяпина, В.В. Кутырев //Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2009. – № 2 (45). – С. 62 – 67.
  23. Щуковская, Т.Н. Вакцинопрофилактика холеры. Современное состояние вопроса и перспективы / Т.Н. Щуковская, Л.В. Саяпина //Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. совещ. и проблемной комиссии. - Ростов-на-Дону, 2008. - Вып. 21. - С.117-119.
  24. Крепостникова, И.М. Создание штамма Vibrio cholerae O139 серогруппы - кандидата в живую вакцину против холеры /И.М. Крепостникова, Л.Ф. Ливанова, Ю.В. Лозовский, Н.И. Смирнова //Матер. IX съезда Всеросс. науч.-практ. общ-ва эпидем., микробиол. и паразитол. - Москва, 2007. - Том 1 - С.73-74.
  25. Громова, О.В. Оптимизация процесса производства холерной химической таблетированной вакцины с помощью технологии ультрафильтрации / О.В. Громова, С.А. Нижегородцев, И.А. Дятлов, В.В. Кутырев //Пробл. особо опасн. инф. - 2011. - Вып.3 (109). - С. 71-74.
  26. Еремин, С.А. Технология производства новой холерной химической вакцины с использованием атоксигенных штаммов Vibrio cholerae /С.А. Еремин, Т.Н. Щуковская, А.В. Комиссаров и др. //Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер. совещ. специал. Роспотребнадзора по вопр. совершенствования эпид. надзора за холерой (5-6 июня 2013 г.). - Ростов-на-Дону, 2013. - Вып. 26. - С.232-235.
  27. Eko, F.O. Evaluation of a broadly protective Chlamydia-cholera combination vaccine candidate / F.O. Eko, D.N. Okenu, U. Singh et al. //Vaccine. - 2011. - Vol.29, N21. - P.3802-3810.
  28. Jiang, X.L. Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune

- response in mice /X.L. Jiang, Z.M. He, Z.Q. Peng et al. //Transgenic Res. - 2007. - Vol.16, N2. - P.169-175.
29. Yuki Y. Mucorice: development of rice-based oral vaccine /Y. Yuki, H. Kiyono //Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. - 2008. - Vol.31, N5. - P.369-374.
30. Tokuhara, D. Secretory IgA-mediated protection against V. cholerae and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic Escherichia coli by rice-based vaccine /D.Tokuhara, Y. Yuki, T. Nochi et al. //Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 2010. - Vol.107, N19. - P.8794-8799.
31. Медуницын, Н.В. История, принципы конструирования комбинированных вакцин и проблемы вакцинопрофилактики при их применении /Н.В. Медуницын //Журн. эпидемиол., микробиол., иммунобиол. — 2001. — № 1 - С.90 - 94.

## **ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЖИВОЙ ЧУМНОЙ ВАКЦИНЫ**

**Катунина Л.С., Курилова А.А., Ковтун Ю.С., Василенко Е.И., Будыка Д.А.,  
Абзаева Н.В., Гостищева С.Е.**

*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»  
Роспотребнадзора, Ставрополь*

Препарат вакцины чумной живой сухой много лет выпускается на базе научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. В связи с усложнившейся эпидемической обстановкой в природных очагах чумы безусловно актуальным становится совершенствование (стандартизация) биотехнологии производства чумной вакцины как профилактического препарата. При неизменности самих стадий технологического процесса, представляются возможными изменения внутри этапов, в конечном итоге влекущие за собой улучшение качества конечного продукта по тому или иному показателю.

В последнее время многими исследователями подчеркивается важность и острота проблемы снижения качества питательных сред. По всей видимости, это связано со снижением качества основного исходного сырья для их приготовления – мяса, обусловленным, в свою очередь, сложной экологической обстановкой и антропогенным воздействием на окружающую среду. В мясе зачастую содержатся антибиотики, химикаты, нитриты, токсические продукты, и это не может не оказывать негативного влияния на ростовые свойства приготавливаемых из него питательных основ и сред. При использовании таких сред для культивирования бактерий наблюдается, как правило, подавление развития микроорганизмов, существенно снижается прирост биомассы. Кроме того, мясное сырье является дорогостоящим.

В условиях рыночной экономики приобретает большое значение повышение качества коммерческой продукции при снижении её себестоимости. Эти требования в полной мере относятся к производству любых препаратов, в том числе питательных сред. Биотехнология их довольно хорошо отработана, однако, ещё существуют резервы совершенствования. Актуален в наше время и экологический подход к микробиологическому производству. Для приготовления культуральных сред апробируется недорогое белоксодержащее сырье, непищевые отходы различных производств, а для выращивания микроорганизмов разных видовых групп осуществляется подбор соответствующих стимуляторов роста.

Для получения биомассы в процессе производства экспериментальных и коммерческих серий чумной живой вакцины были использованы различные питательные среды, приготовленные на питательных основах из мяса, рыбы, казеина, кровяных сгустков, кукурузного экстракта и т.д. [1]. Однако, в промышленном выпуске чумной вакцины из указанных сред применялись только две: из гидролизатов мяса и казеина по Хоттингеру. Разработка питательных сред для коммерческого выпуска чумной вакцины из других основ по разным причинам не была доведена до конца.

Первые попытки использовать кукурузные среды с этой целью принадлежат А.А. Канчух с соавт., 1961 [2], затем Э.А. Черновой, 1989 [3]. Несмотря на доступность растительных субстратов, они не получили широкого распространения в производстве бакпрепаратов, что можно объяснить невысокими показателями аминного азота [4].

Содержание аминного азота в питательной среде можно повысить за счет комбинации переработанных продуктов растительного и животного происхождения, богатых белковыми субстратами [1].

Нами был подобран и отработан оптимальный состав питательной среды для выращивания биомассы в процессе производства чумной вакцины EV.

В качестве исходного сырья использовали кукурузный экстракт (сгущенный), содержащий, в среднем, 9,4 % белка. Благодаря высокому содержанию в сухом остатке азотистых веществ до (45 %) и углеводов (до 25 %), экстракт является хорошей питательной средой при производстве пенициллина, других антибиотиков и витаминов. Кроме того, он богат микроэлементами, макроэлементами, аминокислотами [5]. В качестве стимуляторов роста чумного микроба добавляли натрий сернистокислый и соль Мора. В качестве буферного соединения в состав среды ввели натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный, так как известно, что фосфаты широко используются при приготовлении питательных сред, это – единственные неорганические соединения, обладающие буферным действием в физиологически важном диапазоне pH, и они малотоксичны [6].

На основании комплексного изучения и апробации в условиях производственной лаборатории показано, что чумная вакцина EV, приготовленная из биомассы, выращенной на разработанной среде, по всем тестам (внешний вид, остаточная влажность, культурально-морфологические и биохимические свойства, процент живых микробных клеток, жизнеспособность) соответствовала требованиям нормативно-технической документации [7].

Физико-химические свойства гидролизата определяли по МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [8]. Аминный азот в полученном гидролизате составил 1123 мг%, сухой остаток – 25,5 %.

Питательные среды, применяемые в производстве бактериальных препаратов, в частности, вакцины чумной живой сухой, должны обеспечивать не только рост микроба, но и максимальный выход микробной массы, состоящей из популяции клеток, обладающих всеми типичными свойствами, присущими исходной культуре [9].

Так как основными показателями качества накопительной среды являются количество выросшей биомассы и процент живых микробных клеток, изучали их в числе биологических показателей разработанной плотной питательной среды в соответствии с МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» [10].

Питательная среда на ферментативной основе кукурузного экстракта сгущенного обеспечивала сбор биомассы чумного микроба вакцинного штамма *Y. pestis EV* в количестве 100 млрд. м.к. в 1 мл взвеси, а процент живых микробных клеток составил 86,6. Приготовленная биомасса была разлита по 2 мл в ампулы и высушена в лиофильной сушке. После высушивания процент живых микробных клеток составил 43,8. На пластинках плотной питательной среды с прочностью (350±40) выросло 69 колоний в R-форме диаметром 1,5-2,0 мм с выраженной кружевной зоной, сохранявшейся в течение 5 суток. Было показано, что чувствительность питательной среды при определении выживаемости посевной культуры нативной и вакцинной суспензии, готового препарата не уступала мясному агару Хоттингера.

Таким образом, нами сконструирована плотная питательная среда на основе кукурузного экстракта сгущенного, которая обеспечивает рост высокого процента колоний вакцинного штамма *Y. pestis EV* при низких посевных дозах и, следовательно, может быть рекомендована для его культивирования и сбора бактериальной массы при изготовлении чумной вакцины. Целесообразно использовать разработанную нами среду для определения жизнеспособности микробных клеток в суспензии.

Из изложенного выше следует, что в производстве вакцины чумной живой сухой данная пи-

тательная среда может заменить среду из дорогостоящего, но не всегда качественного мясного гидролизата, снижая при этом себестоимость конечной продукции.

Литература:

1. Возможность использования питательных сред из кукурузного экстракта в производстве чумной живой сухой вакцины ЕВ / Э.А. Чернова, А.И. Тинкер, К.С. Гюлушанян, Н.Е. Печников, Г.С.Новицкая, Г.Н. Верховцева В.Д. Майская, Н. А. Саркисян // Особо опасные инфекции на Кавказе: тез. докладов VI науч. конф. (декабрь 1987 г.). – Ставрополь, 1987. Ч. II. – С. 145 - 148.
2. Использование кукурузного экстракта в качестве основы для питательной среды чумного микроба. Сообщ. I. / А.А. Канчух, В.Н. Сагатовский, А.Ф. Мелехина, Н.С. Сурнина // Сб. науч. работ. - Махачкала, 1961. - С.198-206.
3. Чернова, Э.А. Характеристика чумной сухой вакцины, приготовленной из биомассы штамма ЕВ выращенной на нетрадиционном кукурузно-казеиновом агаре / Э.А. Чернова // Актуальные вопросы эпидемиологии, профилактики и диагностики особо опасных инфекций: тез. докладов итоговой науч. конф. (21-22 декабря 89 г.). – Ставрополь, 1989. – С. 123-126.
4. Культивирование чумного микроба на средах из непищевого сырья в производственных условиях / Э.Г. Шпилевая, А.И. Тинкер, М.Н. Гончарова, И.Ф. Таран. – Ставрополь, 1993. –155 с. – Библиогр.: 428 назв. – Деп. В ВНИИТИ 26.02.93, № 478-В 93.
5. Нестерин, М.Ф. Химический состав пищевых продуктов / М.Ф. Нестерин, И.М. Скурихин. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 247 с.
6. Поляк, М.С. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии / М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич. – СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2008. – С. 37-38.
7. Промышленный регламент на производство вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций ПР 01897080-09-09. – Ставрополь, 2009. – 252 с.
8. Методы контроля бактериологических питательных сред МУК 4.2.2316-08. – М., 2008.
9. Гюлушанян, К.С. Использование питательной среды на основе кукурузного экстракта в производстве чумной вакцины ЕВ: автореф. дисс. ... канд. наук / Гюлушанян Карина Степановна – Саратов, 1994. – 24 с.
10. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза. МУ 3.3.2.2124-06. – М., 2007.

**РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЛЕТНЕГО МОНИТОРИНГА  
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ,  
ВЫДЕЛЕННЫХ У ЖЕНЩИН И МУЖЧИН С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ  
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА**

**Колесникова Е.А., Бруснигина Н.Ф., Ефимов Е.И.**

*ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика  
И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

Проблема формирования резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам является общепризнанной и рассматривается как социальная проблема, как реальная угроза состоянию здоровья людей, глобальной и национальной безопасности. Проведение регулярного микробиологического мониторинга необходимо для оценки текущей ситуации с антимикробной резистентностью в регионах и разработке стратегических направлений по её сдерживанию [1].

По данным литературы на долю *U.urealyticum* приходится 40 – 60 %, а *M. hominis* 15 – 35 % случаев воспалительных заболеваний урогенитального тракта (УГТ) [2, 3, 4, 5, 6]. Доказана этиологическая роль *M. hominis* и *U. urealyticum* при уретрите, вагините, цервиците, эндометрите, сальпингоофорите у женщин, у мужчин - при уретрите, простатите, везикулите, эпидидимите, баланопостите [7,8,9].

По мнению ряда авторов [4, 6, 10], уреаплазмы и микоплазмы могут быть причиной бесплодия у женщин и мужчин, влиять на течение и исход беременности (приводить к преждевременным родам, хориоамниониту, послеродовому эндометриту), а также вызывать инфекционно - воспалительные заболевания у новорожденных. Длительная персистенция микоплазм и уреаплазм в организме, низкая антигенная нагрузка, а также эмпирический выбор антибактериального препарата с целью их элиминации способствуют частому переходу инфекции в рецидивирующее течение.

Информация о спектре и степени резистентности возбудителей различных воспалительных заболеваний, в частности, заболеваний урогенитального тракта, должна служить основой для назначения эффективных противомикробных препаратов, что позволит избежать серьезных осложнений, сократить сроки реабилитации и пребывания больного в стационаре.

**Цель:** оценка результатов мониторинга антимикробной резистентности клинических изолятов *M.hominis* и *U.urealyticum/parvum*, выделенных у женщин и мужчин репродуктивного возраста с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта в период с 2006 по 2015 гг.

**Материалы и методы.** В период с 2006 по 2015 гг. изучена фенотипическая резистентность к антибактериальным препаратам 9355 культур *U. urealyticum/parvum* и 1645 культур *M. hominis*, выделенных в клинически значимых титрах ( $10^4$  КОЕ/мл) у женщин и мужчин с воспалительными заболеваниями органов урогенитального тракта и нарушениями функции репродукции. Материалом для исследования являлись у женщин соскобы эпителия цервикального канала, уретры и вагины, у мужчин - соскобы эпителия уретры.

Индикацию *M.hominis* и *U.urealyticum/parvum*, определение уровней и спектров антибиотикорезистентности осуществляли с использованием жидких дифференциально-диагностических сред производства Клиники акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева.

Поиск генетических детерминант резистентности к тетрациклинам и макролидам проводили методом ПЦР с использованием тест-систем «Эритропол», «Тетрапол» производства НПФ Литех (Москва).

Изучали чувствительность изолятов *U. urealyticum/parvum*, *M. hominis* к 11 антибактериальным препаратам: доксициклину (Dc), эритромицину (Em), рокситромицину (Rm), офлоксацину (Of), клиндамицину (Clm), джозамицину (Jm), кларитромицину (Krm), ципрофлоксацину (Cf), гентамицину (Gm), азитромицину (Az), мидекамицину (Mm).

Статистическую обработку данных проводили на компьютере с использованием программ Microsoft Office (Excel), пакета статистических программ Statz, Statistica 6,0. Достоверность различий определяли общепринятым методом расчета ошибки среднего ( $m$ ) и показателя существенности и вероятности ( $t$ ).

#### **Результаты и их обсуждение:**

Проведенные исследования позволили выявить высокую частоту распространения антибиотикорезистентных штаммов *U. urealyticum/parvum*. 86% выявленных культур *U. urealyticum/parvum* оказались устойчивыми к действию 1 и более антибактериальных препаратов. Чувствительные ко всем препаратам составили 14% культур *U. urealyticum/parvum*.

Анализ многолетней динамики фенотипической резистентности уреаплазм свидетельствует о наметившейся тенденции увеличения частоты выявления резистентных форм (Рис.1).

Наибольшее количество культур *U. urealyticum/parvum* характеризовалось устойчивостью к 1 - 2 препаратам (78%), полирезистентные штаммы (устойчивые к 3 и более препаратам) составили 8% (Рис.2).

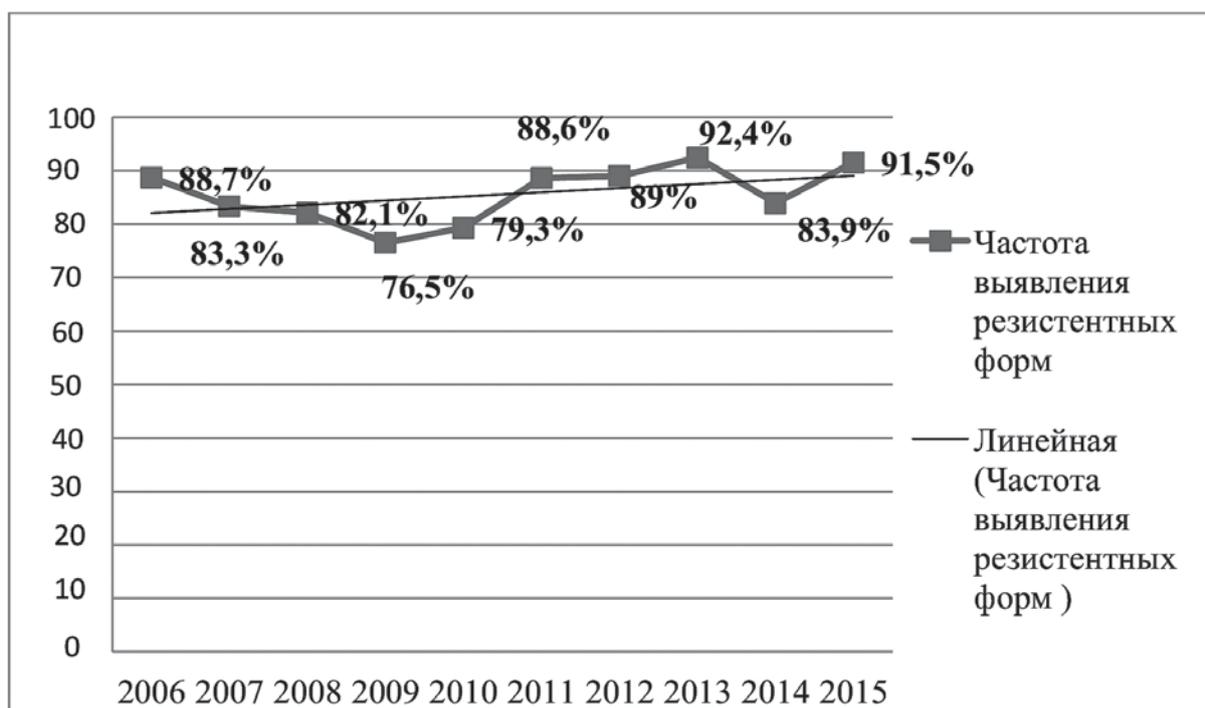


Рис. 1. Частота выявления антибиотикорезистентных форм *U. urealyticum/parvum* в период с 2006-2015гг.

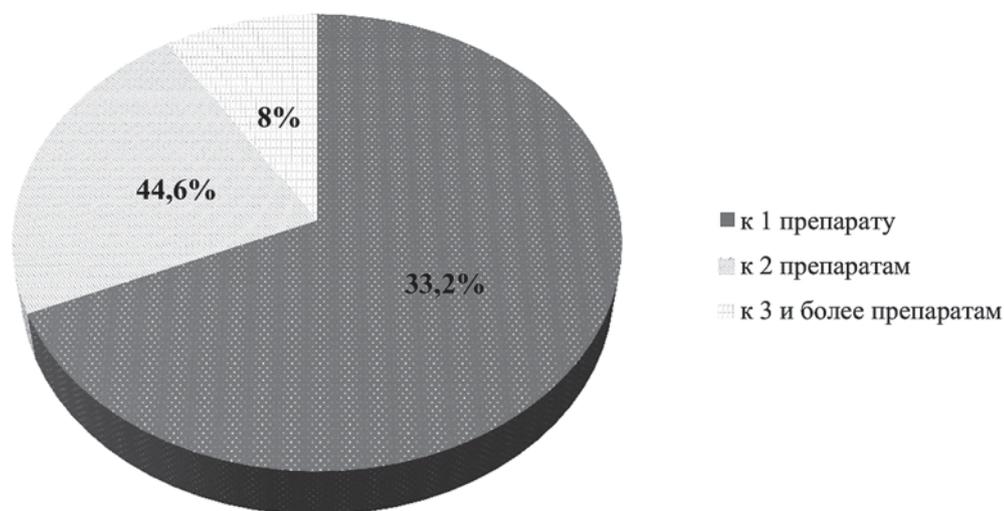


Рис.2. Структура антибиотикорезистентности *U. urealyticum/parvum* в период с 2006-2015гг.

Показатели частоты выявления полирезистентных штаммов уреоплазм за 10-летний период наблюдения изменялись следующим образом: в период 2006 года наблюдался максимум числа обнаружения полирезистентных культур уреоплазм с дальнейшим спадом до 2012г., в 2013-2014гг. наблюдался рост числа штаммов, устойчивых к 3-м и более препаратам, а с 2014 г. наметилась тенденция к их снижению (Рис.3).

Это, вероятно, связано с ростом информированности специалистов лечебно-профилактических учреждений об уровне эффективности различных препаратов и изменения протоколов ведения пациентов с инфекциями мочеполовой системы.

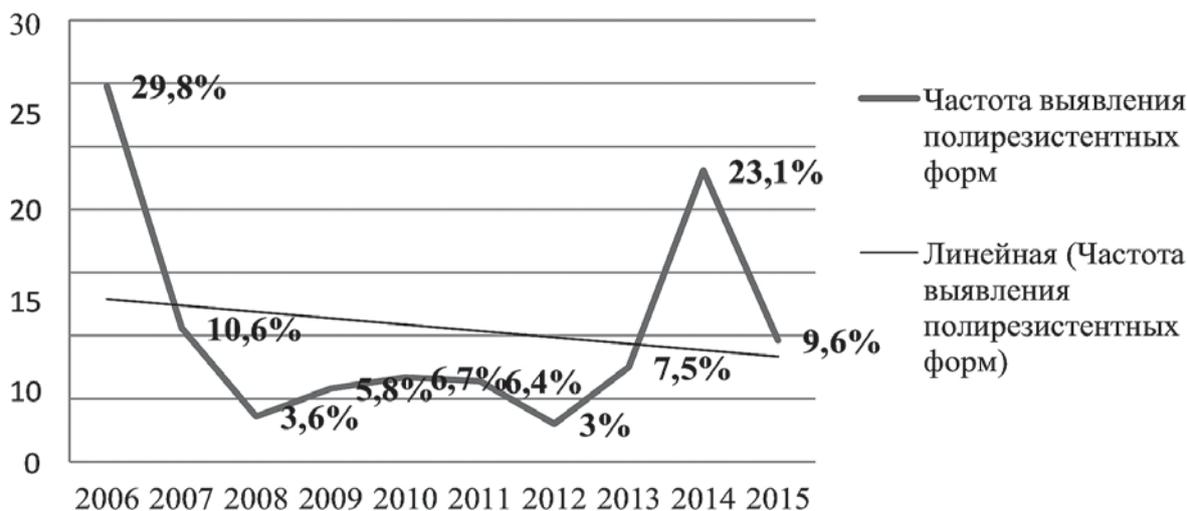


Рис.3. Частота выявления полирезистентных форм *U. urealyticum/parvum* в период с 2006-2015гг.

Ретроспективный анализ фенотипической резистентности клинических изолятов *U. urealyticum/parvum* показал, что наименее эффективными антибактериальными препаратами в отношении культур *U. urealyticum/parvum* оказались ципрофлоксацин (98,1% устойчивых культур), офлоксацин (27,7% устойчивых культур) и эритромицин (9,5% резистентных культур). Высокой активностью в отношении уреоплазм обладали кларитромицин (0,5 % резистентных культур), джозамицин (0,2 %), рокситромицин (1,5 %), мидекамицин (0,7 %). Анализ спектров резистентности уреоплазм показал большое разнообразие комбинаций детерминант устойчивости, выявлено более 40 вариантов. Преобладали культуры *U. urealyticum/parvum*, содержащие детерминанты устойчивости к 2-3 антибактериальным препаратам.

На протяжении всего периода мониторинга фенотипической резистентности уреоплазм наблюдается их высокая устойчивость к препаратам фторхинолонового ряда, однако с 2012 года наблюдается снижение частоты выявления культур уреоплазм, устойчивых к офлоксацину, что скорее всего связано с изменением тактики лечения больных. В последние годы (с 2013 г.) отмечается рост количества штаммов, обладающих резистентностью к препаратам тетрациклинового ряда и макролидам, что объясняется широким применением данных препаратов в лечении различных воспалительных заболеваний урогенитального тракта и функций репродукции. В ходе исследования обнаружена высокая частота выявления антибиотикорезистентных форм *U. urealyticum/parvum* как у женщин с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта, так и у мужчин 86,3% и 80,9% соответственно.

Анализ структуры антибиотикорезистентности за весь период наблюдений (2006-2015гг.) показал, что наибольшее количество штаммов уреоплазм как у женщин, так и у мужчин характеризовались устойчивостью к 1-2 препаратам (78% и 75,3% соответственно), полирезистентные штаммы (устойчивые к 3-м и более препаратам) составили 8,3% у женщин и 5,6% у мужчин (Рис.4,5).

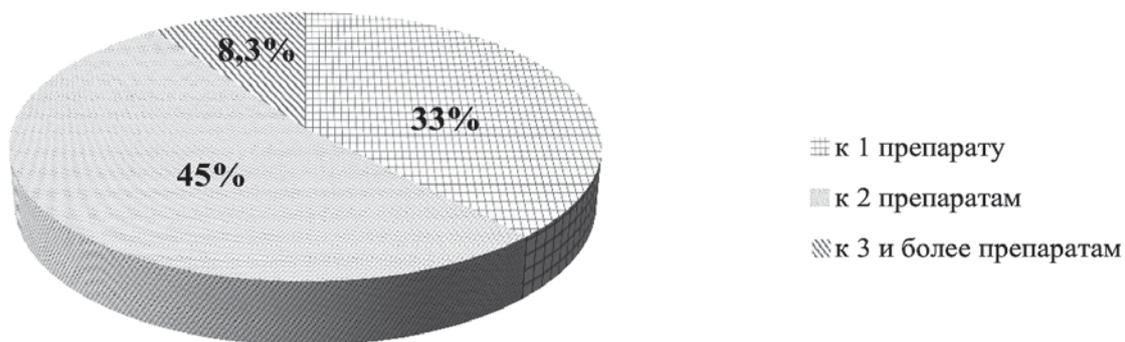


Рис.4. Структура антибиотикорезистентности *U. urealyticum/parvum*, выделенных у женщин с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта.

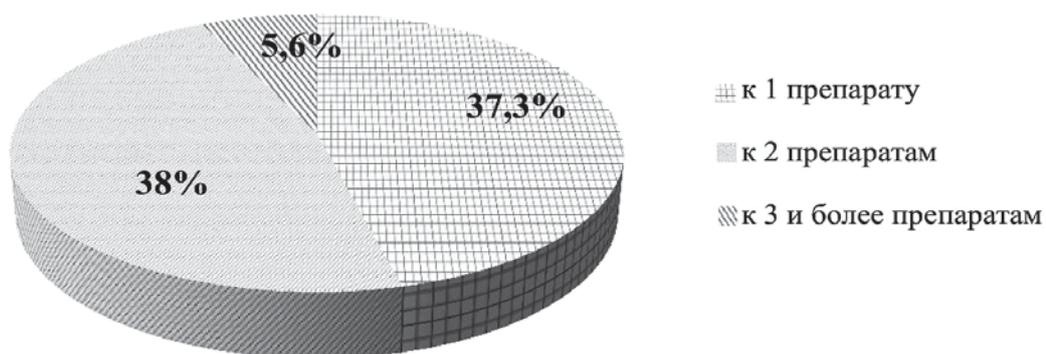


Рис.5. Структура антибиотикорезистентности *U. urealyticum/parvum*, выделенных у мужчин с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта.

Полученные результаты об антибиотикорезистентности клинических изолятов *U. urealyticum/parvum* совпадают с данными литературы, подтверждающими высокий уровень их устойчивости [5,11,12]. Формированию антибиотикорезистентности уреоплазм способствует большое количество мобильных элементов, участвующих в обмене и переносе генетических детерминант устойчивости между филогенетически неродственными видами бактерий, а также за счет мутационных изменений в генах, ответственных за антимикробную резистентность.

В ходе работы показано, что клинические изоляты *M.hominis* оказались более чувствительными к антибиотикам, чем уреоплазмы. При определении их резистентности к 7 препаратам (доксциклину, клиндамицину, мидекамицину, джозамицину, ципрофлоксацину, гентамицину, офлоксацину) устойчивые культуры составили 10 %. Анализ структуры резистентности к антибиотикам показал, что устойчивость микоплазм как у женщин, так и у мужчин с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта, как правило, наблюдалась к 1-2 препаратам (8,8% и 9,6% соответственно) и редко была множественной на протяжении всего периода исследований (Рис.6,7).

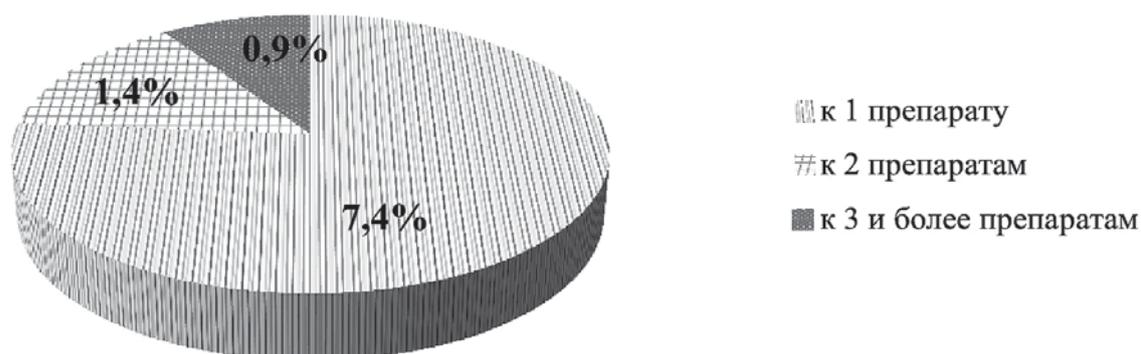


Рис.6. Структура антибиотикорезистентности *M. hominis*, выделенных у женщин с воспалительными заболеваниями уrogenитального тракта.

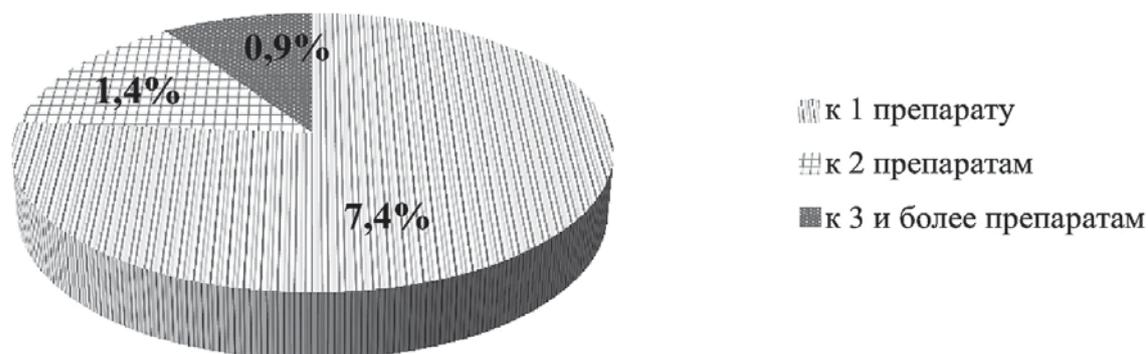


Рис.7. Структура антибиотикорезистентности *M. hominis*, выделенных у мужчин с воспалительными заболеваниями уrogenитального тракта.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все 7 препаратов могут быть использованы при лечении воспалительных заболеваний уrogenитального тракта, обусловленных *M. hominis*. Препаратами выбора являются мидекамицин и джозамицин. Спектры антибиотикорезистентности *M. hominis* были менее разнообразными, чем *U. urealyticum*, что свидетельствует о высокой степени чувствительности микоплазм к антибиотикам, применяемым для их элиминации.

В штаммах уреоплазм и микоплазм, охарактеризованных фенотипически, был проведен поиск генетических детерминант резистентности к макролидам (эритромицин) и тетрациклинам (доксциклин) методом ПЦР.

Установлена высокая (90%) частота обнаружения генетических детерминант устойчивости к препаратам тетрациклинового ряда, что обусловлено содержанием у микоплазм и уреоплазм «tet-M» детерминанты. Частота выявления генетических детерминант резистентности к макролидам у уреоплазм и микоплазм в 98% случаев совпала с показателями фенотипической резистентности.

Таким образом, многолетний (с 2006 по 2015гг.) мониторинг позволил получить новые знания о распространенности фенотипической устойчивости генитальных микоплазм к антимикробным препаратам, наиболее часто, применяемым в терапии инфекций, обусловленных *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum/parvum*. Дальнейшая работа по изучению механизмов фено-

типической и генетической резистентности открывают новые перспективы в разработке рациональной стратегии антибиотикотерапии заболеваний, обусловленных *M. hominis* и *Ureaplasma urealyticum/parvum* контролировать ее эффективность и при необходимости вносить коррективы.

#### **Выводы:**

1. Многолетний мониторинг (2006-2015 гг.) антибиотикорезистентности генитальных микоплазм, выделенных у женщин и мужчин с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта, позволил выявить высокую частоту распространения антибиотикорезистентных форм. 86% выявленных культур *U. urealyticum/parvum* и 10% *M. hominis* оказались устойчивыми к действию 1 и более антибактериальных препаратов.

2. Показано, что частота выявления полирезистентных штаммов уреоплазм варьировала в течение всего периода наблюдений от 3% до 29,8%. С 2014 г. наметилась тенденция к снижению данного показателя.

3. Установлено, что наименее эффективными антибактериальными препаратами в отношении культур *U. urealyticum/parvum* оказались препараты фторхинолонового ряда (ципрофлоксацин и офлоксацин), эритромицин.

4. Анализ структуры антибиотикорезистентности за весь период наблюдений (2006-2015 гг.) показал, что наибольшее количество штаммов уреоплазм как у женщин, так и у мужчин характеризовались устойчивостью к 1-2 препаратам (78% и 75,3% соответственно), полирезистентные штаммы (устойчивые к 3-м и более препаратам) составили 8,3% у женщин и 5,6% у мужчин.

5. Выявлено, что спектры резистентности уреоплазм по сравнению с микоплазмами характеризовались большим разнообразием комбинаций детерминант устойчивости, обнаружено более 40 вариантов.

6. При лечении воспалительных заболеваний органов урогенитального тракта препаратами выбора являются мидекамицин, джозамицин, кларитромицин, рокситромицин.

#### **Литература:**

1. Виноградова К. А. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистенция, ее объем, разнообразие и развитие / К. А. Виноградова, В. Г. Булгакова, А. Н. Полин, П. А. Кожевин // Ж. Антибиотики и Химиотерапия. – 2013. – Т. 58. - №5 - 6. - С. 38 - 48.

2. Гависова А. А. Современный взгляд на проблему уреоплазменной инфекции / А. А. Гависова, М. А. Твердикова, В. Л. Тютюнник // Ж. Эффективная фармакотерапия. – 2013. - №18. – С8-13.

3. Герасимова Н. А. К вопросу о дискордантных результатах выявления *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* молекулярно - биологическим и культуральным методами у пациентов с урогенитальными заболеваниями / Н. А. Герасимова, Н. П. Евстигнеева, Н. В. Зильберберг, А. Е. Гушин // Ж. Фундаментальные исследования. – 2014. - № 10. – С. 487-492.

4. Рахматулина М.Р. Современные представления о генетической вариабельности генитальных микоплазм и их роли в развитии воспалительных заболеваний мочеполовой системы / М.Р. Рахматулина, С. В. Кириченко // Ж. Вестник дерматологии и венерологии. – 2013. -№ 3. – С. 17 – 25.

5. Савичева А. М. Современные представления о генитальных микоплазмах / А. М. Савичева // Ж. Мать и дитя. - 2010. – Т. 18. - № 4. – С. 183 - 186.

6. Фофанова И. Ю. Современные представления об урогенитальной микоплазменной инфекции / И. Ю. Фофанова, В. Н. Прилепская // Ж. Гинекология. -2014. - Т. 16 - № 2. –С4-8.

7. Дымов А. М. Обзор результатов клинических исследований лекарственного препарата ЭСПАРОКСИ в лечении негонококкового уретрита у мужчин / А. М. Дымов, К. Л. Локшин // Ж. Эффективная фармакотерапия. – 2012. -№ 43. – С.10 – 13.

8. Лысенко О. В. Распространенность воспалительных заболеваний мочеполовых органов, ассоциированных с генитальными микоплазмами. Эффективность лечения / О. В. Лысенко, Т.В. Кузнеценкова, В. А. Игликов, В. П. Дерябина // Ж. Вестник дерматологии и венерологии. – 2010. -№ 2. – С. 83 - 88.

9. Потатуркина-Нестерова Н.И. Патогенный потенциал микоплазм, эпидемиологически ассоциированных с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта / Н. И. Потатуркина -

Нестерова, И.С. Немова, А.М. Магомедова, А.С. Нестеров // Ж. Фундаментальные исследования. - 2012. - № 1-1. - С. 89 - 92.

10. Светличная Т. Г. Клинико-эпидемиологическая характеристика хламидийной и микоплазменной инфекции как факторов риска сексуального и репродуктивного здоровья / Т.Г. Светличная, И.Г. Мосягин, С.В. Губерницкая // Ж. Экология человека. – 2012. - № 2. – С. 40 – 46.

11. Летяева О. И. Вопросы антибактериальной терапии воспалительных заболеваний урогенитального тракта, ассоциированных с микоплазменной инфекцией, у женщин репродуктивного возраста / О.И. Летяева // Ж. Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. – 2012. - № 4. – С. 30 – 37.

12. Херувимова Е. С. Изучение уровня чувствительности генитальных микоплазм к действию антибактериальных препаратов различной природы / Е. С. Херувимова, В. Г. Артюхов, С.Г. Резван // ВЕСТНИК ВГУ, СЕРИЯ: ХИМИЯ. БИОЛОГИЯ. ФАРМАЦИЯ. – 2010. - № 2. – С. 115 – 119.

## **РАЗРАБОТКА ДНК-МИКРОЧИПА ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ЭКСПРЕССИИ МРНК ОСНОВНЫХ УЧАСТНИКОВ АПОПТОЗ-АССОЦИИРОВАННОГО СИГНАЛИНГА**

**Князев Д.И., Сахарнов Н.А., Цветкова В.Д., Солнцев Л.А.,  
Бруснигина Н.Ф., Уткин О.В.**

*ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

### **Введение**

Апоптоз – фундаментальный биологический процесс, участвующий в поддержании клеточного гомеостаза и функционирования иммунной системы. В инициации внешнего пути апоптоза принимают участие поверхностные молекулы, называемые «рецепторами смерти». У человека идентифицировано 6 «рецепторов смерти»: Fas, TNFR-1, DR3, DR4, DR5, DR6. Они характеризуются разными паттернами экспрессии в зависимости от типа клеток и их функционального состояния. Стимуляция «рецепторов смерти» сопровождается изменением состава и уровня представленности про- и анти-апоптотических факторов, что определяет баланс в системе пролиферация/апоптоз и имеет функциональное значение, как в норме, так и при заболеваниях разного генеза. Важной характеристикой участников рецептор-опосредованного сигналинга является наличие широкого спектра форм, образующихся в результате альтернативного сплайсинга и выполняющих разные функции. Таким образом, репертуар и количественное соотношение сплайсированных вариантов мРНК участников рецептор-опосредованного сигналинга играет важную роль в процессах регуляции апоптоза и реализации иммунного ответа.

Комплексное изучение транскриптома требует использования высокопроизводительных и точных методов. Такие методы как ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени сопряжены с большими время- и трудозатратами, позволяют анализировать лишь несколько генов в рамках одного эксперимента, однако являются «золотым стандартом» точности. Одним из методов изучения транскриптома являются ДНК-микрочипы, обеспечивающие приемлемое сочетание между производительностью, стоимостью исследования и точностью получаемых результатов.

Чувствительность и специфичность анализа, выполняемого с применением ДНК-микрочипов, зависит от эффективности гибридизации зондов с целевой нуклеиновой кислотой, которая в наибольшей степени определяется размером и нуклеотидным составом самих зондов. Однако локализация участков гибридизации сплайсинг-чувствительных зондов оставляет минимум степеней свободы для подбора зондов, оптимальных с точки зрения термодинамических параметров, влияющих на эффективность гибридизации [1]. Именно поэтому размер и нуклеотидный состав сплайсинг-чувствительных зондов может варьироваться лишь в минимальной степени, не позволяя достигнуть удовлетворительной чувствительности анализа. Выходом из данной ситуации

является введение спейсерного участка, что позволяет достигать более чем 100-кратного роста эффективности гибридизации [2,3]. Следует отметить, что увеличение длины спейсера может сопровождаться уменьшением специфичности гибридизации [4], а также снижением ее эффективности [3] вследствие образования вторичных структур внутри зонда и взаимодействия соседних зондов.

Целью работы явилась разработка ДНК-микрочипа для мультиплексного анализа экспрессии сплайсированных вариантов мРНК рецепторов смерти и ассоциированных с ними элементов внутриклеточного сигналинга в разных типах клеток человека. Были сформулированы следующие задачи:

Разработать дизайн и сконструировать ДНК-микрочипы путём синтеза пула зондов со спейсерными поли-Т-вставками различной длины на поверхности полупроводниковых слайдов (CustomArray Blank Slides);

Провести апробацию сконструированных ДНК-микрочипов для качественной и количественной оценки изменений состава сплайсированных вариантов мРНК ключевых участников апоптоз-ассоциированного сигналинга в крови и субпопуляциях Т-лимфоцитов.

### Материалы и методы

**Подбор зондов.** Был разработан алгоритм селекции зондов в системе Matlab (США) с пакетом расширений Bioinformatics Toolbox и Parallel Computing Toolbox [5]. Требования к зондам: зонд ориентирован на стыки экзонов, что позволяет выявлять только мРНК; длина зонда от 24 до 39 нуклеотидных оснований (н.о.); температура плавления 63-68°C; содержание GC от 48 до 84%; количество гомоповторов не более 5 н.о.; зонд не должен образовывать шпильки с  $\Delta G$  ниже -6 кДж/моль; зонд не должен полностью встречаться в соответствующем гене; процент сходства был установлен на отметке 67% (т.е. для зонда длиной 24 н.о. допускалось нахождение в хромосоме части этого зонда длиной не более 18 н.о.). К каждой сплайсированной форме мРНК подбирались уникальные зонды. Однако высокая степень сходства сплайсированных вариантов мРНК одного гена (например, DR3) не позволила полностью решить поставленную задачу. Поэтому при поиске учитывались зонды, позволяющие детектировать более одной сплайсированной формы мРНК в пределах одного гена (группирующие зонды). Проведен анализ 185 генов ключевых участников апоптоз-ассоциированного сигналинга. Общее число кандидатов в зонды исходно составляло 65374567. Для синтеза на биочипе отобрано 7208 зондов, детектирующих 1134 сплайсированных варианта мРНК.

**Дизайн и конструирование ДНК-микрочипов.** Поли-Т-спейсер добавлялся с 3'-конца зонда проксимально к поверхности полупроводникового слайда (далее – заготовки). Каждая заготовка – CustomArray Blank Slide 12K – позволяет проводить параллельный синтез 12544 зондов на своей поверхности – *in situ*. Максимальная протяжённость зонда, синтезируемого на данной платформе, составляет 45 н.о. Зонды синтезировались в нескольких вариантах и объединялись в группы на основе исходной длины и размера поли-Т-спейсера (табл. 1). На микрочипе группы зондов были отделены друг от друга (рис.1), и в дальнейшем гибридизация каждой группы проводилась в пространстве обособленно.

Таблица 1.

Группы зондов

№ группы	Исходная длина зонда, н.о.	Длина поли-Т-спейсера, н.о.	Количество целевых зондов	Количество зондов отрицательного контроля
1	24-39	0	7208	1280
2a	24-27	6	1986	190
2b	24-27	10	1986	190
2c	24-27	14	1986	190
2d	24-27	18	1986	190
3a	28-31	6	2005	160
3b	28-31	10	2005	160
3c	28-31	14	2005	160
4a	32-35	6	1760	200
4b	32-35	10	1760	200
5a	36-39	6	1457	320

Синтез зондов осуществлялся с применением модифицированного амидофосфитного метода на платформе CustomArray (США) [6]. Постсинтетическую обработку – снятие защитных групп с азотистых оснований и 2-цианэтильных групп с межнуклеозидных фосфатов – проводили обработкой чипов 50% раствором этилендиамина в этаноле при 65°C в течение 1,5 часов.

*Исследуемые образцы.* Для тестирования экспериментальных ДНК-микрочипов были использованы: а) пулированный образец тотальной РНК, экстрагированной из крови здоровых волонтеров; б) экстрагированная тотальная РНК CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, выделенных из периферической крови методом магнитной иммуносепарации.

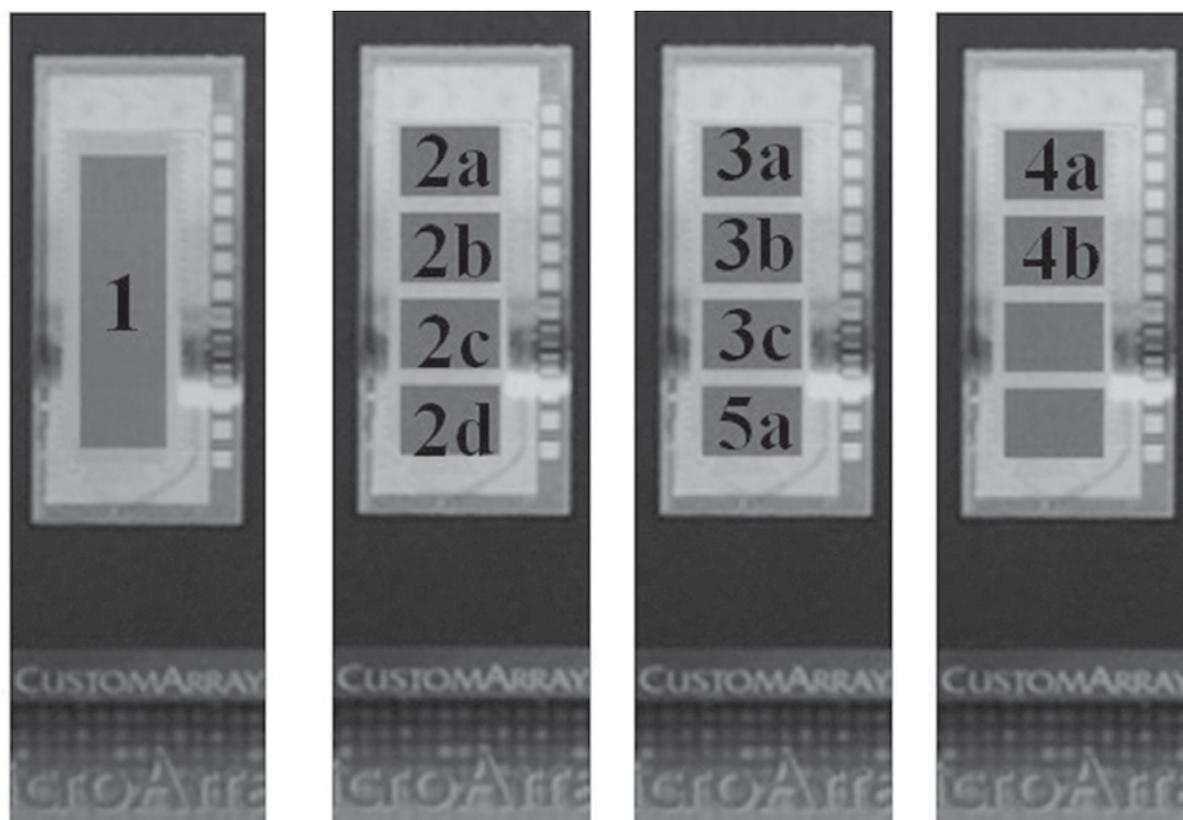


Рис. 1. Расположение групп зондов на микрочипах.

*Выделение и культивирование Т-лимфоцитов.* Материалом для исследования явились образцы периферической крови в количестве 20 мл. Фракцию мононуклеарных клеток периферической крови выделяли в градиенте плотности Гистопак ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ , «Sigma», США). Выделение субпопуляций Т-лимфоцитов проводили методом магнитной иммуносепарации с помощью наборов серии «EasySep» («Stemcell Technologies», Великобритания). Чистота выделения CD8<sup>+</sup> Т-клеток составила 95–99%. Выделенные Т-лимфоциты культивировали в концентрации  $1 \cdot 10^6$  кл/мл в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («РАА Laboratories», Австрия) и 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Активацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток проводили с помощью липополисахарида (ЛПС) *E. coli* («Sigma», США) в концентрации 10 мкг/мл в течение 20 часов. Клетки, не подвергавшиеся активации ЛПС, культивировали в аналогичных условиях и использовали в качестве контроля.

*Подготовка амплифицированной РНК (аРНК) для гибридизации.* Выделение мРНК из 200 мкл цельной крови или культуры клеток проводили с помощью набора «Магносорб» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Обратная транскрипция проводилась с использованием обратной транскриптазы Mint, входящей в набор реактивов для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) («Евроген», Россия). Количество тотальной РНК, используемой в реакции, составляло 1,5-1,8 мкг. В каче-

стве затравки для синтеза кДНК использовали олигонуклеотид, содержащий промотор T7-РНК-полимеразы (для последующей *in vitro* транскрипции) и поли-Т-участок для селекции поли-А-мРНК. Для ПЦР-амплификации в состав кДНК с 3'-конца была введен специфический адапторный участок в качестве сайта для отжига праймера. Амплификация двуцепочечной кДНК (дц-кДНК) осуществлялась с применением смеси полимераз Encyclo («Евроген», Россия). Программа амплификации включала предварительную денатурацию при 95°C - 1 мин, а также 15 рабочих циклов (95°C - 25 сек; 60°C - 25 сек; 72°C - 6 мин). Амплифицированную кДНК очищали из реакционной смеси с помощью набора реагентов CleanUp Standart («Евроген», Россия) и концентрировали с применением 3М AcONa pH 5,0, а также гликогена (финальная концентрация 0,05-0,1 мкг/мкл смеси) и изопропанола. Концентрированная очищенная дц-кДНК (2-2,5 мкг), содержащая промотор T7, использовалась в качестве матрицы для *in vitro* транскрипции с помощью T7 РНК-полимеразы («Thermo Scientific», ЕС). В состав аРНК была введена биотиновая метка путём замены половины количества уридин-трифосфата (UTP) на его биотинилированный аналог Bio-12-UTP («ДНК-синтез», Россия) в реакционной смеси. Меченая аРНК была очищена и сконцентрирована с помощью набора реагентов GeneJet Micro («Thermo Scientific», ЕС). Таким образом, полученная аРНК была обратно-комплементарна мРНК в исследуемом образце и на 5'-конце содержала поли-Т-участок, обратно-комплементарный поли-А-участку на 3'-конце мРНК.

*Гибридизация, отмывка, считывание сигнала.* Перед гибридизацией биотин-меченая аРНК была фрагментирована путём инкубации при 95°C в течение 20 минут в растворе следующего состава с итоговой pH 8,1: 40мМ Трис-ацетат, 100мМ AcOK, 30мМ (AcO)<sub>2</sub>Mg. Группа зондов №1 (табл.1) была гибридизована с 4,5 мкг аРНК, тогда как остальные группы зондов гибридизовались с 1,1 мкг аРНК каждая в растворе, содержащем 6xSSPE, 20мМ EDTA, 0,05% Твин-20, 0,04% SDS, 25% об. формамида при 40°C в течение 18 часов. В дальнейшем микрочипы промывались серией растворов: 3xSSPE, 0,05% Твин-20 → 0,5xSSPE, 0,05% Твин-20 → 2xPBS 0,1% Твин-20. После этапа промывки введение авидин-конъюгированной пероксидазы хрена и процессинг чипа осуществлялись с помощью набора реагентов ElectraSense Detection Kit (США). Квантификация сигнала гибридизации зондов с аРНК проводилась амперометрическим методом с применением устройства ElectraSense Reader (США). Снятие связанной аРНК с зондов для проведения повторной гибридизации проводили с использованием набора CustomArray Stripping Kit (США).

*Обработка данных.* Обработка данных проведена в оболочке Excel 2010. Уровень сигнала зондов отрицательного контроля в каждой группе был усреднён. Уровень сигнала целевых зондов был конвертирован в условные единицы (Z) следующим образом:

$$Z_i = [I_i - (B + 2SD_B)] / SD_B,$$

где  $I_i$  – уровень сигнала  $i$ -го зонда,  $B$  – усреднённый уровень сигнала зондов отрицательного контроля,  $SD_B$  – стандартное отклонение сигнала зондов отрицательного контроля. Таким образом, одна условная единица  $Z$  была эквивалентна уровню стандартного отклонения фона. Детекция аРНК считалась успешной при сигнале соответствующего зонда  $Z \geq 1$ , т.е. не ниже  $B + 3SD_B$ .

### **Результаты и обсуждение**

*Выбор оптимальной длины спейсера.* Основной целью введения спейсера является повышение чувствительности анализа за счёт роста эффективности гибридизации, что обусловлено снятием стерических ограничений за счёт отдаления зонда от поверхности чипа. Полученные результаты согласуются с результатами предыдущих исследований [2, 3, 4, 7] – увеличение длины спейсера вело к росту эффективности гибридизации. Однако параллельно с этим может наблюдаться снижение специфичности гибридизации [4] путём комплементарного связывания зонда с целевой аРНК лишь частью своей последовательности, что приводит к образованию стабильного гетеродуплекса.

Рост длины спейсера вне зависимости от типа гибридизуемого образца вёл к увеличению уровня и разброса сигнала зондов отрицательного контроля, что, по-видимому, обусловлено ростом локальной концентрации аРНК у поверхности микрочипа за счёт смещения химического равновесия «диссоциация ↔ связывание» вправо. Доля зондов, детектировавших целевую аРНК

(«сработавших»), была наиболее стабильна при спейсере длиной 10 н.о. и составляла 10-13% (табл. 2).

Таблица 2.

Распределение зондов по уровню сигнала в зависимости от образца и длины спейсера

Спейсер, н.о.	Сработавшие зонды, % от общего числа			Зонды с сигналом гибридизации $Z>5$ , % от числа сработавших		
	кровь	CD8 <sup>+</sup> - контроль	CD8 <sup>+</sup> ЛПС	кровь	CD8 <sup>+</sup> - контроль	CD8 <sup>+</sup> ЛПС
0	11,63			12,17		
6	4,02	12,72	10,27	57,24	38,79	34,19
10	11,74	13,13	10,21	64,54	45,96	46,17
14	99,97	74,29	58,61	100	49,24	38,01
18	100	100	100	100	100	100

Наиболее выраженный рост доли сработавших зондов наблюдался при переходе спейсера от 10 к 14 н.о. В свою очередь, все зонды со спейсером 18 н.о. давали положительный сигнал, что позволяет сделать вывод о значительном вкладе неспецифической гибридизации в итоговый уровень сигнала зонда.

Сигнал гибридизации вблизи порога детекции  $Z=1$  позволяет однозначно сделать лишь качественный вывод о наличии исследуемой мРНК в биологическом образце. В свою очередь, обработка сигналов с относительно низким  $Z=1$  может приводить к очень большим «скачкам» экспрессии исследуемой мРНК между биологическими образцами. Соответственно, для полуколичественной оценки изменения экспрессии генов наибольший интерес представляют зонды с относительно высоким нормированным сигналом гибридизации ( $Z>5$ ). Наиболее стабильной и относительно высокой долей с сигналом  $Z>5$  среди всех сработавших зондов характеризовались таковые с 10-нуклеотидным поли-Т-спейсером. Таким образом, оптимальной длиной 3'-спейсерного участка, обеспечивающей удовлетворительное сочетание чувствительности и специфичности анализа, была признана длина 10 н.о. Дальнейший анализ качественных и количественных изменений экспрессии мРНК проводили на зондах с данным спейсером.

*Качественный анализ.* Встречаемость мРНК апоптоз-ассоциированных генов сопоставляли у всех трёх образцов – кровь, контрольные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, культивированные в присутствии ЛПС. Из 185 исследуемых генов во всех трёх типах образцов детектировано 167 генов (рис. 2). Наибольшим разнообразием апоптоз-ассоциированных мРНК характеризовалась кровь, где была обнаружена мРНК 149 генов, а в контрольных и ЛПС-культивированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах – 135 и 115 генов, соответственно. При этом большинство генов, чьи мРНК детектировались, были общими для всех трёх типов образцов – 99 генов. В свою очередь, число генов, экспрессированных лишь в одном типе образца, было незначительным: 23 гена экспрессировались только в крови, а 5 и 6 генов экспрессировались в контрольных и ЛПС-культивированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах, соответственно (рис. 2).

*Полуколичественный анализ.* Поскольку периферическая кровь содержит очень гетерогенный пул мРНК, продуцируемых разными типами клеток, полуколичественный анализ экспрессии мРНК проводили, сравнивая только контрольные и ЛПС-стимулированные группы CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

В клетках, стимулированных ЛПС, на высоком уровне детектировался сигнал зонда, выявляющего мРНК минорной мембранной формы FasL с делецией 2 экзона, предположительно проявляющей антиапоптотические свойства. Экспрессия мРНК TL1A (лиганда рецептора DR3) детектировалась на минимальном уровне в контрольных Т-лимфоцитах и не была обнаружена после активации с ЛПС. В ЛПС-стимулированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах наблюдалось снижение экспрессии мРНК некоторых рецепторов смерти.

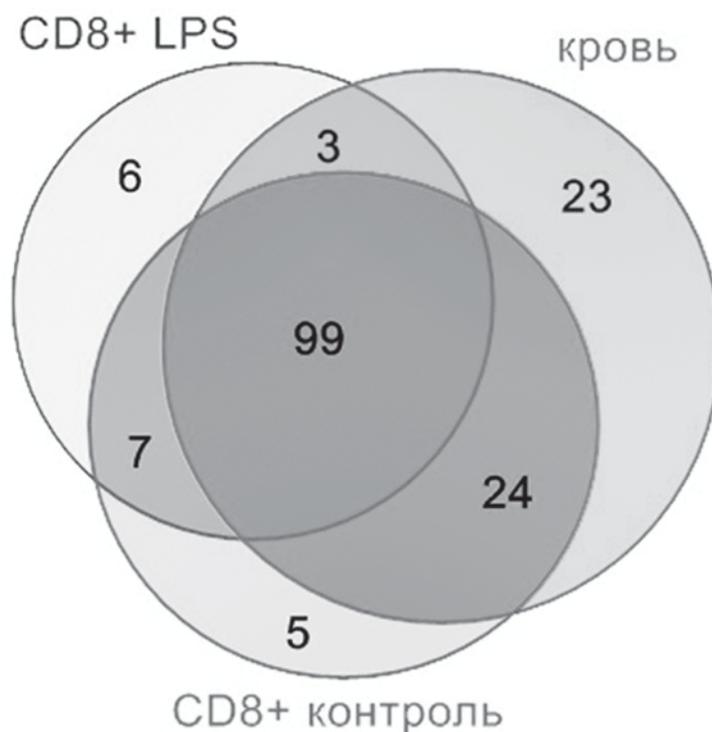


Рис. 2. Встречаемость мРНК 185 апоптоз-ассоциированных генов в трех типах образцов.

Так уровень мРНК TNFR1 снижался незначительно, уровень мРНК DR5 снижался в 3 раза, а уровень мРНК DR6 падал ниже порога детекции. Выявлен высокий сигнал зонда, детектирующего мРНК растворимой формы DR3, содержащей делецию 6 экзона и выполняющей антиапоптотическую функцию.

Уровни мРНК элементов апоптоз-индуцирующего комплекса (DISC) были также снижены: по сравнению с контролем уровень мРНК адаптера FADD снижался в 2,5 раза, а уровень мРНК проксимальной каспазы-8 – в 1,4 раза. При этом экспрессия мРНК cFLIP, ингибитора проксимальных каспаз, также снижалась после стимуляции ЛПС в 1,7 раза. Схожим образом при ЛПС-активации снижалась экспрессия мРНК дистальной каспазы-7 (в 10 раз), а уровни экспрессии мРНК ингибиторов дистальных каспаз XIAP и NIAP падали ниже порога детекции.

Интересной особенностью культивируемых в присутствии ЛПС CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов являлся высокий уровень сигнала зондов, детектирующих мРНК адаптеров TRAF-2 и RIP-1, тогда как в контроле данные мРНК обнаружены не были. Известно, что TRAF-2 и RIP-1 задействованы в инициации пролиферативного и антиапоптотического сигналинга лимфоцитов [8-11].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что стимуляция изолированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с ЛПС сопровождается изменением состава и уровня экспрессии некоторых сплайсированных вариантов мРНК, что приводит к смещению динамического равновесия в сторону реализации антиапоптотического сигналинга. Это подтверждается результатами, полученными с помощью метода проточной цитофлуориметрии, согласно которым, культивирование CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с ЛПС не приводит к изменению процента клеток в стадии раннего и позднего апоптоза [12].

Таким образом, в ходе настоящей работы был разработан дизайн и изготовлена серия экспериментальных ДНК-микрочипов для оценки экспрессии мРНК 185 апоптоз-ассоциированных генов и их сплайсированных вариантов. Установлено, что удовлетворительным сочетанием между чувствительностью и специфичностью обладают зонды с 10-нуклеотидным 3'-поли-Т-спейсером. Анализ апоптоз-ассоциированного транскриптома CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с использо-

ванием ДНК-микрочипов выявил согласованность результатов, полученных с использованием данного метода и метода проточной цитофлуориметрии.

Литература:

1. Srinivasan K., Shiue L., Hayes J.D. et al. Detection and measurement of alternative splicing using splicing-sensitive microarrays // *Methods*. 2005. v. 37. p. 345–359.
2. Guo Z., Guilfoyle R.A., Thiel A.J. et al. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports // *Nucleic Acids Res.* v.22. p.5456-5465.
3. Shchepinov M.S., Case-Green S.C. Southern E.M. Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. // *Nucleic Acids Res.* 1997. v.25. p.1155-1161.
4. Poulsen L., Sise M.J., Snakenborg D. et al. Multi-stringency wash of partially hybridized 60-mer probes reveals that the stringency along the probe decreases with distance from the microarray surface // *Nucleic Acids Res.* 2008. v. 36(20). e132.
5. Солнцев Л.А., Старикова В.Д., Сахарнов Н.А. и др. Стратегия подбора зондов для изучения совокупности мРНК участников рецептор-опосредованного сигналинга апоптоза // *Молекулярная биология*. 2015. т. 49. №3. с. 515-524.
6. URL:[http://www.customarrayinc.com/products\\_arrays.htm](http://www.customarrayinc.com/products_arrays.htm)
7. Peplies J., Glockner F.O., Amann R. Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003 v.69. p.1397-1407.
8. Nehlgans T., Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games // *J. Immunol.* 2005. v. 115. p. 1-20.
9. Блохин Д.Ю. Соколовская А.А., Михайлов А.Д. и др. CD95-индуцированный апоптоз и мультирезистентный фенотип Т-лимфобластных клеток человека. / *Росс. биотерап. ж.* 2003. №3.с. 37-46.
10. Уткин О.В., Новиков В.В. Регуляция апоптоза с помощью альтернативного сплайсинга матричной РНК. *Росс. биотерап. ж.* 2007. т.6. №2, с.13-20.
11. Schütze S., Tchikov V., Schneider-Brachert W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization.//*Nat. Rev. Mol.Cell Biol.* 2008. v. 9(8). p. 655-662.
12. Филатова Е. Н., Анисенкова Е. В., Преснякова Н. Б. и др. Оценка проапоптотической активности липополисахарида в изолированных субпопуляциях Т-лимфоцитов человека // *Инфекция и иммунитет* 2014. т. 4. №4. с. 347-352.

## **ВЛИЯНИЕ ФИЛЬТРАТОВ БУЛЬОННЫХ КУЛЬТУР *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ БАКТЕРИЯМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

**Крестова Е.И.<sup>1</sup>, Игнатова Н.И.<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, Нижний Новгород; <sup>2</sup>ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, Нижний Новгород*

На сегодняшний день известно, что около 60% бактериальных инфекций человека ассоциированы с процессом образования биопленки [1]. Биопленка является структурированным сообществом одного или нескольких видов бактерий, ассоциированных с какой-либо поверхностью и окруженных органическим полимерным матриксом. [2-4]. Чаще всего биопленки ассоциированы с медицинскими приспособлениями (катетерами и др.) и хроническими заболеваниями, такими как муковисцидоз, средний отит, патология зубов и околозубных тканей, инфекции мочевыводящих путей, вызванными одним из лидеров биопленкообразования – синегнойной палочкой (*Pseudomonas aeruginosa*) [5-8].

Внутри биопленки микроорганизмы имеют возможность приобретать свойства, отсутствующие

щие у свободных (планктонных) форм, такие как повышенная устойчивость к антибактериальным препаратам и способность ускользать от эффекторов иммунитета [9,10]. В настоящее время появляются препараты, способные оказывать разрушающее действие на биопленку (некоторые антибиотики, муколитики, ферменты) и помогающие работать противомикробным средствам [11,12]. Однако разнообразие биопленочного матрикса, различная локализация инфекции в совокупности с бактериальной устойчивостью не позволяют окончательно решить проблему.

На наш взгляд, представляет интерес взаимоотношение бактериальных сообществ между собой и возможность использования их антагонизма в борьбе с биопленочными инфекциями. В связи с этим, целью работы явилось изучение влияния метаболитов золотистого стафилококка (*S. aureus*) на биопленку, образованную *P. aeruginosa*.

#### **Материалы и методы**

Бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* (штамм 485) культивировались в среде LB 24 часа при 37°C. Далее в стерильных условиях трижды отмывали взвесь бактерий раствором Хенкса без индикатора и разводили бульоном LB до показателя мутности 0,7 на приборе DensiLaMeter II (ERBA Lachema, Чехия). Полученную взвесь наслаивали на поверхность лунок 12-луночных планшетов (Costar, США) и инкубировали 48 часов при 37°C в присутствии фильтрата бульонных культур *Staphylococcus aureus* (штаммы 5983/2, 18А, 5663, 5583). Бактерии вида *S. aureus* выращивали на среде ТСБ (трипсинизированный соевый бульон) с 1% глюкозой. Бульонные культуры стафилококков стандартизовали по количеству бактериальных клеток ( $10^6$  КОЕ) и пропускали через бактериальный фильтр, задерживающие частицы более 0,45 мкм в диаметре. Биопленку *P. aeruginosa* осторожно отмывали раствором Хенкса и добавляли к ней фильтраты штаммов стафилококка. В позитивном контроле использовали препараты биопленок, в которые добавляли питательную среду ТСБ, а также лунки, не засеянные *P. aeruginosa* (негативный контроль). После культивирования среду осторожно удаляли, биопленку высушивали, окрашивали 0,1% раствором кристаллвиолета, тщательно отмывали. Краситель экстрагировали смесью этанол-изопропанол и измеряли оптическую плотность образцов на фотоэлектроколориметре при длине волны 540 нм. Результаты выражали в отн. свет. ед.

#### **Результаты и обсуждение**

По данным эксперимента, оптическая плотность негативного контроля (образец без *P. aeruginosa*) составила  $0,40 \pm 0,03$  отн. свет. ед., а позитивного контроля (рост биопленки без воздействия метаболитов) –  $1,43 \pm 0,02$  отн. свет. ед. Действие метаболитов *S. aureus* существенно влияло на формирование бактериального сообщества синегнойной палочки. Полученные данные оптической плотности составили  $0,71 \pm 0,05$  отн. свет. ед.;  $0,84 \pm 0,03$  отн. свет. ед.;  $0,91 \pm 0,04$  отн. свет. ед. и  $0,86 \pm 0,02$  отн. свет. ед. для штаммов 5983/2, 5663, 5583 и 18А соответственно ( $p=0,000000$ ,  $p=0,000000$ ,  $p=0,000000$ ,  $p=0,000000$ ). Из результатов видно снижение плотности *P. aeruginosa* на планшетах от 1,5 до 2 раз по сравнению с контролем, в зависимости от штамма стафилококка. Таким образом, показано, что фильтраты суточных культур *S. aureus* обладали способностью подавлять образование биопленки *P. aeruginosa*. Возможно, их активность могла быть связана с ферментами (ДНК-азой, протеазой и пр.), которые присутствуют среди продуктов метаболизма золотистого стафилококка. Поиск активных веществ метаболитов *S. aureus* оказавших влияние на формирование биопленки, требует дальнейшего исследования.

#### **Литература:**

1. Чеботарь, И.В. Лабораторная диагностика клинически значимых биопленочных процессов / Чеботарь, И.В., Гурьев, Е.Л. // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2015. – Т. 4. – № 14. – С. 15-20.
2. Романова, Ю.М. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / Романова, Ю.М., Гинцбург, А.Л. // Журн. микробиол. – 2011. – № 3. – С. 99-109.
3. Льюис, К. Персистирующие клетки и загадка выживания биопленок // Льюис, К. // Биохимия. – 2005. – Т. 70. – №2. – С. 327-336.

4. Kaplan, J. B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses / Kaplan, J. B. // *J. Dent. Res.* – 2010. – V. 86 (3). – P. 205-218.
5. Юдина, Н.А. Контроль биопленки в современной стратегии профилактики и лечения стоматологических заболеваний / Юдина Н.А., Курочкина, А.Ю. // *Стоматология.* – 2009. – № 3. – С. 77-81.
6. Gurung, J. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit / Gurung, J., Khyriem, A. B., Banik, A., Lyngdoh, W.V., Choudhury, B., Bhattacharyya, P. // *Indian Journal of Critical Care Medicine.* – 2013. – V. 17. – Issue 4. – P. 214-218.
7. Кондратьева, Е.И. Иммунизация больных муковисцидозом / Кондратьева, Е.И., Никонова, В.С. // *Педиатрия.* – 2014. – Т. 93. – № 4. – С. 94-106.
8. Маянский, А.Н. *Pseudomonas aeruginosa*: характеристика биопленочного процесса / Маянский, А.Н., Чеботарь, И.В., Руднева, Е.И., Чистякова, В.П. // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* – 2012. – № 1. – С. 3-8.
9. Tetz, G.V. Effect of DNAase and antibiotics on biofilm characteristics / Tetz, G.V., Artemenko, N.K., Tetz, V.V. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – V. 53 (3). – P. 1204-1208.
10. Alkawash, M.A., Soothill, J.S., Schiller, N.L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms / Alkawash, M.A., Soothill, J.S., Schiller, N.L. // *APMIS.* – 2006. – V. 114 (2). – P. 131-138.
11. Степанова, Т.А. Разработка средств борьбы с биопленками: изучение воздействия полисахаридных лиаз на матрикс биопленок, образуемых *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia* / Степанова, Т.А., Романова, Ю.М., Алексеева, Н.В. // *Лаборатория.* – 2010. – № 1. – С. 44-49.
12. Kolodkin-Gal, I. D-amino acids trigger biofilm disassembly / Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R., Losick, R. // *Science.* – 2010. – V. 328 (5978). – P. 627-629.

## **О СОВРЕМЕННЫХ ТЕНДЕНЦИЯХ В ПРОИЗВОДСТВЕ ЧУМНЫХ ВАКЦИН**

**Курилова А.А., Ковтун Ю.С., Катунина Л.С., Василенко Е.И.**

*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»  
Роспотребнадзора, Ставрополь*

Развитие генно-инженерных технологий и современные возможности прецизионной аттенуации позволяют отечественным и зарубежным ученым разрабатывать стратегии конструирования аттенуированных штаммов *Yersinia pestis*, направленные на уменьшение реактогенности и повышение иммуногенности создаваемых вакцинных препаратов. Однако конструирование рекомбинантных вакцин для специфической профилактики чумы затрудняет сложная система детерминации патогенных свойств возбудителя и недостаточно изученные механизмы его взаимодействия с организмом человека. В большинстве случаев выключение функциональной активности детерминант патогенности чумного микроба приводит к уменьшению протективной способности [1]. В настоящее время учеными достигнуты определенные успехи, но, несмотря на многочисленные исследования в области разработки новых средств специфической профилактики чумы, – рекомбинантных живых, химических, антиидиотипических, мукозальных, ДНК-вакцин, отмечается отсутствие близких перспектив разработки «неживых» вакцинных препаратов [1; 2; 3; 4; 5; 6]. Убитая чумная вакцина, как известно из литературных источников, не создает должной защиты от легочной чумы и требует 3-этапной иммунизации в течение 9 месяцев [7; 8; 9].

На данный момент признана несомненной эффективность применения живых вакцин, создающих полноценный грундиммунитет [10, 11]. Исследованиями отечественных ученых показано, что для специфической профилактики чумы наиболее эффективным препаратом противэпидемического значения является вакцина чумная живая из штамма EV, стимулирующая напря-

женный и эффективный поствакцинальный иммунитет [12; 13], используемая на территории Российской Федерации и стран СНГ в настоящее время. За многолетнюю практику применения данной вакцины осложненных случаев зарегистрировано не было [1]. Наличие липополисахарида (ЛПС) в составе клеточной стенки *Y. pestis* обуславливает высокую реактогенность вакцины *Y. pestis* EV НИИЭГ, что является существенным недостатком. Уменьшение побочного действия и повышение эффективности живой чумной вакцины остается актуальной проблемой [14].

С 1998 года в США прекращено производство чумной формализированной корпускулярной вакцины USP, применявшейся в некоторых зарубежных странах. В настоящее время осуществляется коммерческое (лицензированное) производство вакцины чумной живой из аттенуированного штамма Харбин в Индонезии, вакцины чумной жидкой инактивированной I.P. в Индии [10; 15]. Вакцину чумную живую сухую из вакцинного штамма чумного микроба EV линии НИИЭГ производят в Казахстане в РГКП «Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева», г. Алматы, в Российской Федерации в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора и в Научно-исследовательском центре ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» МО РФ, где также налажен выпуск живой вакцины для орального применения в таблетированной форме [10] и продолжаются работы, направленные на сокращение времени производства вакцины, увеличение срока хранения конечного препарата и дальнейшее улучшение его качества (содержание живых микробов) [16].

Существование на территории Российской Федерации, других стран СНГ и на сопредельных территориях значительного числа природных очагов чумы с постоянно протекающими в них эпизоотиями обуславливает постоянную напряженность эпидемического потенциала чумной инфекции [17], поэтому стабильное производство живой чумной вакцины и работы по усовершенствованию как самого препарата, так и отдельных этапов производства сохраняют свою актуальность. Современные тенденции в области совершенствования биотехнологии живой чумной вакцины ориентированы на дальнейшее повышение стабильности и стандартности препарата, универсализации его выпуска и применения, снижение себестоимости. В настоящее время в технологии производства живой чумной вакцины предусмотрены два эквивалентных метода получения бакмассы вакцинного штамма EV чумного микроба: поверхностным методом на плотной питательной среде в АКМ-Ш и глубинным методом периодического культивирования в реакторе. В ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора ведутся научные разработки по совершенствованию технологии производства чумной вакцины при помощи аппаратного способа получения биомассы в АКМ-Ш. Одним из направлений совершенствования технологии производства чумной вакцины является подбор высокопродуктивных питательных сред из непищевого сырья и оптимизация качества используемых плотных питательных сред [18; 19].

Согласно «Промышленному регламенту на производство Вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций», используют питательные среды из ферментативного гидролизата мяса по Хоттингеру. Регламентом также предусмотрена возможность замены гидролизата Хоттингера гидролизатом казеина и ферментативным гидролизатом кукурузного экстракта сгущенного [20], но на практике для выращивания бактериальной массы применяют питательные среды из традиционных мясных основ. В последние годы их качество заметно ухудшилось вследствие использования нестандартного сырья животного происхождения. Соответственно, ухудшились ростовые свойства приготовленных из них сред.

Основными недостатками традиционно используемых для производства чумной вакцины питательных сред являются высокая себестоимость и нестандартность, обусловленные дороговизной и нестандартностью используемого сырья животного происхождения, сложность технологического процесса его переработки [19; 21; 22; 23; 24].

В 15-26 % продукции животноводства и птицеводства обнаруживаются остаточные количества антибиотиков, тяжелые металлы и металлоиды, поступающие из кормов и естественных источников при выбросах промышленных отходов. По сравнению с исходным количеством, после варки продукции остается от 5,9 % до 11,7 % антибиотиков в мышечной ткани. В бульон переходит около 70 % первоначального содержания антибиотиков. Приблизительно 20 % от исходного количества антибиотиков разрушается в результате проварки, либо переходит в мета-

болиты, которые микробиологическим методом не определяются. Из-за нерационального или несанкционированного использования для повышения продуктивности животных практически во всех мясных продуктах встречаются гормональные препараты [25; 26]. В связи с тем, что во многих странах наблюдались случаи заболевания крупного рогатого скота энцефалитом, случаи заражения вирусом коровьего бешенства и т.д., существует реальная угроза здоровью человека. В ряде стран использование компонентов животного происхождения при производстве иммунобиологических препаратов и вакцин запрещено. Таким образом, актуальна проблема разработки эффективных питательных сред для использования в производстве живой чумной вакцины.

Анализ литературных данных показал, что основным критерием при отборе белкового сырья для получения гидролизатов, – основ питательных сред, – является его полноценность. В зависимости от области использования, к белковым гидролизатам предъявляют разные требования, зависящие, в первую очередь, от степени гидролиза [27; 28]. Из растительных белков наибольший потенциал имеют белки соевых семян. Белок сои содержит все незаменимые аминокислоты. Лимитирующими являются метионин и цистин. До 90 % белков сои представлено растворимыми фракциями, включая легкорастворимые глобулины (60-81%), альбумины (8-25%) и труднорастворимые глобулины (3-7%) [23; 29; 30].

Гидролизаты сои в составе коммерческих питательных сред для культивирования микроорганизмов широко используются за рубежом. В XX веке стали развиваться технологии производства концентрированных соевых белков. Их более очищенными формами являются изоляты и концентраты, производство которых сосредоточено на заводах нескольких фирм в США, Западной Европе, Японии и Израиле. В последние годы собственное производство концентратов и изолятов соевых белков активно развивается в Индии и Китае [31; 32].

В Российской Федерации соевый белок в виде концентратов и изолятов не вырабатывают, промышленное производство соевых белков пока ограничивается производством различных видов соевой муки, соевых текстуратов и пищевых продуктов на основе соевого молока. В качестве исходного сырья используется импортная соевая мука. Для удовлетворения потребности промышленности и населения России в концентратах, изолятах и текстурированной муке, их ввозят из других стран – Дании, США, Германии, Нидерландов. С 2005 года ситуация на российском рынке соевых белков начала меняться и будет претерпевать кардинальные изменения в дальнейшем, что обусловлено стремительным ростом объемов производства соевых белков в Китае, экспансией дешевых китайских изолятов на российский рынок, увеличением производства сои в России и СНГ. Зарегистрированные в РФ линии сои обладают в основном новыми агрономическими признаками — устойчивостью к определенным видам пестицидов или сельскохозяйственных вредителей. По своим технологическим свойствам, химическому составу и кормовой питательности они не отличаются от своих традиционных аналогов [31].

В связи с отсутствием отечественных технологий получения соевых гидролизатов в Российской Федерации до недавнего времени питательные среды на основе сои не выпускались. В 2003 году З.З. Султановым была разработана технология получения сухого пептона из муки сои, а в 2008 – технология получения сухого ферментативного гидролизата сои [22].

Проведенные в лаборатории питательных сред ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора поисковые исследования по применению соевых гидролизатов свидетельствуют о перспективности их использования в качестве белково-углеводной основы питательных сред для культивирования возбудителя чумы. Показано и запатентовано использование комбинированных мясных и соевых основ питательных сред для получения жизнеспособной биомассы чумного микроба, предложена технология приготовления питательных сред для культивирования чумного микроба из гидролизатов сои (бобов) и продуктов ее переработки [33; 34; 35]. О.Л. Старцевой (2005) отмечено, что при культивировании чумного микроба среды, приготовленные из равных объемов ферментативных гидролизатов говяжьего мяса и сои, по качеству были равноценны средам, приготовленным на основе только мясного гидролизата, а применение сои при конструировании питательных сред для производства живой чумной вакцины позволит снизить себестоимость препарата при сохранении его качества, чувствительности бактериологического метода и достоверности исследований [22].

Согласно предварительно проведенным расчетам, себестоимость соевых сред по сравнению

с мясными в 1,5-2 раза ниже, что также немаловажно для производства чумной вакцины.

Использование сочетания сои или ее продуктов с другими видами непищевого сырья, содержащими метионин и цистин, создает предпосылки получения сбалансированных по аминокислотному составу гидролизатов и конструирования на их основе питательных сред, лишенных недостатков сред из мясных гидролизатов, традиционно применяемых при изготовлении чумной вакцины. Использование таких питательных сред для производства вакцины чумной живой сухой позволит оптимизировать и стандартизовать процесс выращивания вакцинного штамма *Y. pestis* EV.

#### Литература:

1. Микшис, Н.И. Современные тенденции в конструировании рекомбинантных вакцин для специфической профилактики чумы / Н.И. Микшис, О.М. Кудрявцева, В.В. Кутырев // Журн. микробиол., эпидемиол и иммунол. – 2015. – № 3. – С. 116-126.
2. Бывалов, В.А. Современное состояние проблемы совершенствования средств вакцинопрофилактики чумы / В.А. Бывалов, В.В. Кутырев // Журн. микробиол., эпидемиол и иммунол. – 2011. – № 2. – С. 97-104.
3. *Yersinia pestis* CAF1 variants and the limits of plague vaccine protection / L.E. Quenee, C.A. Cornelius, N.A. Ciletti [et al.] // J.Vaccine, 2009. – Т. 27 (1). – P. 80-87.
4. Smiley, S.T. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague / S.T. Smiley // Expert Rev. Vac. - 2008. – Т. 7 (2). - P. 209-221.
5. Titball, R.W. Second and third generation plague vaccine / R.W. Titball, E.D. Williamson // Adv. Exp. Med. Biol., 2003. – Т. 529. – P. 397-406.
6. Yamanaka, H. A nasal interleukin-12 DNA vaccine coexpressing *Yersinia pestis* FI-V fusion protein confers protection against pneumonic plague / H. Yamanaka, T. Hoyt, X. Yang [et al.] // Infect. Immun., 2008. – Т. 76 (10). - P. 4564-4573.
7. Bossi, P. La peste, acte possible de bioterrorisme / P. Bossi, F. Bricaire // Presse Medicale. –17 May 2003. – Issue 17. – P. 804-807.
8. Roussos, D. Plague / D. Roussos // Primary Care Update for Ob.Gyns. – 2002. – Vol. 9, Issue 4. – P. 125-128.
9. Titball, R.W. *Yersinia pestis* (plague) vaccines / R.W. Titball, E.D. Williamson // Expert Opin Biol Ther. – 2004 Jun. – Vol.4 (6). – P. 965-73.
10. Кутырев, В.В. Современное состояние научных исследований в области вакцинопрофилактики особо опасных бактериальных инфекций / В.В. Кутырев, З.Л. Девдариани, Л.В. Саяпина // Проблемы особо опасных инфекций. – 2006. – № 2 (92). – С. 18-24.
11. Коновалова, Ж.А. Некоторые пути оптимизации процесса производства вакцины чумной живой и способы оценки ее иммуногенности (обзор) / Ж.А. Коновалова, А.Г. Атлас, В.И. Дубровина // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 2 (90), Часть 2. – С. 191-196.
12. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л.Б. Борисов, 3-е изд. – М., 2002. – 736 с.
13. Конструирование кандидата в вакцинные штаммы *Yersinia pestis* с пониженной реактогенностью / С.А. Агеев, П.З. Шайхутдинова, И.В. Бахтеева [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 1 (107). – С. 70-73.
14. Некоторые аспекты неспецифической профилактики и лечения особо опасных инфекций / А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, И.А. Иванова [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол и иммунол. – 2015. – № 5. – С. 111-116.
15. Исторические и современные представления о проблеме специфической профилактики чумы / С.А. Бугоркова, З.Л. Девдариани, Т.Н. Щуковская, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 3. – С. 63-69.
16. Экспериментальное обоснование возможности получения концентрата микробных клеток штамма *Yersinia pestis* EV методом микрофльтрации / А.А. Лещенко, В.В. Тетерин, А.Г. Лазыкин [и др.] // Биопрепараты. – 2014. – № 1(49). – С. 31-36.
17. Влияние современного изменения климата на состояние природных очагов чумы России и других стран СНГ / Н.В. Попов, В.Е. Безсмертный, А.И. Удовиков [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 3. – С. 23-28.

18. Мониторинг качества вакцины чумной живой после окончания гарантийного срока хранения /Д.А. Будыка, А.А. Фисун, О.И. Коготкова [и др.] // Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в причерноморском регионе: матер. региональной науч.-практ. конф. с международным участием, 24-25 сентября 2013 г., г. Ставрополь: [электронное издание] / под ред. академика РАМН Г.Г. Онищенко, профессора А.Н. Куличенко. – Ставрополь: ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, 2013. – 1 CD-R (Mb). – С. 40-42.
19. Ефременко, А.А. Разработка биотехнологии вакцины чумной живой сухой со сниженным количеством человеко-доз в производственной упаковке (ампуле): дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.23; 03.00.07 / Ефременко А.А. – Ставрополь, 2005. – 117 с.
20. Промышленный регламент ПР 01897080-09-09 на производство Вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, кожного скарификационного нанесения и ингаляций. – Ставрополь, 2009. – 252 с.
21. Питательные среды для диагностики чумы /Л.В. Домотенко, Я.В. Подкопаев, М.В. Храмов, И.А. Дятлов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – № 4 (102). – С. 60-65.
22. Старцева, О.Л. Совершенствование биотехнологии производства питательных сред для культивирования чумного микроба на основе сырья животного и растительного происхождения : дис... канд. биол. наук : 03.00.23 / Старцева О.Л. – Ставрополь, 2005. – 158 с.
23. Способ получения гидролизата сои / З.З. Султанов, Ш.М. Меджидов, М.М. Меджидов, Е.А. Какулина / Бюлл. Изоб. полезные модели. - 2007. - № 8 (2 ч.) – С. 885.
24. Технология получения гидролизата сои с использованием протеолитического фермента бромелайна и оценка ростовых свойств питательной среды на его основе для перевиваемых культур клеток / Г.П. Трошкова, Н.А. Мазуркова, Т.П. Сумкина, [и др.] // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 1. – С. 45-47.
25. Кальницкая, О.И. Уровень обнаружения антибиотиков в продуктах убоя, полученных из отечественного и импортного сырья / А.Н. Туник, Б.В. Уша, О.И. Кальницкая // Ветеринария. – 2007. - № 4. – С. 48-53.
26. Уша, Б.В. Контроль остатков антибиотиков в сырье и продуктах животного происхождения / Б.В. Уша, О.И. Кальницкая //Ветеринарный врач. – 2009. – № 3. – С. 21-23.
27. Влияние продолжительности ферментализации на свойства белковых гидролизатов /К.В. Зотова, Ю.А. Кучина, А.Ю. Широнова [и др.] // Вестник МГТУ. – 2012. – Т. 15, № 1. – С.102-106.
28. Максимюк, Н.Н. О преимуществах ферментативного способа получения белковых гидролизатов / Н.Н. Максимюк // Фундаментальные исследования. – 2009. – № 1. – С. 34-35.
29. Пат. 2220587 Российская Федерация, МПК7 А 23 К 1/14, А 23 L 1/20. Способ обработки соевых бобов / Кощаев А.Г. , Кощаева О.В. , Петенко А.И. ; заявитель и патентообладатель Кубанский государственный аграрный университет. – Оpubл. 10.01.04, Бюл. № 1. – 10 с.
30. Пат. 2457689 Российская Федерация, МПК7 А23J3/30. Способ получения смеси аминокислот из отходов переработки сырья животного или растительного происхождения / Остроумов Л.А., Курбанова М.Г., Разумникова И.С. [и др.]; заявитель и патентообладатель ГОУВПО Кемеровский технологический ин-т пищевой промышленности. – Приоритет 17.11.2010; опубл. 10.08.2012. Бюл. № 28.
31. Доморощенкова, М.Л. Продукты переработки сои как важнейшие источники кормового белка [Электрон. ресурс] / М.Л. Доморощенкова. – Б.м.и.: АПК-Информ, 23.11.2013. – Режим доступа: <http://www.apk-inform.com>, дата обращения 29.04.2014.
32. Van Eys, J.E. Manual of quality analyses for soybean products in the feed industry Soybean / J.E. Van Eys // Published by the U.S. Export Council. 2nd Edition. – 2012.
33. Пат. 2241033 Российская Федерация, МПК7 С12N 1/20, С12Q 1/04. Питательная среда для накопления биомассы вакцинного штамма чумного микроба / Смирнова Е.Б., Катунина Л.С., Старцева О.Л. [и др.]; заявитель и патентообладатель ФКУЗ Ставропольский науч.-исслед. противочум. ин-т Роспотребнадзора. – № 2003003451 ; заявл. 15.12.2002 ; опубл. 27.11.2004, Бюл. № 17.
34. Пат. 2245362 Российская Федерация, МПК7 С12N 1/20, С12Q 1/04. Питательная среда для культивирования вакцинного штамма чумного микроба / Смирнова Е.Б., Катунина Л.С.,

Старцева О.Л. [и др.]; заявитель и патентообладатель ФКУЗ Ставропольский науч.-исслед. противочум. ин-т Роспотребнадзора. – № 2002133824/13 ; заявл. 15.12.2002 ; опубл. 27.01.2005, Бюл. № 29.

35. Пат. 2260620 Российская Федерация, МПК7 C12N 1/20, C12Q 1/04. Питательная среда (жидкая) для культивирования чумного микроба вакцинного штамма ЕВ / Катунина Л.С., Старцева О.Л., Малецкая О.В. [и др.]; заявитель и патентообладатель ФКУЗ Ставропольский науч.-исслед. противочум. ин-т Роспотребнадзора. – № 2004104518 ; заявл. 16.02.2004 ; опубл. 20.09.2005, Бюл. № 26.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ К ФОРМИРОВАНИЮ БИОПЛЕНОК КЛИНИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ *CANDIDA ALBICANS*, В ЦЕЛЯХ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЯЖЕСТИ ХРОНИЧЕСКИХ ФОРМ КАНДИДОЗОВ**

**Лисовская С.А., Халдеева Е.В., Глушко Н.И.**

*ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и  
микробиологии» Роспотребнадзора, Казань*

Кандидоз – инфекция, вызываемая грибами рода *Candida*, является наиболее распространенным грибковым заболеванием. За последние десятилетия в мире заметно возросло количество пациентов, страдающих как острыми, так и хроническими, рецидивирующими формами кандидоза. Особое место занимают *Candida albicans*, на долю которого приходится ведущее место среди возбудителей поверхностных и глубоких хронических форм заболеваний. Так, по данным Национального комитета по контролю над внутрибольничными инфекциями в США, грибы *C. albicans* занимали четвертое место среди патогенов, наиболее часто выделяемых из крови пациентов, находящихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии [1, 2]. Если до недавнего времени системные грибковые инфекции в основном являлись уделом иммунокомпрометированных больных, то теперь они значительно чаще регистрируются у осложненных больных терапевтического и хирургического профиля, что связано с рядом факторов. Из анализа литературы [3,4] следует, что основными факторами развития хронических и системных форм кандидоза являются: длительная иммуносупрессия, соматическая патология, нерациональное применение антибактериальных и гормональных препаратов, различные виды имплантатов и протезов.

Все больше появляется доказательств, что огромную роль в патогенезе кандидоза играют факторы патогенности самого гриба. Течение инфекционных болезней может протекать с осложнениями из-за формирования в организме микробных биопленок. В настоящее время считается, что более 65% всех инфекционных заболеваний обусловлены микроорганизмами, существующими в форме биопленок. Биопленки - это высокоупорядоченные сообщества, формирующиеся на биологических или искусственных поверхностях в результате адгезии, роста и размножения микроорганизмов и образования полисахаридного внеклеточного матрикса. Биопленки образуют не только бактерии, но и грибы. Известно, что грибы *C. albicans* являются главными грибковыми агентами, образующими биопленки на медицинских приборах (мочевые и кровяные катетеры), искусственных протезах (в том числе стоматологических), а также на поверхности эпителиальных клеток восприимчивого организма [3]. Способность *C.albicans* образовывать биопленки, клинически значима, поскольку связь клеток гриба с биопленкой значительно повышает их устойчивость к традиционным противогрибковым препаратам. Грибковые биопленки не только более резистентны к антимикробным агентам, чем отдельные планктонные клетки, но и способны противостоять иммунным защитным механизмам хозяина [5,6].

В связи с этим целью нашей работы являлось определение способности к формированию биопленок клинических штаммов грибов *C.albicans*, выделенных от больных с различными формами кандидозов.

## Материалы и методы.

Объектами исследования служили: 38 штаммов *C.albicans*, выделенные от пациентов с клиническими признаками поверхностной кандидозной инфекции различной локализации (слизистых и кожных покровов), находящихся на амбулаторном лечении, как с хроническим течением заболевания, так и в острый период.

Культуры гриба *C. albicans* выращивали на стандартной среде Сабуро при температуре 30°C в течение 48 часов.

Идентификацию грибов проводили микроскопическими и биохимическими методами, проводили тест на образование ростковых трубок. В работе использовались селективные хромогенные среды «CandiSelect 4» (Bio-Rad) и коммерческие тест-системы, основанные на исследовании ауксаногаммы: «Auchacolor 2» (Bio-Rad).

Определение адгезивных свойств выделенных штаммов *C. albicans* проводилось на ранее разработанной авторами модели адгезии клеток гриба на нитроцеллюлозную пленку с иммобилизованным гемоглобином [7]. Полученную пленку площадью 7 см<sup>2</sup> инкубировали при температуре 30°C с 3 мл суспензии клеток гриба в 0,1М фосфатном буфере в течение двух часов. Определение уровня адгезии проводили по разнице начальной и конечной оптической плотности суспензии клеток, а также прямым подсчетом клеток в суспензии с помощью микроскопа Микмед-6 при увеличении 10x20, подсчитывали не менее 10 полей зрения.

Формирование биопленок грибов *C. albicans*, проводили, по методу Ramage et al. (2001). Культуру грибов засекали в жидкую среду Сабуро и инкубировали в орбитальном шейкере (180 об/мин.) при 30°C в течение 24 часов. Затем культуру промывали два раза стерильным фосфатным буфером и ресуспендировали в жидкой среде Сабуро с конечной плотностью 1,0 x 10<sup>6</sup> клеток/мл. Суспензию клеток в количестве 100 мкл вносили в 96-луночные плоскодонные полистироловые микропанели и инкубировали в течение 48 часов при 37°C. После образования биопленки планшеты промывали три раза стерильным фосфатным буфером. Степень или количество формирования биопленок оценивали колориметрическим способом. В лунки со сформированными биопленками добавляли 125 мкл водного раствора 1% кристаллического фиолетового и инкубировали 20 мин при 37°C. После удаления избытка красителя и промывки лунок добавляли 95% этанол в количестве 125 мкл, оптическую плотность регистрировали на ридере с вертикальным лучом света с использованием светофильтра 620 нм.

## Результаты и обсуждения.

В ходе исследования были сформированы две основные группы: 1) штаммы *C. albicans*, выделенные от больных поверхностной формой кандидоза в острый период (22 штамма) и 2) штаммы *C. albicans*, выделенные от больных хронической формой кандидоза (16 штаммов).

При отборе в 1 группу учитывались клинические проявления заболевания, диагноз и выявление *C.albicans* в количестве, превышающем 10<sup>3</sup> КОЕ/мл. Группу штаммов, выделенных от больных хронической формой кандидоза, составили штаммы от пациентов как в отсутствие ярко выраженных клинических признаков кандидоза, так и в период обострения, у которых выявлено от 10<sup>2</sup> до 10<sup>3</sup> КОЕ/мл *C.albicans*.

Все группы штаммов были разделены с учетом места обнаружения: 1) штаммы из зева и ротовой полости, 2) выделенные с поверхности гладкой кожи туловища и конечностей.

Способность *C. albicans* к адгезии - это не только один из основных вирулентных факторов, определяющих патогенность гриба, являющийся первоначальным этапом развития инфекции, но и начальная стадия в цикле формирования биопленки. В связи с этим, первым этапом исследования стало изучение адгезивной активности штаммов.

Проведенный анализ адгезивной активности двух основных групп штаммов показал различия в уровне адгезии. Процент адгезии у штаммов, выделенных от больных с диагнозом кандидоз, в 1,5 – 2 раза превышал уровень адгезии штаммов, выделенных от больных с хроническим течением заболевания, причем независимо от места локализации штаммов. Так, средний уровень адгезии штаммов, выделенных со слизистой зева составил (45,2±0,12)% и (27,1±1,1)% соответственно (рис.1)

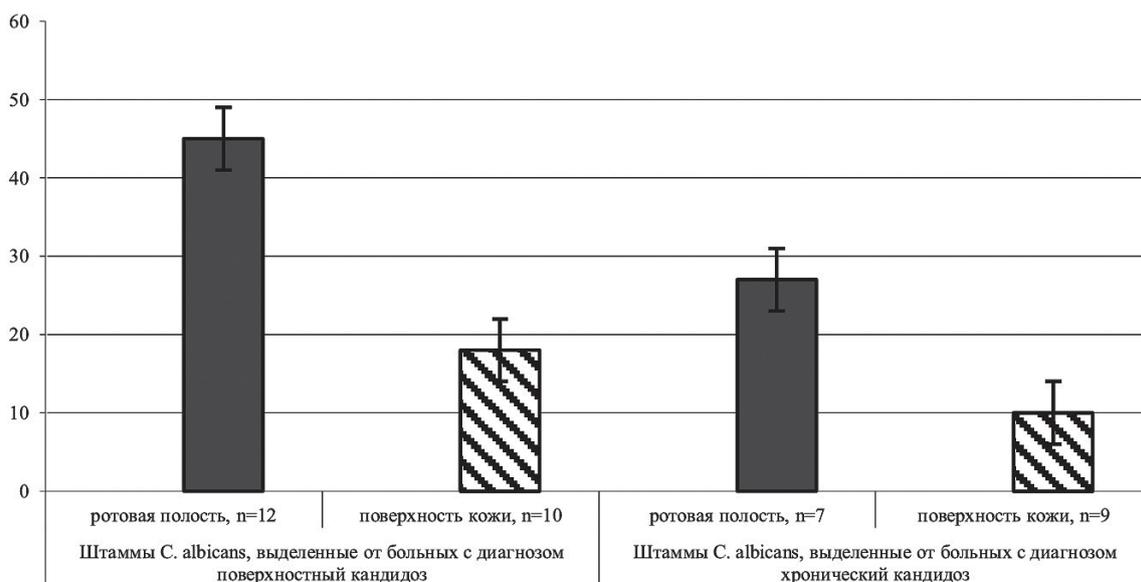


Рисунок 1. Уровень адгезии штаммов, выделенных при клинически доказанном кандидозе различной локализации.

В ходе исследования выявлено, что наибольший процент адгезии отмечался у штаммов, выделенных с поверхностей слизистых оболочек ротовой полости в обеих группах, в то время как штаммы, выделенные с кожи и ее придатков, существенно (в 1,5-3 раза) уступали им в адгезии. Уровень адгезии изолятов *C. albicans*, обнаруженных на слизистых оболочках зева и ротовой полости, достигал 50%, тогда как штаммы, обнаруженные у больных с диагнозами кандидоз кожи имели уровень адгезии от 8 до 18% (рис. 1).

Низкий уровень адгезивных свойств штаммов, выделенных с кожи и придатков, вероятно связан с резко отличающимися условиями жизни гриба: низкая влажность, малодоступные субстраты (кератин, коллаген). Вероятно, здесь главную роль играют другие факторы патогенности, например комплекс внеклеточных протеолитических ферментов, в первую очередь секретируемых аспарагиновых протеиназ, обладающих способностью разрушать белки кожных покровов [8]. С другой стороны, штаммы, обнаруженные в ротовой полости, постоянно обеспечиваются питательными веществами, но для закрепления в среде, где идет постоянное вымывание, высокая адгезия может служить необходимым фактором.

Несмотря на то, что адгезия является начальной стадией в цикле формирования биопленки, эта фиксация на первом этапе обратима и не всегда приводит к образованию биопленки. А вот переход клеток грибов от планктонного существования к биопленочному предположительно инициируется сигналами, поступающими из окружающей среды, и здесь возможно играет важную роль длительная иммуносупрессия, соматическая патология, нерациональное применение антимикробных и гормональных препаратов, различные виды имплантов и протезов [9].

В связи с этим, следующей задачей явилась оценка степени формирования биопленок данными клиническими штаммами.

Во время исследования установлено, что все штаммы грибов *C. albicans* формируют биопленку. Однако, замечено, что для штаммов, выделенных со слизистой зева, менее характерно пленкообразование, по сравнению со штаммами, выделенными с кожи (средние значения пленкообразования составили 0,077 и 0,143 соответственно) (рис. 2). В то же время, штаммы, выделенные из ротовой полости от больных с хронической формой кандидоза, отличались в 1,5 раза большим количеством пленкообразования, по сравнению со штаммами, выделенными из ротовой полости от больных в острый период заболевания. Для штаммов, выделенных с кожи больных, с хронической формой кандидоза кожи, выявлены наибольшие значения в пленкообразовании (табл. 1).

Пленкообразование клиническими штаммами *C. albicans*, выделенных из разных анатомических локусов больных с диагнозом поверхностный кандидоз ( $p < 0,05$ )

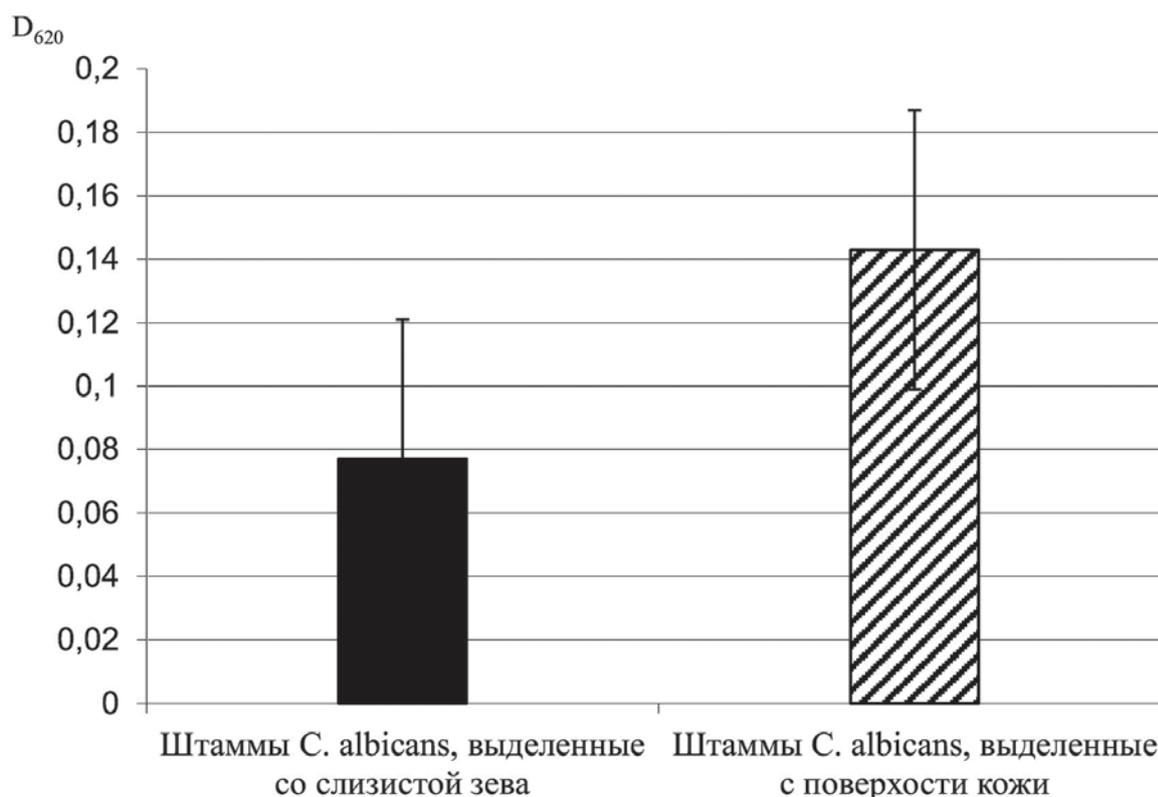


Рисунок 2. Степень пленкообразования клиническими штаммами *C. albicans* различной локализации.

Локализация штамма	штаммы <i>C. albicans</i> , выделенные от больных поверхностной формой кандидоза в острый период		штаммы <i>C. albicans</i> , выделенные от больных хронической формой поверхностного кандидоза	
	N	Количество сформированной биопленки	N	Количество сформированной биопленки
Слизистая зева и ротовой полости	12	0,057 ± 0,005 (0,048-0,065)	7	0,082 ± 0,002 (0,054-0,142)
Поверхность гладкой кожи	10	0,076 ± 0,004 (0,056-0,092)	9	0,182 ± 0,039 (0,079-0,344)

Примечание: Даны значения  $D_{620}$  (за вычетом фона) поглощения красителя в лунках микропанели.

Проведенные исследования показали отсутствие прямой корреляции между адгезивной активностью штамма и пленкообразованием. Наличие выраженных адгезивных свойств штаммов, указывает, вероятно, на развитие острого патологического процесса. В то же время, высокая степень пленкообразования характерна для штаммов, выделенных от больных с хрониче-

ской формой поверхностного кандидоза. Однако, в этой группе отмечались и штаммы с низкой степенью пленкообразования, что может свидетельствовать о возможных морфологических изменениях клеток грибов от дрожжеподобных форм к гифам, что обеспечивает инвазию (распространение) возбудителя в ткани, и как следствие обострение инфекционного процесса.

Таким образом, в клинической практике при хронических инфекциях следует помнить о том, что низкий уровень обсемененности организма грибами, при хронических формах заболевания может говорить о развитии биопленочных структур, которая является одной из основных стратегий выживания микроорганизма даже в организме человека. А это предполагает как необходимость более полного изучения свойств самих штаммов, так и изменение подходов к лечению заболеваний, ассоциированных с биопленками.

#### Литература:

1. Климов, Н.Н. Диагностика и лечение кандидемии и острого диссеминированного кандидоза // Инфек. и антимикроб. тер. – 2002. – Т 4. -№ 1. – с. 30-37.
2. Ruhnke, M. Mucosal and systemic fungal infections in patients with AIDS: prophylaxis and treatment // Drugs. – 2004. – Vol.64 (11) – P.1163-80. 33.
3. Хазанова, В.В. Изучение микробиоценоза при хронических заболеваниях слизистой оболочки полости рта / В.В.Хазанова, И.М.Рабинович, Е.А.Земская, О.Ф.Рабинович, Н.А.Дмитриева// Стоматология. - 1996. - Т. 75, № 2. - С. 26-28. 25.
4. Афиногенова, А.Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // Травматология и ортопедия России.– 2011.– № 3.– С. 119–125.
5. Шабашова, Н.В. Особенности локального иммунного ответа и его дефекты при орофарингеальном кандидозе (обзор) // Проблемы медицинской микологии. – 2010. - т.12, №4. – с.3- 9.
6. Пинегина, О.Н. Определение чувствительности к антимикотикам *Candida spp.* в составе биопленок / О.Н. Пинегина, Е.Р. Рауш, Н.В. Васильева// Проблемы медицинской микологии. – 2014. – т.16, №4. – с.46-48.
7. Лисовская, С.А. Глушко Н.И., Халдеева Е.В. Лабораторная модель для определения адгезивных свойств дрожжеподобных грибов. / С.А. Лисовская, Н.И. Глушко, Е.В. Халдеева. // Проблемы медицинской микологии.- 2006.-Т.8, №3-С.36-39.
8. Naglik, J.R. *Candida albicans* secreted aspartil proteinases ih virulence and pathogehehis./ J.R. Naglik, S.J. Challacomber // Microb.Molec.Biol.Rew. –2003.-V67.- P.400-428.
9. Межевикина, Г.С. Современные аспекты этиологии и патогенеза кандидоза слизистой оболочки полости рта / Г.С. Межевикина, В.Н Дармограй., С.И. Морозова, Н.А. Савельева // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.- 2012 г.- №3 – с. 152-157.

## ОПЫТ ПРОВЕДЕНИЯ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ В Г. РОСТОВЕ-НА-ДОНУ

**Матузкова А.Н.<sup>1</sup>, Суладзе А.Г.<sup>1</sup>, Саухат С.Р.<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup> - ФБУН "Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии" Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону; <sup>2</sup> - ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону*

В обсуждаемом проекте государственной стратегии противодействия распространению заболевания, вызываемого вирусом иммунодефицита человека, в Российской Федерации на период до 2020 года большое значение в противодействии эпидемии придается повышению охвата больных антиретровирусной терапией (АРВТ). Вместе с тем результативность этого

направления стратегии достигнет ожидаемого результата при условии обеспечения условий для качественного и эффективного лечения.

Наиболее важные клинические вопросы, возникающие при выявлении ВИЧ-инфекции, касаются своевременности начала антиретровирусной терапии (АРВТ) и выбора схемы АРВТ первой линии [1, 2].

Целью исследования явилась оценка эффективности АРВТ 1-ой линии в зависимости от использования различных схем препаратов.

В соответствии с Международными рекомендациями по применению антиретровирусных препаратов у взрослых и подростков, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), опубликованными 2014-2015 гг. [3-9], стандартом для пациентов, ранее не получавших антиретровирусных препаратов, основные режимы АРВТ включают 2 препарата из группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1 (НИОТ) и один препарат из группы ингибиторов интегразы (ИИ), нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) или ингибиторов протеазы ВИЧ-1 (ИП). Практически все исследователи согласны с тем, что именно успех первой линии АРВТ во многом определяет дальнейшую судьбу пациента.

В связи с этим проведено изучение вирусологической и иммунологической эффективности схем первой линии АРВТ у 22 взрослых больных ВИЧ-инфекцией, ранее не получавших антиретровирусных препаратов. В течение 48 недель была изучена эффективность и безопасность комбинированной антиретровирусной терапии, включавшей 2 нуклеозидных аналога и нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы ВИЧ или ингибитор протеазы ВИЧ – в качестве третьего компонента.

В исследование было включено 12 мужчин и 10 женщин. Средний возраст больных составил 39,5 лет. В соответствии с клинической классификацией ВИЧ-инфекции (Покровский В. И., 2006 г.) у больных была диагностирована стадия вторичных заболеваний 4А, 4Б, 4В. Показанием к началу АРВТ явились клинические проявления или лабораторно подтвержденная иммуносупрессия (уровень CD4+-лимфоцитов < 350 клеток/мкл), или высокий уровень вирусной нагрузки (более 100 000 копий в мл).

На момент включения в исследование ни у одного из больных не наблюдали каких-либо клинических проявлений СПИД-ассоциированного симптомокомплекса. Мониторинг терапии осуществлялся на 0, 4, 12, 24, 36 и 48-й неделях лечения и включал определение концентрации РНК ВИЧ-1 в плазме, количества CD4 лимфоцитов в 1 мкл крови, общеклинический анализ периферической крови, биохимический анализ крови. Оценка приверженности лечению проводилась с помощью специальных вопросников, разработанных специалистами ЮОЦПБ со СПИДом [10].

У одного больного, включенного в исследование до начала АРВТ, была выявлена мутация устойчивости к НИОТ T215I, опосредующая снижение чувствительности вируса к AZT, d4T на 20 %, а ddI – на 10%). Подбор схемы терапии осуществлялся с учетом приведенных результатов определения резистентности ВИЧ-1 к АРВП.

У двух других больных, у которых сохранялась определяемая вирусная нагрузка после 12 недель терапии, также была исследована резистентность вирусов к антиретровирусным препаратам. У обоих пациентов наличие мутаций резистентности ВИЧ к АРВП не установлено. С этими пациентами была проведена дополнительная работа по формированию мотивации и поведенческих навыков на основе технологии мотивационного интервью в сочетании с техниками когнитивно-поведенческой психокоррекции с целью повышения уровня приверженности к АРВТ.

10 из 22 больных были инфицированы ВИЧ при внутривенном введении наркотических веществ, 12 – вследствие незащищенных гетеросексуальных контактов с ВИЧ-инфицированными партнерами. У 68,2% больных выявлены маркеры хронических гепатитов В или С. В процессе лечения у всех пациентов прогрессирования клинических симптомов ВИЧ-инфекции не наблюдалось.

При анализе динамики основных вирусологических и иммунологических показателей установлено, что у всех больных через 48 недель от начала лечения зарегистрирован

неопределяемый уровень РНК ВИЧ в плазме (<500 копий/мл) независимо от пути заражения и примененных комбинаций АРВП. В то же время у всех больных отмечен прирост количества CD4 лимфоцитов в периферической крови, выраженный, однако, в разной степени в зависимости от пути заражения и используемых схем АРВТ. (табл.1).

Таблица 1.

Динамика концентрации РНК ВИЧ и количества CD4<sup>+</sup>лимфоцитов у больных ВИЧ-инфекцией в процессе АРВТ 1-ой линии в зависимости от пути передачи.

Группы	Статистические показат.	Показатели CD4 абс. (кл/мкл)				Показатели ВН (коп./мл)					Продолжительность АРВТ до снижения ВН <500 коп/мл (нед.)
		при начале АРВТ*	через 1 мес. АРВТ*	через 6 мес. АРВТ	через 12 мес. АРВТ	при начале АРВТ	через 1 мес. АРВТ	через 6 мес. АРВТ	через 9 мес. АРВТ	через 12 мес. АРВТ	
Гетеро-секс. кон-ты	М урез.	157,4	186,1	275,9	361,6	463414	256	-	-	-	9
	S	48,6	51,5	51,9	62,8	244700	256	-	-	-	2
ПИН	М урез.	284,0	299,8	378,7	398,2	289869	81948	-	-	-	10
	S	41,4	42,6	57,2	49,4	116912	81672	-	-	-	2

М урез. - среднее внутренней части множества данных с исключением 10% экстремальных значений).

S - стандартная ошибка средней арифметической.

\* - различия между группами статистически достоверны по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ )

Средняя продолжительность лечения до достижения неопределяемого уровня вирусной нагрузки была несколько выше в группе больных, инфицированных при парентеральном употреблении наркотиков.

При сравнении динамики указанных показателей в группах больных, принимавших различные схемы АРВТ, отмечено быстрое подавление вирусной репликации среди пациентов, применявших комбинации АРВП на основе ННИОТ (у 100% пациентов ВН достигла уровня <500 коп. РНК ВИЧ/мл уже через 6 мес. терапии) при достоверно более выраженном восстановлении количества CD4 лимфоцитов у данных пациентов уже через месяц после начала терапии (Табл. 2). В долгосрочном плане отмечена отчетливая тенденция к более выраженному устойчивому росту иммунологических показателей среди больных, принимавших АРВП на основе ННИОТ.

Учитывая присутствие в нуклеозидном компоненте схем двух основных НИОТ Абакавира и Зидовудина, представляло интерес оценить безопасность применяемых комбинаций АРВП при использовании в качестве терапии 1-ой линии.

У пациентов с повышенной активностью трансаминаз при назначении гепатопротекторов наблюдалось снижение уровней АЛТ и АСТ до физиологической нормы без корректировки терапевтической схемы АРВТ. У 15 из 22 больных до начала лечения выявлен хронический гепатит В или С, а у троих больных - регистрации повышенных уровней ферментов предшествовало употребление алкоголя.

У двух больных, принимавших зидовудин, наблюдалось снижение уровня гемоглобина. Этим пациентам данный препарат был заменен, после чего отмечалась нормализация гематологических показателей.

Таблица 2.

Динамика концентрации РНК ВИЧ и количества CD4<sup>+</sup>лимфоцитов у больных ВИЧ-инфекцией в процессе АРВТ 1-ой линии в зависимости от используемых комбинаций АРВП.

Группы	Статистич. показат.	Показатели CD4 абс. (кл/мкл)					Показатели ВН (коп./мл)					
		при начале АРВТ*	через 1 мес. АРВТ*	через 6 мес. АРВТ	через 12 мес. АРВТ	к концу набл.*	при начале АРВТ	через 1 мес. АРВТ	через 6 мес. АРВТ	через 9 мес. АРВТ	через 12 мес. АРВТ	Продолжительность АРВТ до снижения ВН до неопр. ур. (нед.)
Бустиро- ванные ИП	M	201,1	210,5	283,9	330,3	340,4	299794	54752	27420	13133	-	10
	S	38,7	37,9	41,3	43,5	45,3	87685	54447	27322	13133	-	2
ННИОТ	M	256,7	302,5	399,8	434,0	604,0	446581	85	-	-	-	10
	S	62,0	64,8	74,9	63,0	145,0	368249	85	-	-	-	2
Всего на АРВТ	M	217,0	236,8	317,0	360,0	415,7	341733	39133	19586	9381	-	10
	S	32,5	33,2	37,3	36,6	56,9	117262	38894	19517	9381	-	1

M - среднее арифметическое;

S - стандартная ошибка средней арифметической;

\* - различия между группами статистически достоверны по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ )

Таким образом, комбинированная терапия больных ВИЧ-инфекцией с использованием комбинаций 1-ой линии терапии (2 НИОТ + 1 ННИОТ и 2 НИОТ + 1 ИП/г) в течении 48 недель была эффективной: концентрация РНК ВИЧ-1 к концу срока наблюдения снизилась до неопределяемого уровня у всех обследуемых пациентов, при этом количество CD4<sup>+</sup> лимфоцитов увеличилось с  $217,0 \pm 32,5$  до  $415,7 \pm 56,9$  кл./мкл. Неопределяемый уровень вирусной нагрузки ВИЧ-1 через год от начала терапии указывает на низкий риск выработки резистентности к АРВ препаратам.

Переносимость комбинированной антиретровирусной терапии, включающей абакавир или зидовудин, в целом была удовлетворительной. Лишь у двух больных выявленные нежелательные явления потребовали изменение схемы лечения, в частности замены нуклеотидного аналога – зидовудина.

Исследования по изучению вирусологической и иммунологической эффективности схем первой линии АРВТ у 22 взрослых больных ВИЧ-инфекцией будут продолжены в 2016 г. и дополнены определением возможной резистентности ВИЧ 1 к АРВП в случае регистрации наличия вирусной нагрузки. Планируется увеличение когорты наблюдаемых пациентов.

Целесообразно дополнение информационного блока системы эпидемиологического надзора

за ВИЧ-инфекцией оценочными показателями эффективности АРВТ 1-ой линии, включая показатели популяционной вирусной нагрузки. Указанные показатели необходимо рассчитывать по субъектам Российской Федерации, а так же в разрезе каждой медицинской организации, уполномоченной оказывать специализированную помощь больным ВИЧ-инфекцией, для выявления своевременной коррекции недостатков в работе организаций.

#### Литература:

1. Протоколы диспансерного наблюдения и лечения больных ВИЧ-инфекцией 4-й пересмотр Национального научного общества инфекционистов, В.В. Покровский с соавт., Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы, 2014, № 6, 1-43 с.
2. Мазус А. И. с соавт. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению ВИЧ-инфекции у взрослых. - М., 2014. - 75 с. 2-е издание, исправленное и дополненное.
3. EACS Guidelines Version 8. October 2015. 189 p. <http://www.eacsociety.org>
4. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Developed by the panel on clinical practices for treatment of HIV infection convened by the Department of Health and Human Services (DHHS). April 9, 2015. <http://www.AIDSinfo.nih.gov/guidelines>
5. Consolidated guidelines on HIV prevention, diagnosis, treatment and care for key populations. World Health Organization, July 2014. <http://www.who.int>
6. Guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults in Europe (Version 7,02; June 2014). European AIDS Clinical Society. <http://www.europeanaidscliclinicalsociety.org>
7. EACS (European AIDS Clinical Society) Guidelines 7.1. November 2014 [http://www.eacsociety.org/files/guidelines\\_english\\_71\\_141204.pdf](http://www.eacsociety.org/files/guidelines_english_71_141204.pdf).
8. Antiretroviral treatment of adult HIV infection; 2014 recommendation of the international AIDS Society USA Panel. JAMA 2014; 312(4): 410–425.
9. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Developed by the panel on clinical practices for treatment of HIV infection convened by the Department of Health and Human Services (DHHS). Mai 1, 2014. <http://www.AIDSinfo.nih.gov/guidelines>.
10. Воронцов, Д.В. Формирование, оценка и контроль приверженности диспансеризации и лечению у пациентов с ВИЧ-инфекцией: практическое пособие / Д.В. Воронцов, А.Н. Матузкова, С.Р. Саухат. – Москва: КРЕДО, 2016. – 44 с.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ

**Махова М.А., Бруснигина Н.Ф., Черневская О.М., Орлова К.А., Ванькова О.Е.,  
Скобло Л.Е., Барышева Н.Н., Кленина Н.Н.**

*ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

Разработка методов диагностики инфекционных агентов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот и их активное внедрение в лабораторную практику открыли новую эпоху в изучении целого ряда труднокультивируемых бактериальных и вирусных инфекций, в частности вирусов семейства Herpesviridae. Данное семейство вирусов представляет огромный интерес для вирусологов и клиницистов, что в первую очередь связано с их значительной эпидемиологической ролью и социальной значимостью в современном мире. Неуклонный рост числа герпетических заболеваний у взрослых и детей обуславливает необходимость

всестороннего изучения герпесвирусных инфекций (ГВИ) и разработки эффективных методов диагностики, профилактики и лечения разнообразных форм этой инфекции.

Среди вирусных инфекций герпетические занимают одно из ведущих мест в силу повсеместного распространения, многообразия клинических проявлений, как правило, хронического течения, а также различных путей передачи вирусов. Он входит в число наиболее распространенных и плохо контролируемых инфекций человека. По данным ВОЗ, до 80-90% населения Земли инфицировано вирусами семейства герпеса. Герпесвирусы могут циркулировать в организме с нормальной иммунной системой бессимптомно, но у людей с иммуносупрессией вызывают тяжелые заболевания со смертельным исходом. По данным ВОЗ, смертность от герпетической инфекции среди вирусных заболеваний находится на втором месте (15,8%) после гепатита (35,8%). [1].

Неблагоприятная экологическая обстановка, снижение уровня социальной защиты населения и, как следствие этого, угнетение защитных сил организма, способствовали существенному увеличению числа больных герпесом в России. [2]. На территории РФ различными формами герпетических инфекций по данным ряда авторов страдают около 20 миллионов человек, однако, в связи с отсутствием в нашей стране обязательной регистрации заболеваемости ГВИ истинное количество больных неизвестно. [3,4].

В настоящее время для диагностики ГВИ широко используются молекулярно-генетические методы, основанные на амплификации ДНК.

Основные достоинства молекулярно-генетических методов - высокая чувствительность и специфичность. Чувствительность полимеразной цепной реакции (ПЦР) при выявлении вирусов группы герпеса составляет 100 вирионов, что значительно превосходит чувствительность других методов прямого выявления вирусов. При удачном выборе праймеров специфичность приближается к 100%. Продолжительность исследования в зависимости от модификации метода составляет 3-4 часа. При использовании «realtime-PCR», возможно определение концентрации вирусов, что имеет важное значение для терапии ГВИ.

Лаборатория метагеномики и молекулярной индикации патогенов (прежнее название лаборатория генетики микроорганизмов) ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора была первой в Нижнем Новгороде и одной из первых в России, которая стала применять молекулярно-генетические методы, и в частности метода ПЦР, для диагностики целого ряда инфекционных агентов.

**Цель работы:** оценка распространенности представителей сем. Herpesviridae (вирус простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ 1/2), Варицелла-Зостер вирус, Эпштейна-Барр вирус (ЭБВ), цитомегаловирус (ЦМВ), вируса герпеса 6 типа (ВГЧ 6)) среди детского населения Нижнего Новгорода и области с использованием молекулярно-генетических методов.

#### **Материалы и методы**

За период 2010-2015 гг. были обследованы 16935 детей различных возрастных групп (от рождения до 16 лет) – пациентов лечебных учреждений г. Нижнего Новгорода (ГБУЗ НО «ДГКБ №1», ГБУЗ НО «НОДКБ», ГБУЗ НО «Детская городская больница №25», ГБУЗ НО «Детская городская клиническая больница №27 «Айболит», ГБУЗ «Городская больница №39», ГБУЗ НО «Кстовская ЦРБ», ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России (до 1.10.14 ФГБУ «Нижегородский НИИ ДГЭ»). Проведено 83 488 ПЦР-исследований. Контрольная группа состояла из 127 здоровых детей в возрасте от 3 до 16 лет.

Показанием к ПЦР-обследованию на вирусы семейства Herpesviridae являлось подозрение на внутриутробное инфицирование ребенка, недоношенность, геморрагический синдром, поражение ЦНС, анемия у новорожденного, наличие в анамнезе у детей частых (не менее 8 случаев в год) заболеваний ОРЗ/ОРВИ, синдрома полилимфоаденопатии, гепатоспленомегалии, длительного субфебрилитета; воспалительных заболеваний органов дыхания, пищеварения, симптомов поражения кожи и слизистых, центральной нервной системы, опорно-двигательного аппарата.

Исследованию подлежали различные биологические субстраты: кровь, слюна, моча, мазки с заднего свода глотки, слезное отделяемое, биоптаты слизистой тонкого кишечника. Исследование лейкоцитарной массы обязательно при клинически выраженной полилимфоаденопатии и лихо-

рабочном состоянии обследуемого ребенка. На первом этапе исследовалась смесь субстратов (моча, слюна, слезное отделяемое), а затем лейкоцитарная масса. Отбор, транспортировку клинического материала проводили в соответствии с МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

Исследования осуществляли методом ПЦР: традиционная ПЦР, Real-TimePCR, ПЦР мини-пулов. Для проведения ПЦР использовали амплификаторы «Терцик МС-2» (ДНК-технология, г. Москва), «GeneCycler» (Bio-Rad, США), «MyCycler» (Bio-Rad, США), RotorGene 6000 (CorbetReseach, Австралия).

Выделение ДНК проводили наборами «АмплиПрайм ДНК-сорб В», «АмплиПрайм ДНК-сорб АМ» производства ФБУН ЦНИИЭ в соответствии с инструкцией по применению.

Использованы тест-системы «АмплиСенс» производства ЦНИИЭ (г. Москва), GenePakDNAPCR фирмы «Изоген» (г. Москва), ООО НПФ «Литех» (г. Москва). Чувствительность тест-систем согласно паспортным данным составляет 1000 клеток или вирионов в 1 мл.

Результаты и их обсуждение.

С целью разработки алгоритма комплексного ПЦР обследования детей на герпесвирусы нами было проведено исследование различных биологических субстратов. На модели ЦМВ и вируса герпеса 6 типа был определен оптимальный субстрат для выявления вирусов семейства Herpesviridae. Анализ частоты выявления ДНК ЦМВ и ВГЧ 6 в различных биологических жидкостях: кровь, слюна, слезное отделяемое, моча, смесь этих субстратов представлен в таблицах 1 и 2. (Табл. 1, 2.).

Как следует из таблиц 1 и 2, наиболее информативно выявление вирусов семейства Herpesviridae в смеси субстратов мочи, слюны, слезного отделяемого. В связи с этим в дальнейшей работе ДНК выделяли из смеси биологических субстратов (слюна, моча, слезное отделяемое) от каждого пациента. Субстраты смешивали в равных количествах таким образом, чтобы объем смеси составил 100 мкл, что является рекомендуемым объемом материала при выделении ДНК с использованием набора реагентов типа «ДНК-Сорб В». ДНК из крови или лейкоцитарной массы выделяли отдельно, исследуемый объем 100 мкл.

Таблица 1.

Частота выявления ДНК ЦМВ в различных субстратах (в %) (n=2624).

Субстрат	Частота выявления (%)
Кровь	6,9±1,0
Слюна	16,2±3,1
Слезное отделяемое	12,1±5,6
Моча	6,9±3,0
Смесь субстратов (моча, слюна, смыв с конъюнктивы)	29,0±0,9

Таблица 2.

Частота выявления ДНК ВГЧ 6 в различных субстратах (в %) (n=769) .

Субстрат	Частота выявления (%)
Кровь	19,7 ±4,7
Биоптат слизистой тонкого кишечника	67,1±5,5
Смесь субстратов (кровь, моча, слюна, смыв с конъюнктивы)	88,2±2,1
Смесь субстратов (моча, слюна, смыв с конъюнктивы)	81,8±4,6

При наличии клинических проявлений (лихорадочное состояние, гепатоспленомегалия, полилимфоаденопатия) проводили исследование лейкоцитарной массы.

Проведен анализ распространенности и особенностей циркуляции герпесвирусов разных типов (I,II,III,IV,V, VI) у детей разных возрастных групп с заболеваниями печени, опорно-двигательного аппарата, органов пищеварения, дыхания, зрения, кроветворения, ЦНС.

Высокий уровень инфицированности герпесвирусами наблюдается у детей первых трех лет жизни (от рождения до 3 лет), частота выявления вирусной ДНК у детей 2-3-летнего возраста превышает аналогичные показатели у новорожденных в 10 раз и более.

Так, высокие показатели частоты выявления ДНК ЦМВ отмечались в группе детей в возрасте 2–3 лет (58-59%). У 4-летних детей и детей старших возрастов активность репликации ЦМВ снижается и частота выявления ДНК к 14-16 годам составляет 8-11%, что, вероятно, связано с биологическими свойствами и тропностью вируса, становлением иммунной системы макроорганизма. (Рис. 1.).

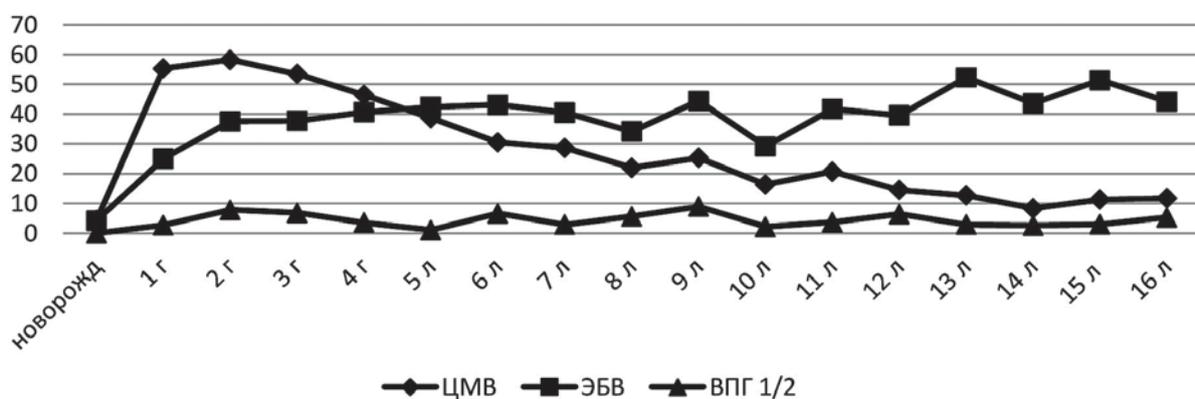


Рис. 1. Частота выявления ЦМВ, ЭБВ и ВПГ 1/2 у детей в возрасте от рождения до 16 лет.

Анализ распространенности ЭБВ среди детей разных возрастных групп выявил следующие тенденции: у новорожденных частота выявления ЭБВ составляла 4,4%, в течение первого года жизни она варьировала от 4,8% до 12,5%, а к 2-летнему возрасту отмечено резкое увеличение числа инфицированных, частота обнаружения ДНК ЭБВ возрастает почти в 10 раз и достигает 38%. Но в отличие от ЦМВ снижения вирусной активности ЭБВ у детей старших возрастов не наблюдается, а происходит дальнейший рост числа инфицированных, максимальные показатели частоты обнаружения ДНК ЭБВ отмечены в группе подростков в возрасте 13 - 16 лет (44-51 %) (рис. 1).

При инфицировании вирусом простого герпеса характерен резкий подъем частоты выявления ДНК ВПГ 1/2 (более чем в 20 раз) у детей первых лет жизни (с 0,3% у новорожденных до 7,8% у детей в возрасте 2 лет), что свидетельствует о том, что вертикальный путь не является ведущим при инфицировании этим патогеном. По мере взросления резкие изменения показателей частоты обнаружения ДНК вируса не отмечены.

Частота выявления ДНК ВПГ 1/2 у детей в возрасте от 2 до 16 лет варьировала от 2,2% до 9,0% (рис. 1). Инфицирование организма ВПГ 1/2, также как и ЦМВ, происходит за счет других путей передачи - контактно-бытового, воздушно-капельного.

В последние годы актуальны исследования, посвященные изучению инфекции у детей, ассоциированной с вирусом герпеса человека 6 типа. Установлено, что ВГЧ 6 является этиологическим фактором или ко-фактором многих патологических состояний у детей и взрослых. [6] Заражение детей происходит в возрасте 0,5-3 года. После первичного заражения ребенка возможны несколько вариантов развития болезни: от псевдокраснухи до возникновения не

дифференцируемых заболеваний, сопровождающихся лихорадочным состоянием, судорожным приступом, сыпью. Причиной почти трети всех судорожных приступов у детей в возрасте до двух лет является ВГЧ 6, что свидетельствует об активном размножении вируса в центральной нервной системе. Основной путь передачи – воздушно-капельный, но не исключены парентеральный, вертикальный, и половой пути.

Одной из задач нашего исследования являлось определение частоты инфицированности ВГЧ 6 детей с патологией различных органов. Частота обнаружения ДНК ВГЧ 6 варьировала от 5,1% до 85,7 % в зависимости от возраста и нозологической формы заболевания.

Результаты ПЦР обследования на инфицированность герпесвирусами детей с различными заболеваниями органов дыхания (ОРЗ/ОРВИ, бронхит, пневмония), пищеварительного тракта (хронический гастродуоденит, дискинезии различных отделов желудочно-кишечного тракта, дисфункциональные расстройства билиарного тракта, эрозивно-язвенный процесс слизистых оболочек ЖКТ, пищевая аллергия), опорно-двигательного аппарата (артриты) и больных лейкозами представлены в таблице 3. (Табл. 3.).

Таблица 3.

Частота выявления герпесвирусов ( в %) у детей с различными заболеваниями.

Форма патологии	Частота выявления (в %)			
	ЦМВ	ЭБВ	ВПГ 1/2	ВГЧ 6
Заболевания органов дыхания (n=640)	41,5±1,9	46,8±1,9	12,8±1,3	59,4±1,9
Заболевания ЖКТ (n=759)	27,1 ± 1,6	36,7±1,7	1,7±0,5	67,5±1,7
Заболевания ЦНС (n=386)	1,9±0,7	15,3±1,8	3,6±0,9	20,9±2,0
Заболевания органов кроветворения (n=315)	37,8± 2,7	46,7±2,8	2,2±0,8	85,4±1,9
Заболевания опорно-двигательного аппарата (n=420)	25,5±2,1	58,8±2,3	11,4±1,6	37,4±2,3
Здоровые (n=127)	26,8±3,9	31,5±4,1	1,6±1,1	40,9±4,4

Установлено, что частота выявления ДНК ЦМВ в группе детей с патологиями органов дыхания была достоверно выше, чем в группах детей с другими патологиями (опорно-двигательного аппарата -  $t=3,5$ ;  $p<0,001$ ; органов пищеварения -  $t= 5,2$ ;  $p<0,001$ ) и в группе здоровых детей -  $t=2,7$ ;  $p<0,01$ . Обращает внимание высокая частота выявления ЦМВ при всех заболеваниях органов дыхания: при пневмонии ЦМВ обнаруживался в 52,8 % случаев, при остром бронхите – в 52,5%, при ОРЗ/ОРВИ – в 49,4 %, при астме – в 40,9%.

Частота выявления ДНК ВПГ 1/2 в группах пациентов с заболеваниями опорно-двигательного аппарата и органов дыхания оказалась достоверно выше, чем в группах детей с патологией пищеварительного тракта ( $t=2,63$ ;  $p<0,01$ ), детей больных лейкозом ( $t=2,61$ ;  $p<0,01$ ) и в группе здоровых детей ( $t=2,1$ ;  $p<0,05$ ).

Максимальный показатель частоты выявления ДНК ЭБВ зарегистрирован в группе детей с заболеваниями опорно-двигательного аппарата. Он составил 58,8 %. Во всех изученных группах частота выявления ДНК ЭБВ оказалась высокой. У больных с заболеваниями органов дыхания этот показатель составил 46,8%, у больных с патологией ЖКТ – 36,7 %, у больных лейкозом – 47%, в группе здоровых детей – 42,8%.

Герпесвирусы 3 и 7 типов выявлялись у детей редко, были зарегистрированы 2 случая выделения ДНК Herpesvirus 3 типа (Варицелла-Зостер вирус) из ликвора детей с менингоэнцефалитом.

Следует отметить высокую частоту смешанного инфицирования вирусами группы герпеса детей всех возрастных групп при всех формах патологии, что совпадает с данными литературы [2, 5, 6]. В группе детей от 1 года до 16 лет смешанное инфицирование наблюдалось чаще, чем в

группе детей до года. Доминировали ассоциации из 2 инфекционных агентов. Основными вариантами ассоциаций были ЦМВ и ВГЧ 6, ЭБВ и ВГЧ 6, ЦМВ и ЭБВ. В 6,5 % случаев обнаружены ассоциации из трех вирусов ЦМВ, ЭБВ и ВГЧ 6. У двух пациентов выявлена ассоциация из четырех представителей семейства *Herpesviridae*.

Следует отметить высокую частоту встречаемости (53,6%) ассоциаций герпесвирусов (ЦМВ, ЭБВ, ВГЧ 6) с бактериями рода *Mycoplasma*.

**Таким образом**, проведенные исследования показали широкую распространенность герпесвирусов среди детей: ЦМВ – до 58%; ЭБВ – до 52%; ВПГ 1/2 - до 9,0%.

Анализ структуры инфицированности детского населения герпесвирусами выявил резкий подъем (в 10-20 раз) показателей частоты выявления ДНК вирусов у детей первых трех лет жизни по сравнению с группой новорожденных, что свидетельствует о домировании воздушно-капельного и контактно-бытового путей передачи инфекции.

Аргументировано использование современных молекулярно-генетических методов в комплексном обследовании детей с воспалительными заболеваниями неустановленной этиологии.

Предложен оптимальный алгоритм использования метода ПЦР для детекции вирусов семейства *Herpesviridae* в различных биологических субстратах от детей с различными формами патологии. Предложенные диагностические алгоритмы используются в лечебных учреждениях Нижнего Новгорода, что повысило качество диагностики и эффективность лечения часто болеющих детей.

Литература:

1. Гранитов В.Н. Герпесвирусная инфекция.// - М. Мед. книга. - 2001. - 80 с.
2. Козлова В.И. Вирусные, хламидийные, микоплазменные заболевания гениталий./ В.И Козлова, А.Ф.Пухнер //Руководство для врачей. Изд-е 6-е,- М. - 2003. - 438 с.
3. Генитальные вирусные инфекции / Молочков В. А., Киселев В. И., Семенова Т. Б. Изд. «Бином пресс», - 2009. - 208 с.
4. Нисевич Л.Л. Врожденные вирусные инфекции и маловесные дети / Л.Л. Нисевич, А.Г. Талалаев, Л.Н. Каск и др. // Вопр. совр. пед. – 2002. – Т.1. – С. 9-13.
5. Bristow V.N. Congenital Cytomegalovirus Mortality in the United States, 1990–2006/ V.N. Bristow, K.A. O’Keefe, S.C. Shafir et all// PLoS. Negl. Trop. Dis.- 2011.- Vol 5.-№4.-P.1140.
6. Краснов, В.В. Инфекционные болезни в практике педиатра.//Н.Новгород. Изд. НижГМА, - 2008.- 352 с.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТИВОХОЛЕРНОГО ЭНТЕРСООРБЕНТА IN VITRO В ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗЕ**

**Овчинникова М.В., Абрамова Е.Г., Сырова Н.А., Исяева М.Н., Киреев М.Н.**  
*ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»  
Роспотребнадзора, Саратов*

Метод детоксикации на основе энтеросорбции нашел широкое применение при различных заболеваниях бактериальной и вирусной этиологии. При холере, ротавирусных гастроэнтеритах, отравлении стафилококковым энтеротоксином использование энтеросорбентов показано с целью купирования диарейного синдрома [1]. Энтеросорбенты рекомендуют назначать уже на догоспитальном этапе, не дожидаясь этиологического подтверждения диагноза [2]. При этом может быть достигнуто более легкое течение заболевания и быстрое выздоровление по сравнению с традиционными схемами лечения. Но энтеросорбенты в большинстве своем не отличаются селективностью по отношению к конкретным патологическим объектам, что зачастую сказывается на эффективности их применения. Поэтому, в настоящее время активно развивается направление, связанное с разработкой селективных энтеросорбционных препаратов со специфическими свойствами, в том числе антитоксической направленности [3].

Антитоксическая селективность экспериментального противохолерного энтеросорбента обусловлена наличием на поверхности сорбционной матрицы молекул антитоксических иммуноглобулинов, выделенных из иммунной сыворотки крови кроликов-продуцентов, иммунизированных холерным токсином.

Неотъемлемой частью производственного процесса иммуноэнтеросорбента является контроль токсиннейтрализующей активности его компонентов и готового препарата в целом. Для постановки контроля используется кожная проба Крейга, которая является «золотым стандартом» определения активности антитоксических холерных сывороток и холерного токсина. При всех своих преимуществах (высокая чувствительность, специфичность) данный метод имеет существенные недостатки: длительность анализа (не менее 5-6 суток), потенциальная возможность алергизации персонала при обработке животных, использование дорогостоящих биомоделей. Не остается без внимания и этическая сторона методов *in vivo*, диктующая потребность гуманизации экспериментов и замены млекопитающих — традиционных лабораторных животных менее развитыми живыми объектами или альтернативными методами: культура клеток или тканей, микроорганизмы и растительные объекты, компьютерные и математические модели, а также использование физико-химических и биохимических систем [4]. В этой связи высокая чувствительность в сочетании с быстротой анализа, возможность одновременного исследования нескольких образцов и отсутствие предварительных операций по очистке и концентрированию необходимого соединения в пробе демонстрируют неоспоримые преимущества иммуноферментного анализа (ИФА) перед другими методами *in vitro* [5]. В свою очередь, разнообразие объектов исследования, создает необходимость разработки методик постановки ИФА для каждого объекта изучения.

Целью настоящего исследования являлась разработка варианта непрямого дот-иммуноанализа (ДИА) для определения уровня токсиннейтрализующих антител в экспериментальном специфическом иммуноэнтеросорбционном препарате.

В работе использовали четыре экспериментальные серии иммуноэнтеросорбента. В качестве твердой фазы применяли нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) Millipore (0,45 мкм), антигеном служил препарат очищенного холерного токсина, отрицательный контроль - нормальные иммуноглобулины кроличьи; для постановки анализа использовали буферные растворы и реагенты для проведения реакций.

НЦМ сенсибилизовали холерным токсином в концентрации 20 мкг/мл и выдерживали в течение 2 ч при  $37\pm 2$  °С. Для блокировки свободных сайтов связывания мембрану погружали в 3 % раствор бычьего сывороточного альбумина на 15 мин при  $20\pm 2$  °С.

Анализируемые образцы энтеросорбента применяли в виде 10 %, 25 %, и 50 % суспензий. Последовательные двукратные разведения суспензий экспериментальных серий иммуноэнтеросорбента готовили в фосфатно-солевом буфере, 0,01 М рН  $7,4\pm 0,2$ , начиная с 1/50.

Исследуемые образцы наносили на НЦМ в виде последовательного ряда точек. Мембраны выдерживали до полного высушивания при  $37\pm 2$  °С. В качестве конъюгата использовали экспериментальный диагностикум (РосНИПЧИ «Микроб»), представляющий собой гидрозоль золота со средним размером частиц 15–17 нм, сорбционно связанный со стафилококковым белком А и стабилизированный 0,5 % раствором ПЭГ-20000. Мембраны, с нанесенными образцами помещали в пакет-камеры и добавляли не менее 400 мкл конъюгата. Мембрану выдерживали до появления красных пятен и промывали деионизованной водой. При необходимости проводили процедуру усиления цветового сигнала, для чего мембрану погружали в раствор физического проявителя, состоящего из 0,5 % раствора лимонной кислоты, 0,2% раствора метола и 0,2% раствора нитрата серебра. Трехкомпонентный проявитель готовили непосредственно перед использованием. После процедуры усиления мембрану отмывали в деионизованной воде и высушивали при  $20\pm 2$  °С. Проводили учет результатов. За титр специфического иммуноэнтеросорбента принимали то наибольшее разведение, при котором визуально регистрировали четко различимое пятно.

В процессе разработки дот-варианта иммуноанализа для иммуоэнтросорбента одним из важных этапов являлся этап предварительной подготовки исследуемого материала, который включал в себя определение оптимальной суспензионной концентрации энтеросорбента, сохранение гомогенности и стабильности энтеросорбционной системы.

В ходе исследований установлено, что 25 % и 50 % суспензионные концентрации являются не пригодными для объективной оценки результатов анализа. На мембранах фиксировалось большое количество сорбционного материала, что приводило к регистрации ложноположительного ответа. При использовании 10 % концентрации, в местах нанесения экспериментального препарата, развивались отчетливые пятна с равномерно убывающей интенсивностью окрашивания. Во избежание быстрого выпадения в осадок микрочастиц энтеросорбента, перед исследованием суспензии встряхивали с использованием «Vortex». Микротитровальные планшеты с последовательными двукратными разведениями образцов помешали на шейкер, и при постоянном вращении платформы устройства, аликвоты препарата отбирались для нанесения на мембрану. Таким образом, поддерживалась гомогенность и стабильность суспензий препарата.

Применение в качестве конъюгата экспериментального диагностикума, содержащего в своем составе маркера наночастиц коллоидного золота существенно упрощало методику окрашивания объекта, исключая ряд дополнительных стадий, и обеспечивало высокую чувствительность реакции, превосходящей чувствительность при использовании классических ферментных меток (пероксидазы хрена, щелочной фосфатазы, галактозидазы).

Результаты дот-иммуноанализа представлены на рисунке 1.

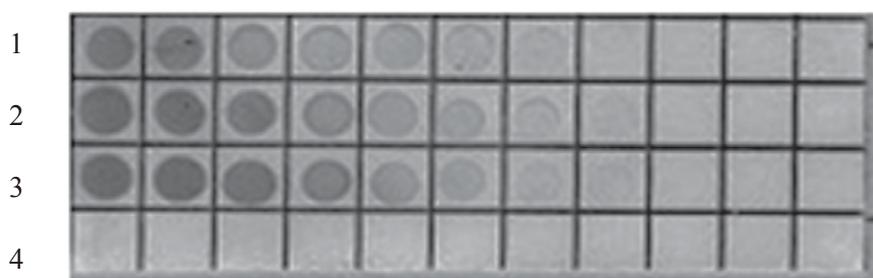


Рис. 1. Результаты определения токсиннейтрализующей активности экспериментальных серий антитоксического иммуоэнтросорбента в непрямом ДИА

- 1 ряд – двукратные разведения энтеросорбента серии 01 с 1:100; титр 1:6400;
- 2 ряд – двукратные разведения энтеросорбента серии 02 с 1:100; титр 1:12800;
- 3 ряд – двукратные разведения энтеросорбента серии 03 с 1:100; титр 1:12800;
- 4 ряд – иммуноглобулины нормальные кроличьи (отрицательный контроль).

Для выявления корреляции результатов дот-иммуноанализа и кожной пробы Крейга был проведен сравнительный анализ результатов определения в указанных тестах активности экспериментальных серий специфического препарата. Установлено, что значения антитоксической активности в кожной пробе Крейга соответствовали значениям от 10500 до 12500 АЕ/мл. Значения титров специфических антител в ДИА колебались в пределах от 1:6400 до 1:12800 для экспериментального энтеросорбента и от 1:6400 до 1:12800 для исходных иммуноглобулинов. Коэффициент корреляции составил  $r = 0,90$ .

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанный дот-вариант иммуноанализа может быть использован для определения токсиннейтрализующей активности экспериментального антитоксического иммуоэнтросорбента, а выявленная корреляция результатов тестов *in vitro* и *in vivo* позволяет рекомендовать непрямой дот-иммуноанализ в качестве альтернативного метода пробе Крейга.

Литература:

1. Беляков, Н.А. Энтеросорбция – механизм лечебного действия / Н.А. Беляков, А.В. Соломенников // Эфферентная терапия. – 1990. – № 2. – С. 20–26.
2. Ратникова, Л. Эффективность энтеросорбентов при острых кишечных инфекциях / Л. Ратникова, М. Пермитина, А. Попилов // Врач. – № 7. – 2007. – С. 36-37.
3. Бородин, Ю.И. Энтеросорбция и энтеросорбенты / Ю.И. Бородин, Л.Н. Рачковская // Консилиум. – 2000. – № 3 (13). – С. 10–14.
4. Каркищенко, Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских целях / Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачев. – М. : 2010. – 173. с.
5. Большаков, Е.А. ИФА и ПЦР - современные методы клинической лабораторной диагностики/ Е.А. Большакова // Поликлиника. – 2012. – № 2. – С. 16 – 22.

## ИССЛЕДОВАНИЕ CAG A ГЕНА И СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ХЕЛИКОБАКТЕРНОЙ ИНФЕКЦИИ

**Перфилова К.М., Неумоина Н.В., Шутова И.В., Ларионова Т.В., Трошина Т.А.,  
Неумоина М.В., Ефимова Е.И., Орлова К.А.**

*ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И. Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

Пилорический хеликобактер (*H. pylori*), попадая в слизистую оболочку желудка, вызывает повышение активности факторов агрессии (пепсин, соляная кислота) и снижение факторов защиты (бикарбонаты, простагландины, желудочная слизь). Эти процессы в слизистой оболочке вызываются цитотоксинами, адгезинами и другими факторами патогенности микроорганизма, синтез которых кодируется определенными генами. Тяжесть клинического течения хеликобактериоза во многом зависит от степени патогенности штаммов возбудителя, что, в свою очередь, определяется наличием и особенностями цитотоксических генов. *H. pylori* обладает множеством факторов патогенности, позволяющих ему выживать и персистировать в агрессивной среде желудка. Эти факторы условно можно разделить на факторы колонизации (подвижность, адгезины, уреазы), факторы персистенции (ферменты, продукты метаболизма, липополисахариды, кокковые формы) и факторы, вызывающие заболевание (провоспалительные факторы, фосфолипазы, липополисахариды, вакуолизирующий цитотоксин (*VacA*), цитотоксин-ассоциированный антиген (*CagA*), перекрестно реагирующие антигены) [1, 2, 3, 4]. Большая часть генов, кодирующих выработку патогенных факторов, сконцентрирована в «острове патогенности» (PAI), содержащем около 40 генов. Одним из наиболее значимых генов является *Cag A* ген (cytotoxin – associated gene) – маркер «острова патогенности», способствующий повышению активности антрального гастрита, участвующий в язвообразовании, развитии атрофии, процессе дегенерации и разрушении межклеточного матрикса и базальной мембраны, стимуляции выработки провоспалительного интерлейкина 8 [2, 5, 6, 7, 8].

### **Цель.**

Оценка связи частоты выявления гена *Cag A* и динамики антител к нему с клинико-эндоскопическими проявлениями заболевания, что может способствовать пониманию механизмов патогенеза хеликобактериоза и способствовать оптимизации лечения данного заболевания.

### **Материалы и методы.**

Обследовано 1980 пациентов с обострением хронических болезней органов пищеварения. У 240 больных с *H. pylori*-ассоциированными заболеваниями желудка и 12-перстной кишки проведено определение гена *Cag A*. В исследования включены 110 больных с обострением язвенной болезни 12-перстной кишки или желудка, эрозивным гастродуоденитом (1 группа) и 130 больных с обострением хронического гастрита и дуоденита без деструктивных изменений сли-

зистой оболочки (2 группа). ПЦР-детекция наличия ДНК *H.pylori* в желудочном соке, выявление *Cag A*-гена *H.pylori* проводилось в лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. Исследование наличия в сыворотке крови антител класса IgG к бактериальному антигену *H.pylori* и антител класса IgG к его гену *CagA* проведено методом ИФА (тест-системы «Био-Рад» и «Вектор-Бест») в лаборатории клиники инфекционных болезней.

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с применением программы «STATISTICA», версия 6.0 и статистических функций программы Excel по стандартным формулам [9].

#### Полученные результаты и обсуждение.

При обследовании 1980 больных установлено сочетание хронических заболеваний пищеварительной системы (обострения хронического гастрита, гастроэзофагеальной рефлюксной болезни, холецистита, панкреатита) с *H.pylori*-инфекцией в 78% случаев. Наиболее частыми формами инфекции были *H.pylori*-ассоциированный гастрит и гастродуоденит. В период наблюдения (2011 – 2015 гг.) среди больных, обратившихся с гастроэнтерологическими жалобами, отмечено значительное снижение доли пациентов как с впервые выявленной, так и рецидивирующей язвенной болезнью желудка и 12-перстной кишки, ассоциированной с *H.pylori*, что связано с достигнутыми успехами в эрадикационной терапии.

Проведено изучение клинических особенностей хеликобактерной инфекции в зависимости от генотипа *H.pylori* и специфического иммунного ответа. Результаты определения *Cag A* гена представлены в таблице 1. Частота выявления *Cag A* при *H.pylori*-ассоциированных заболеваниях желудка и 12-перстной кишки составила 66,2%. В 1-й группе больных генотип *H.pylori*, содержащий *CagA* выявлен чаще (81,8%), чем во 2-й группе (53,1%) ( $p < 0,05$ ), что позволяет сделать вывод о более тяжелом течении *Cag A*-позитивного варианта хеликобактериоза. Полученные результаты согласуются с данными литературы [2, 5, 6]. Исследователи Санкт-Петербурга установили, что на территории их города преобладают штаммы *H.pylori*, имеющие ген *Cag A* (81,63% выделенных штаммов). Доля *CagA*-позитивных штаммов у больных в Санкт-Петербурге при язвенной болезни и гастритах равна 72,2% и 64,7%, соответственно.

Таблица 1

Частота выявления ДНК *H.pylori* и *Cag A* гена в разных группах больных

Выявленная патология	Количество обследованных больных	Обнаружено <i>Cag A</i> +			
		При поступлении		Перед выпиской	
		абс.ч.	% (M±m)	абс.ч.	% (M±m)
Язва желудка и (или) 12-перстной кишки	110	90	81,8±3,7	6	5,5±2,2
Недеструктивный гастродуоденит	130	69	53,1±4,4	11	8,5±2,4
Всего	240	159	66,2 ±3,0	17	7,1±1,7

В нашем исследовании значимая доля больных с эрозивно-язвенными поражениями желудка и 12-перстной кишки (около 20%) не имела *Cag A* гена в генотипе *H.pylori*, но нуждалась в обязательном проведении этиологического лечения. В то же время среди пациентов с неэрозивным гастродуоденитом, ассоциированным с *Cag A*+ *H.pylori*, не все больные имели

абсолютные показания к проведению курса эрадикации согласно последним международным и Российским рекомендациям. Учитывая возможные патологические эффекты, связанные с Cag A геном, мы склоняемся в пользу проведения этиологического лечения у больных с неэрозивным гастродуоденитом с Cag A+ статусом.

Исследование больных *H.pylori*-ассоциированной гастродуоденальной патологией, получавших эрадикационную терапию, на маркеры хеликобактерной инфекции в динамике заболевания позволило установить следующее. Если перед началом эрадикации *H.pylori* в биоптатах методом ПЦР выявлен от 75,4% больных при неэрозивном гастрите до 88,2% при эрозивно-язвенной патологии, то после окончания лечения перед выпиской из стационара на фоне благоприятной клинической динамики данный маркер продолжал выявляться не более, чем у 8,8% первично *H.pylori*-позитивных лиц, то есть реже в 10 раз. Аналогичная тенденция установлена при исследовании того же биопсийного материала на Cag-A ген *H.pylori*: так, если до начала этиотропного лечения указанный генотип микроба обнаружен в 66,2 % случаев, то перед выпиской частота его определения уменьшилась до 7,1 %. После проведенного лечения на фоне благоприятной клинико-эндоскопической динамики отмечено снижение частоты выявления ДНК *H.pylori* и Cag A гена в первой группе больных до 7,3 и 5,5%, во второй – до 10,0 и 8,5% соответственно. Персистирование маркеров хеликобактерной инфекции сопровождалось сохранением некоторых клинических симптомов хронической функциональной диспепсии.

Динамика выявления указанных маркеров хеликобактериоза у пациентов с *H.pylori*-ассоциированной эрозивным гастритом и неязвенной патологией в периоде обострения и реконвалесценции имеет, по большому счету, сходные характеристики. Следует отметить, что персистирование маркеров хеликобактерной инфекции сопровождается до 38,4% случаев затяжное течение заболевания и соответствующий симптомокомплекс в виде болевого, диспептического, астеновегетативного синдромов. Так же отмечен определенный параллелизм отсутствия или менее благоприятной эндоскопической динамики и продолжающегося выявления в биопсийном материале вышеуказанных маркеров хеликобактериоза.

Cag A ген – важный фактор, способствующий повышению вирулентных свойств *H.pylori*, но не определяющий обязательное развитие эрозивно-язвенных поражений гастродуоденальной зоны. Определение Cag A позволяет получать информацию о присутствии гена фактора патогенности *H.pylori* и может быть использовано при осуществлении эпидемиологического мониторинга за хеликобактериозом.

Таким образом, Cag A выявляется достоверно чаще при эрозивно-язвенных заболеваниях 12-перстной кишки и желудка, чем при неструктивных гастродуоденитах ( $p < 0,05$ ), однако частое (> 50%) выявление этого маркера у больных гастритом не свидетельствует об абсолютном его патогенном действии, индуцирующем деструкцию слизистой оболочки. Сам факт выявления Cag A-позитивного *H.pylori* не может служить абсолютным показанием к проведению эрадикации. У обследованных пациентов определение показаний к эрадикации *H.pylori* проводилось в соответствии с Маастрихтскими соглашениями [10, 11, 12].

Исследование IgG-антител к *H.pylori* и к Cag A-гену этого микроба показало, что у подавляющего большинства больных с деструктивной патологией (69,1%) выявляются одновременно оба маркера в средних (1:80 – 1:160) и высоких ( $\geq 1:320$ ) титрах. В группе больных с гастродуоденитом частота выявления антител *H.pylori* была также высокой (66,9%), но титры их были существенно ниже (1:20 – 1:80). Анти-Cag A в этой группе выявлялись реже (43,1%) и в более низких титрах (1:10 – 1:40).

Исследование динамики Ig G антител к *H.pylori* на разных этапах наблюдения (перед выпиской, через 3 - 6 мес. и 7 - 12 мес.) показало, что при благоприятном течении заболевания имеет место постепенное уменьшение числа лиц с высокими титрами антител (с 64% в период обострения до 52%, 41% и 30% соответственно срокам восстановительного периода). Серологическое тестирование, осуществленное в вышеуказанных группах больных, позволило установить определенные закономерности циркуляции IgG-антител к *H.pylori* и IgG-антител к CagA гену указанного микроба у пациентов с различными клиническими вариантами *H.pylori*-ассоциированной гастродуоденальной патологии (таблица 2).

Частота вариантов выявления IgG-антител к *H.pylori* и его CagA-антигену при хеликобактерной инфекции

Контингент больных	Варианты результатов исследований на IgG – антитела к <i>H.pylori</i> и его CagA-антигену					
	анти- <i>H.pylori</i> полож	анти-CagA полож	анти- <i>H.pylori</i> и анти-CagA полож	анти- <i>H.pylori</i> полож и анти-CagA отриц	анти- <i>H.pylori</i> отрицат и анти-CagA полож	анти- <i>H.pylori</i> отрицат и анти-CagA отрицат
Язва желудка и (или) 12-перстной кишки	91 %	63,6 %	54,5 %	27,2 %	0	18,3 %
Гастродуоденит недеструктивный	76,4 %	47,1 %	29,3 %	17,6 %	0	53,1 %

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в периоде обострения заболевания в обеих группах больных IgG анти-*H.pylori* и IgG анти-Cag A, с некоторым преобладанием показателей 1 группы, выявляются достаточно часто: в 1-ой – 91% и 63,6%; во второй - 76,4% и 47,1% соответственно. Отмечены различные варианты сочетаний результатов серологических исследований по данным маркерам, в частности такие комбинации как: «IgG анти-*H.pylori* и анти-Cag A одновременно положительны» отмечены в 1 группе у 54,5% лиц, во второй группе - у 29,3%; «IgG анти-*H.pylori* +, а анти-Cag A отрицательны» выявлены в 1 группе у 27,2% больных, во второй группе - у 17,6%; «IgG анти-*H.pylori* и анти-Cag A одновременно отрицательны» в 1 группе найдены у 18,3%, во второй – у 53,1% пациентов.

Исследование динамики изменения концентрации IgG-антител к *H.pylori* на разных этапах периода выздоровления, а именно – перед выпиской, через 3-6 месяцев и спустя 7-12 месяцев, показало (Таблица 3), что при благоприятном течении заболевания имеет место постепенное уменьшение числа анти-*H.pylori* серопозитивных лиц с высокими титрами антител с 64,7% в период обострения до 52,5%, 41,2%, 30,8% соответственно указанным срокам восстановительного периода.

Отмечен параллелизм вялой динамики выздоровления при *H.pylori*-ассоциированной гастродуоденальной патологии и стойких позитивных реакций на антитела к *H. pylori*.

Таким образом, на представленном клиническом материале показано, что воспалительный процесс при гастродуоденальной патологии в подавляющем большинстве случаев (до 86,7%) этиологически связан с *H.pylori*-инфекцией. Данные этиологические ассоциации подтверждены результатами серологической диагностики проведенные в остром периоде и на разных стадиях выздоровления с использованием тестов на IgG-антитела к *H.pylori*. Установлена определенная зависимость глубины патологического процесса, особенно протекающего с эрозированием и изъязвлением слизистой в гастродуоденальной зоне, от вида инфекции и, в частности, более тяжелое течение Cag A-позитивного варианта хеликобактериоза.

Успешная антихеликобактерная эрадикация и благоприятное течение заболевания коррелирует с положительной клинической динамикой, исчезновением *H.pylori* из биоптатов и снижением концентрации специфических антител.

Динамика концентрации IgG – антител к *H.pylori* в фазе обострения и на разных этапах периода реконвалесценции при хеликобактериозе

Сроки исследований на IgG антитела к <i>H.pylori</i>	Титры антител к <i>H.pylori</i> в ИФА				
	Менее 1 : 10	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80 и выше
При поступлении в стационар	15,0 %	20,3 %	24,1 %	32,4 %	8,2 %
			64,7 %		
Перед выпиской	36,8 %	10,5 %	15,8 %	26,4 %	10,5 %
			52,7 %		
Через 3 – 6 месяцев после выписки	47,3 %	11,5 %	27,6 %	7,1 %	6,5 %
			41,2 %		
Через 7 – 12 месяцев после выписки	69,2 %	-	15,0 %	15,8 %	-
			30,8 %		

#### Заключение.

Итогом проведенных исследований на репрезентативной группе больных с *H.pylori*-ассоциированной гастродуоденальной патологией, этиологически подтвержденной с помощью метода ПЦР, явилось уточнение некоторых этиопатогенетических параметров хеликобактерной инфекции, а именно: динамики выявления *H.pylori*, его Cag A – содержащих вариантов в желудке и 12-перстной кишке и методом ИФА - антител к ним в крови на разных стадиях заболевания и в периоде реконвалесценции. При сопоставлении результатов ПЦР-детекции гена CagA с клиническими особенностями заболевания и эндоскопической картиной получены данные, свидетельствующие о том, что токсигенные изоляты *H. pylori*, имеющие генотип «CagA+» чаще ассоциированы эрозивно-язвенными заболеваниями желудка (81,8%). Большинство CagA-отрицательных вариантов *H. pylori* (75,3%) выделено от больных с неструктурной патологией. Показано, что у пациентов с язвенной болезнью IgG-антитела к *H.pylori* и к CagA гену выявляются в более высоких титрах (1:80 – 1:320), чем при неструктурной патологии (1:10-1:80). Длительное персистирование (более 6 месяцев) антител к CagA в средних и высоких титрах свидетельствует о сохранении хеликобактериоза. Успешная антихеликобактерная эрадикация и благоприятное течение заболевания коррелирует с положительной клинической динамикой, исчезновением *H.pylori* и снижением концентрации специфических антител.

#### Литература:

1. Исаков, В.А. Хеликобактериоз / В.А. Исаков, И.В. Домрадский. - М.: Медпрактика, 2003. - 412 с.
2. Барышникова Н.В. Оценка изменения уровня интерлейкинов при инфицировании САГА (+) и САГА (-) штаммами *Helicobacter pylori* / Н.В. Барышникова, Ю.П. Успенский, Е.В. Балукова, А.Н. Суворов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2015. – Прил. № 46. – Т.25. -№ 5. – С.16.
3. Graham, K.S. Contemporary diagnosis and management of *H. pylori* associated gastrointestinal diseases: handbooks in Health Care Co / K.S. Graham, D.Y. Graham // Newtown. - USA, 2002.
4. Wu, C. Clinical Relevance of the vacA, iceA, cagA, and flaA genes of *Helicobacter pylori* strains isolated in Eastern Taiwan / C.Wu, P. Chou, C. Le // J. Clin. Microbiol. - 2005. - Vol. 43. - № 6. - P. 2913-2915.

5. Жебрун, А.Б. Характеристика популяции *Helicobacter pylori* у пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта / А.Б. Жебрун, А.В. Сварваль, О.А. Балабаш // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2013. - N 2. - С.90-96.
6. Барышникова Н.В. Актуальные проблемы диагностики хеликобактериоза // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2009. - №2. – С. 50-58.
7. Suzuki, T. Systematic review and meta-analysis: importance of CagA status for successful eradication of *Helicobacter pylori* infection / T. Suzuki, K. Matsuo, A. Sawaki // Aliment. Pharmacol. Ther. - 2006. – V. 24. – P. 273–280
8. Umit, H. The relationship between virulence factors of *Helicobacter pylori* and severity of gastritis in infected patients / H. Umit, A. Tezel, C. Bukavaz // Dig. Dis. Sci. - 2009. – V. 54 – P. 103–110.
9. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. [пер. с англ.] - М.: Практика, 1998. – 459 с.
10. Исаков, В.А. Новые рекомендации по диагностике и лечению инфекции *H.pylori* – Маастрихт IV / Под ред. В.А. Исакова // Best Clinical Practice (русское издание). – 2012. В. 2. - С.4 – 23.
11. Ракитин, Б.В. *Helicobacter pylori* – Маастрихт IV [Электронный ресурс] / Б.В. Ракитин // Режим доступа: [www.gastroscan.ru](http://www.gastroscan.ru) (добавлено 27.11.2013).
12. Malfertheiner, P. Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht IV/Florence Consensus Report / P. Malfertheiner, F. Megraud, C.A. O’Morain // Gut. – 2012. – V.61. - N 5. - P. 646-664.

## АВТОНОМНЫЙ НАБОР ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА

**Полтавченко А. Г., Нечитайло О.В.**

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"»  
Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл.*

Описан автономный набор для мультиплексного дот-иммуноанализа на плоских белковых матрицах (иммуночипах). Набор сочетает мультиплексность с простотой изготовления и применения. Он включает в себя белковые матрицы и аналитическую ванну, заполненную готовыми растворами, и позволяет в полевых условиях одновременно выявлять до 10 видов антител к возбудителям инфекционных заболеваний. При сходной чувствительности набор имеет очевидные преимущества перед наборами для ИФА по информативности, оперативности получения результатов, расходу реагентов, трудоемкости и удельной стоимости.

Ключевые слова: инфекционные заболевания, специфическая индикация, мультиплексный дот-иммуноанализ, автономный набор

### **Введение**

Одним из основных способов диагностики и дифференциации инфекционных заболеваний является серологическое обследование пациентов с целью выявления маркеров (антител классов IgG и IgM) к отдельным возбудителям. При смешанных инфекциях, когда организм поражается сразу несколькими возбудителями, а также при дифференциации заболеваний, имеющих сходную клиническую картину, часто бывает необходимо выполнение нескольких иммунологических тестов. В настоящее время арсенал иммунодиагностических средств представлен в основном моноспецифическими наборами, ориентированными на использование в специально оборудованной лаборатории. Таким образом, комплексный анализ с использованием таких наборов представляет собой длительную и дорогостоящую процедуру.

В настоящей статье описана технология мультиплексного дот-иммуноанализа, потенциально пригодная для комплексной диагностики инфекционных заболеваний во внелабораторных условиях.

## Результаты и обсуждение

Набор для мультиплексного тестирования включает в себя комплект белковых матриц и аналитическую ванну. Основные элементы набора, схема рабочей области иммуночипа и примеры результатов дот-анализа представлены на рисунке 1.

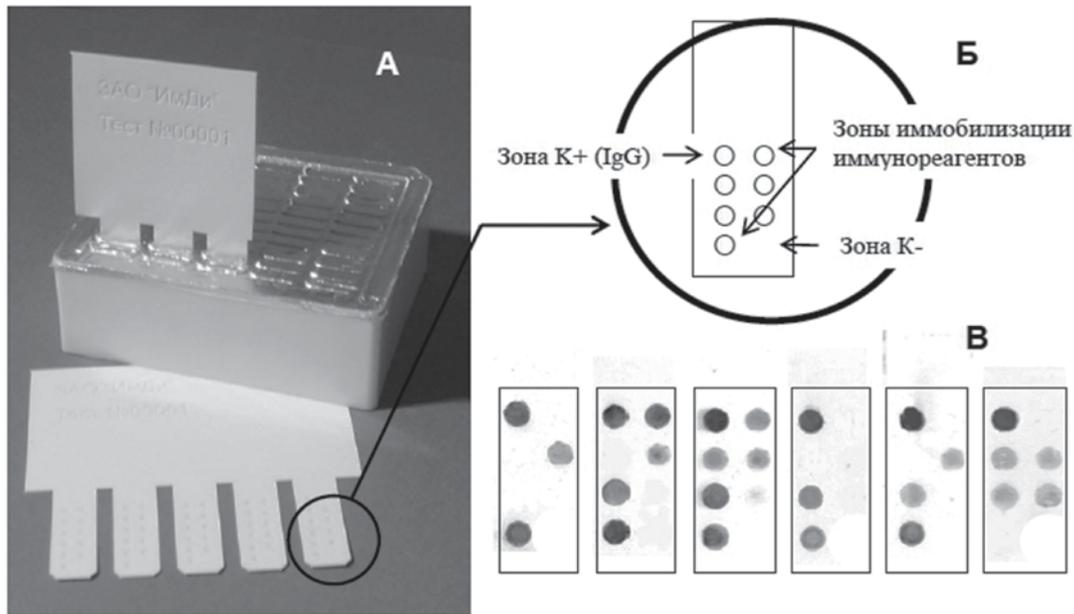


Рис. 1. Основные элементы набора для мультиплексного дот-иммуноанализа маркеров инфекционных заболеваний (А), схема рабочей области иммуночипа (Б) и примеры результатов дот анализа (В).

Белковая матрица (иммуночип) представляет собой подложку, на поверхности которой в определенном порядке дискретно иммобилизован набор иммунореагентов захвата. За рубежом основной тенденцией при разработке плоских белковых матриц является стремление разместить максимальное число тестов на миниатюрной подложке [15]. Однако такой подход порождает массу технических проблем, требует разработки новых дорогостоящих технологий, материалов и оборудования и поэтому в настоящее время далек от внедрения в широкую практику [12, 13]. При выборе стратегии изготовления чипов мы сознательно отказались от их чрезмерной миниатюризации, ограничив число определяемых инфекций до 10 и размер участков нанесения антител на поверхности подложки до пятен диаметром 2-3 мм. Такой подход позволяет легко контролировать нанесение антител на подложку и учитывать результаты визуально. С другой стороны, такое число инфекций обычно охватывает список актуальных инфекций и потому может быть и достаточным и удобным для практики [2].

Материалом подложки могут служить некоторые марки синтетической бумаги [2]. Они обладают однородностью поверхности; способностью связывать и прочно удерживать на своей поверхности белки; инертностью к растворам, используемым при выполнении анализа; белым фоном; механической прочностью и влагостойкостью. Из такого материала несложно изготовить подложки любой конфигурации. В нашем варианте набор белковых матриц выполнен в виде гребенки с пятью зубцами, каждый из которых является иммуночипом.

Специфичность и чувствительность теста в определяющей степени зависят от качества использованных реагентов, а также от того в каких количествах и насколько хорошо они закреплены на плотной подложке. Иммобилизацию реагентов захвата на подложке проводили физической адсорбцией. На эффективность сорбции влияют не только физико-химические свойства

иммобилизуемых реагентов и подложки, но и концентрация белков, а также условия инкубации. Экспериментально установлено, что оптимальным для иммобилизации белков на синтетической бумаге является 0,005-0,01 М боратный буферный раствор в диапазоне pH 6,0-8,0. Насыщение участка подложки достигается при нанесении 2 мкл сорбционной смеси, содержащей 10-20 мкг/мл белка (20-40 нг белка на одно пятно) [9]. При сенсibilизации ячейки полистирольного планшета для иммуноферментного анализа (ИФА) обычно используют 100 мкл раствора с концентрацией иммунореагента около 5 мкг/мл. Таким образом, расход реагента захвата на один анализ в нашем наборе, по крайней мере, в 10 раз меньше, чем в ИФА.

Мы сравнили два режима иммобилизации антител: первый – сушка каплей (2 мкл) сорбционной смеси на воздухе при комнатной температуре и второй – инкубация подложек с сорбционной смесью во влажной камере при 4°C в течение 8 часов. Эти эксперименты показали, что наиболее эффективная сорбция происходит при инкубации во влажной камере, а сушка каплей на воздухе значительно снижает сигнал [9].

Многорядная аналитическая ванна изготовлена из инертного полимерного материала, заполнена готовыми к использованию растворами и герметизирована фольгированным материалом. Ванна объединяет 5 модулей для индивидуальных тестов с набором от 9 до 12 ячеек (в зависимости от схемы и задач анализа) [8]. Размеры блока матриц и ячеек ванны совместимы, что позволяет одновременно выполнять 5 мультиплексных тестирований.

В мультиплексном анализе используют различные метки и стратегии генерирования сигнала [12, 15]. Наиболее подходящими для создания автономного теста с бесприборным учетом результатов представляются хромогенные – ферментные и каталитические метки. Сравнение наиболее популярных меток – пероксидазы, щелочной фосфатазы и коллоидного золота с различными системами проявления оптического сигнала показало, что золи золота в сочетании с серебряным проявлением имеют существенные преимущества перед ферментными метками и обеспечивают максимальную чувствительность и наглядность результатов [10].

Схема тестирования спектра антител приведена на рисунке 2. На подложке иммобилизованы антигены возбудителей инфекций, а детекция проводится с использованием коллоидного золота, связанного со стафилококковым протеином А или антителами к иммуноглобулинам человека [7].

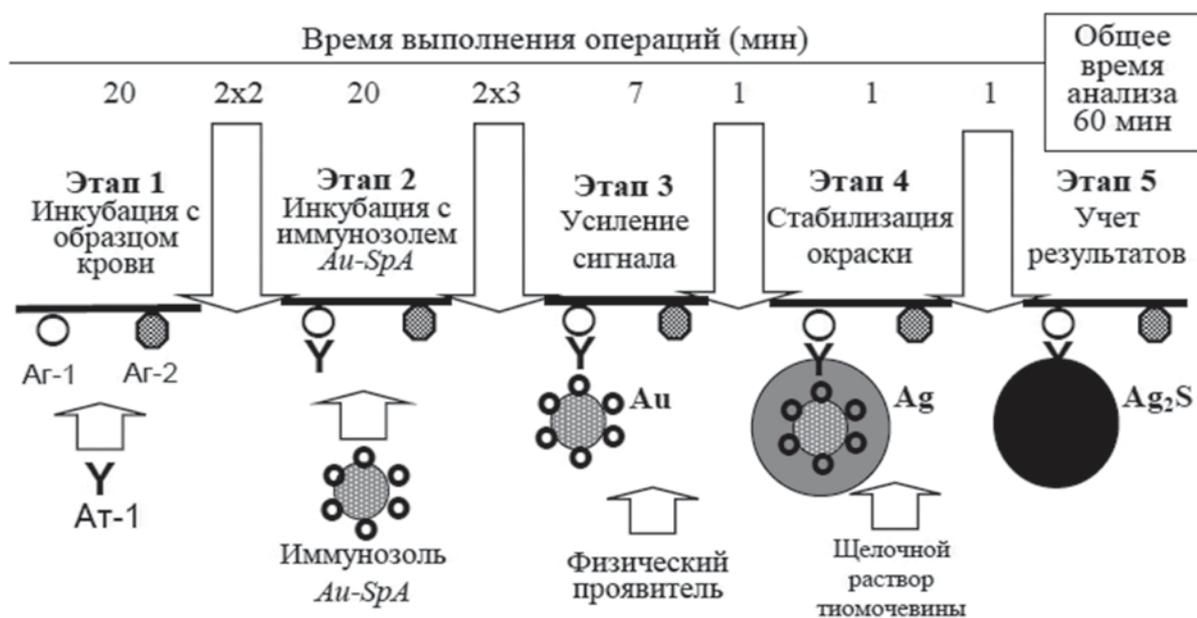


Рис. 2. Общая схема мультиплексного дот-иммуноанализа антител с применением иммунозоля золота, усилением сигнала физическим проявлением и стабилизацией окраски щелочным раствором тиомочевины.

Схема анализа включает усиление оптического сигнала за счет каталитического восстановления на золотых частицах серебра из проявителя. Проявитель содержит растворимую соль серебра и метол (восстановитель) в кислой среде [10]. В наших наборах проявитель представлен в виде таблеток (4 мг) сухой смеси метола и лимонной кислоты, помещаемых в ячейки аналитической ванны, а также 0,4%-го раствора нитрата серебра в темном флаконе. При выполнении анализа в ячейку с таблеткой вносится 150 мкл воды и непосредственно перед проявлением – 150 мкл раствора азотнокислого серебра. Время проявления – 8 мин. Бывают случаи неравномерных отложений серебра, имеющих нюансы окраски. Для того, чтобы избежать связанных с этим эффектом осложнений при учете результатов в схему анализа введен этап стабилизации сигнала, заключающийся в кратковременной (1 мин) обработке проявленного иммуночипа в щелочном растворе тиомочевины. В результате такой обработки серебро превращается в сульфид, устойчивый к внешним воздействиям и имеющий равномерную окраску [7]. Все варианты мультиплексного анализа проводятся при комнатной температуре и предусматривают инкубации с образцом и иммунозолом в течение 20-25 мин с промежуточными промывками иммуночипов (кратность промывок указана на рисунке 2) по 1-2 мин.

При выполнении анализа фольга над ячейками ванны вскрывается перфоратором, в первый ряд ячеек вносятся исследуемые образцы и погружаются иммуночипы. Затем чипы с определенными временными интервалами перемещаются по следующим рядам ячеек и, после выемки из последней, производится учет результатов по наличию темных пятен в зонах нанесения соответствующих иммунореагентов захвата. Возможен визуальный и инструментальный учет результатов анализа. Инструментальный учет заключается в обработке отсканированного изображения чипа специальной компьютерной программой, при этом возможна денситометрия, вычитание фоновых значений (ОПкрит) по индивидуальным точкам иммуночипа, получение ориентировочных количественных показателей, а также вывод на печать протокола анализа [4].

Сравнение мультиплексных тестов с соответствующими моноспецифическими наборами показало, что по чувствительности, специфичности и воспроизводимости наши наборы не уступают планшетному варианту ИФА [5, 11], но имеют перед ними преимущества в информативности, оперативности, автономности, простоте выполнения и стоимости анализа. Набор для 20 мультиплексных тестирований имеет вес 400-500 г, он удобен при транспортировке, содержит все необходимые компоненты и может использоваться во внелабораторных условиях.

Наборы для мультиплексного тестирования могут использоваться для дифференциальной диагностики заболеваний со сходной клинической симптоматикой, для первичного скрининга пациентов на наличие контактов с определенной группой инфекций, а также для комплексной оценки эффективности вакцинопрофилактики [3].

Основной проблемой при создании мультиплексных иммунохимических тестов является получение необходимого спектра высокоспецифичных, высокоочищенных, сохраняющих активность при связывании с твердой фазой и совместимых на одной подложке иммунореагентов захвата.

### **Заключение**

Описанный выше мультиплексный анализ при сходной чувствительности имеет очевидные преимущества перед традиционным ИФА по информативности, скорости получения результатов, расходу реагентов, трудоемкости и удельной стоимости. Автономность и простота выполнения анализа позволяют применять его в полевых условиях, как для диагностики инфекционных заболеваний, так и для эпидемиологического контроля населения.

Технология мультиплексного иммуноанализа разработана при частичной финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.607.21.0020).

### **Литература:**

1. Мельниченко П.И., Шумилов В.И., Карниз А.Ф. Совершенствование индикации возбудителей опасных инфекционных болезней в условиях локальных войн и вооруженных конфликтов // ЖМЭИ. – 2000. - № 2. - С. 3-6.

2. Ерш А. В., Полтавченко А.Г. «Выбор формата и материала для изготовления подложки белковых чипов // журнал «Международный Научный Институт «Educatio»». – 2014. - № 3. - часть 5. – С. 16-19.
3. Ерш А.В., Полтавченко А.Г., Пьянков С.А., Агафонов А.П., Кривенчук Н.А., Буторин Д.В. Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям// Вопр. вирусол. – 2015. - № 1. – С. 45-49.
4. Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Пьянков С.А., Никонов А.М., Волков Г.Н, Кривенчук Н.А. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. Инструментальный учет результатов анализа// «Биотехнология». – 2013. - № 4. – С. 74-82.
5. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М., Кривенчук Н.А. Многопрофильная иммунохимическая индикация возбудителей инфекционных заболеваний // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. - № 5. - С. 39-42.
6. Полтавченко А.Г., Кривенчук Н.А., Серпинский О.И., Тюнников Г.И. «Способ многопрофильного иммунохимического выявления антигенов в жидких образцах». - Патент РФ № 2296995, приоритет от 20.06.03, опубл. 10.04.2007, Бюл. № 10.
7. Полтавченко А.Г., Кривенчук Н.А., Ерш А.В., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. «Набор для многопрофильного иммунологического анализа антител в препаратах крови». – Патент РФ № 2495434, приоритет от 09.12.2011, опубл. 10.10.2013, Бюл. № 28.
8. Полтавченко А.Г., Кривенчук Н.А., Ерш А.В., Снопков В.П., Филатов П.В., Буторин Д.В. «Ванна для выполнения мультиплексного дот-иммуноанализа». - Патент № 2517035, приоритет от 13.02.2013, опубл. 27,05,2014, Бюлл. № 15.
9. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М., Кривенчук Н.А. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 2. Иммобилизация антигенов на подложке белкового чипа // Биотехнология. - 2007.- № 1. - С. 86-94.
10. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М., Кривенчук Н.А., Карпышев Н.Н. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний 3. Визуализация результатов анализа // Биотехнология. – 2007. - № 2. – С. 63-71.
11. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 4. Лабораторные испытания многопрофильного теста // Биотехнология. – 2007. - № 3. – С. 88-94.
12. Bastarache J. A., Koyama T., Wickersham N. E. et al. Accuracy and reproducibility of a multiplex immunoassay platform: A validation study // J. Immunol. Meth. - 2011. - Vol. 367. - P. 33-39.
13. Jones K. 15th Anniversary Essay: Assay Development // IVDT. – 2010. - № 8. – P. 30-38.
14. Kosack S., Nick S., Shanks L. Diagnostic accuracy evaluation of the ImmunoFlow HCV rapid immunochromatographic test for the detection of hepatitis C antibodies // J. Immunol. Meth. - 2014. - Vol. 204. - P. 6-10.
15. Sinclair J.C. Constructing arrays of proteins // Curr. Opin. Chem. Biol. - 2013. - Vol. 17. - P. 946-951.

## **СЕЛЕКТИВНАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ САПА**

**Сенина Т.В., Жога Л.К., Илюхин Е.В., Шубникова Е.В.**

*ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт  
Роспотребнадзора, Волгоград*

Сап известен со времен Гиппократ и Аристотеля (480 - 350 лет до н.э.), он относится к классическим зоонозным инфекциям и протекает у человека в острой септической и хронической формах со специфическими поражениями кожи, слизистых оболочек, мышц, суставов и внутренних органов. В ХУІІІ веке уже признавалась заразная природа сапа и были довольно точно определены пути передачи инфекции, а в середине ХІХ века была экспериментально доказана

контагиозность больных сапом лошадей. Именно эти данные еще до выделения возбудителя в чистой культуре послужили основанием для введения в ветеринарные законодательства европейских государств жестких требований по изоляции и уничтожению лошадей, больных сапом [1, 2, 3].

Среди буркхольдерий медицинского значения возбудитель сапа во многом уникален. Это касается, в частности, его экологии (зооноз), структуры (атрих), ограниченной метаболической активности (наиболее прихотлив к факторам роста). Можно считать, что особенность морфологии клеток и обмена веществ является следствием эволюционного перехода к облигатному паразитизму. Естественной средой его обитания являются только организмы животных. Животные заражаются при взаимном контакте, в условиях совместного содержания, при кормлении из общих кормушек, на водопое. В природных условиях сапом болеют непарнокопытные (лошади, ослы, мулы), они же являются и резервуаром инфекции. Заболевание может регистрироваться у хищников семейства кошачьих, верблюдов и людей, контактировавших с больными животными семейства лошадиных [4]. Заболевание сапом людей в современных очагах эпизоотий сапа не отмечено, есть лишь описание внутрилабораторного заражения сапом научного работника [5]. Следует также упомянуть, что возбудитель сапа *Burkholderia mallei* относится к биотеррористическим агентам категории В по классификации Американского Центра по контролю заболеваний (CDC, США) на основании комплекса патогенных свойств: тяжесть течения при наличии проблем диагностики и лечения, возможность аэрогенного заражения, ведущего к острой форме пневмонии, отсутствие специфических средств защиты (вакцины) [6].

Проблема выделения возбудителя сапа из объектов внешней среды или из организма животных, зараженных этим возбудителем, остается актуальной и на сегодняшний день. Идентификация *B. mallei*, при отсутствии эпидемической настороженности, при случайном выделении в лабораториях, работающих с автоматическими системами, весьма затруднена, особенно, вследствие слабой биохимической активности культур и противоречивой интерпретации ряда диагностических тестов [7]. Возбудитель сапа является относительно прихотливым микроорганизмом, он требователен к составу питательной среды, поэтому при исследовании материала при выделении возбудителя сапа приходится обращать особое внимание на полноценный состав используемой питательной среды.

Для выделения возбудителя сапа чаще всего используют мясо-пептонный агар с глицерином (г/л), следующего состава: пептон 10,0; хлористый натрий 5,0; агар 25,0; глицерин 30,0; мясная вода до 1 л, рН 7,0 – 7,2 [8]. Недостатком этой среды является отсутствие в среде ингибиторных компонентов, которые бы тормозили рост посторонней микрофлоры. Также применяется среда, предложенная Miller et al. в 1948 г., мясо-пептонный агар с добавлением кристаллвиолета [9].

Нами была предпринята попытка конструирования селективной питательной среды, обеспечивающей благоприятные условия для культивирования возбудителя сапа и подавляющей рост сопутствующей микрофлоры при выделении возбудителя сапа из объектов внешней среды и из организма больных животных. Введение в состав среды ингибиторов роста посторонней микрофлоры обеспечивало подавление роста сопутствующей микрофлоры, не влияя на возбудитель сапа, поскольку он устойчив к ванкомицину, полимиксину В и кристаллическому фиолетовому.

В экспериментальную среду для выделения возбудителя сапа были включены следующие компоненты (г/л): пептон – 6,5; дрожжевой экстракт – 3,5; хлористый натрий – 5,5; глицерин – 50,0 мл; агар – 12,5; мясная вода до 1 л, кипятили до растворения вышеперечисленных компонентов, устанавливали рН 6,7 - 6,9 с помощью раствора соляной кислоты. Разливали мерно по флаконам и стерилизовали при 110о С в течении 30 минут. В охлажденную после автоклавирования среду ex tempore добавляли: кровь чувствительного к сапу животного – золотистого хомячка 100,0 мл; ванкомицин 0,015; полимиксин В – 0,015; кристаллический фиолетовый – 0,0025, тщательно перемешивали и разливали по чашкам Петри по 20 мл. Использование в питательной среде вышеперечисленных компонентов позволяет выделить возбудитель сапа из объектов внешней среды или из организма животных, зараженных этим возбудителем.

В качестве контрольной среды использовали мясо-пептонный агар с 5 % глицерина. В качестве объекта внешней среды приготавливали суспензию из почвы, для этого в 100 мл забуференного раствора хлористого натрия рН 7,0 помещали 1,0 г почвы. Параллельно готовили взвесь из внутренних органов мыши, хранившейся при комнатной температуре в течение 24 ч после

гибели. В эти объекты вносили возбудитель сапа (*B. mallei* 10230) таким образом, чтобы в объеме 1 мл содержалось 100 микробных клеток (м.к.) патогенного возбудителя.

Посев производили по 0,1 мл на чашки Петри с опытной и контрольной средами. Посевы инкубировали в термостате при 370 С. Просмотр засеянных чашек осуществляли каждые 24 ч. На контрольных чашках Петри с мясо-пептонным агаром и 5 % глицерина спустя 48 ч инкубации при посеве всех объектов вырастали сплошные газоны посторонней микрофлоры. На чашках Петри с предложенной опытной питательной средой при посеве всех объектов наблюдался рост культуры возбудителя сапа. Рост посторонней микрофлоры на опытной питательной среде ингибировался (Табл. 1).

Таким образом, наличие предлагаемой питательной среды актуально, и она может быть использована для выделения возбудителя сапа из материала, загрязненного посторонней контаминирующей микрофлорой, через 48 ч инкубации посевов при 370 С при наличии искомого возбудителя в количестве 10 м.к. в посевной дозе 0,1 мл.

#### Литература:

1. Кравченко А.Т. Сап // Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней / Под ред. К.И. Матвеева. – Москва, 1973. – С. 537 – 542.
2. Цветков Н.Е., Черняк В.З. Сап // Сельхозиздат. – 1947. – 257 с.
3. De Shazer D., Byrne W.R., Culpepper R et al. Laboratory – acquired human glanders – Maryland. – MMWR. – 2000. – N 23. – P. 532 – 535.
4. Илюхин В.И., Ротов К.А., Сенина Т.В. и др. Химиотерапия острых форм сапа в эксперименте // Антибиотики и химиотерапия. – 2012. - № 11-12. – С. 11 – 15.
5. Dvorak G.D., Spickler A.R. Glanders //JAVMA. -2008. – Vol. 233, N 4. – P. 570 – 577.
6. Waag D.M., De Shazer D. Glanders. New insights into an old disease // In: Infections disease: biological weapons defence. Ed by L.E. Lindler, F.J. Lebeda, Korch, Nq. – 2004. – P. 209 – 237.
7. Сенина Т.В. Биологические свойства и дифференциальная диагностика буркхолдерий, имеющих значение в медицинской практике: Автореф. дис...канд. биол. наук. – Саратов, 2004. – 24 с.
8. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. – М.: Медицина, 1982. - С. 282 – 283.
9. Miller W.R., Pannell L., Gravitz L. et al. Studies on certain biological characteristics of *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei* II. Virulence and infectivity for animals // J. Bacteriol. – 1948. – Vol. 55, N1. – P. 127 – 135.

## ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА *LACTOBACILLUS FERMENTUM* 90 ТС-4 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Точилина А.Г.<sup>1</sup>, Белова И.В.<sup>1</sup>, Соловьева И.В.<sup>1</sup>, Ефимов Е.И.<sup>1</sup>, Горлова И.С.<sup>2</sup>,  
Иванова Т.П.<sup>1</sup>, Жирнов В.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород;

<sup>2</sup>ФГУП «Научно-производственное объединение «Микроген» Минздрава России, Нижний Новгород

В ходе исследования с использованием спектра современных методов, в том числе полногеномного секвенирования, было изучено филогенетическое положение производственного штамма *Lactobacillus fermentum* 90 ТС-4 и установлены основные характеристики его генома. Необходимо отметить, что ранее принадлежность этого штамма к виду *L. fermentum* была поставлена под сомнение [1].

Был изучен лиофильно высушенный штамм *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4, находящийся на хранении в нескольких коллекциях: Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, коллекции Научного центра экспертизы средств медицинского назначения, Государственной коллекции лактобацилл ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, заложенные на хранение в 1969, 1994, 2000, 2014 годах, а также из коллекции маточных культур ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Нижний Новгород «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио».

Лиофильно высушенный штамм восстанавливали и готовили II генерацию культуры с использованием среды MPC-1 (*Lactobacillus* MRS broth, HiMedia), среды MPC-4 (*Lactobacillus* MRS agar, HiMedia) и газогенерирующих пакетов GasPak Anaerobe Gas Generating Pouch System with Indicator, США.

Выросшие колонии оценивали по морфологии, по 15 колоний каждого морфологического вида отбирали для проведения масс-спектрометрии с помощью времяпролетного MALDI масс-спектрометра Autoflex (Bruker Daltonics, Германия). Для создания филогенетического дерева на основе анализа MSP (Main Spectra) использовали алгоритмы программы BioTyper 3.0, пакет BioTyper MSP Dendrogram Creation Standart Method с настройками по умолчанию (измерение корреляционной дистанции с использованием алгоритма UPGMA).

Для изучения биохимии отбирали культуры, по результатам масс-спектрометрии имевшие значения Score 2,100 и более.

Расширенное изучение биохимических свойств штамма проводили с использованием стрипов API 50 CHL (Biomerieux, Франция), пробоподготовку, культивирование, идентификацию микроорганизмов и интерпретацию полученных результатов осуществляли согласно инструкциям производителя. Для культур с изученным биохимическим профилем была выполнена ПЦР с дальнейшим секвенированием полученного фрагмента.

Для постановки ПЦР гена 16S рРНК геномную ДНК выделяли методом нуклеосорбции с помощью набора «ДНК-сорб В» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва), использовали стандартные реагенты производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора и специфические праймеры: FL 3' -gag ttt gat cct ggc tca gga- 5', RL 3' - cga cga cca tga acc acc tgt -5' [2]. Праймеры синтезированы ЗАО «Синтол», Москва. ПЦР проводили на приборе «Терцик-МС2» («ДНК-технология», Москва).

Секвенирование наработанных фрагментов гена 16S рРНК выполняли с использованием секвенатора GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter). Полученные сиквенсы анализировали в программе BLAST ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) и MEGA [3].

В работу по полногеномному секвенированию отобрали культуру штамма из рабочей коллекции маточных культур в филиале ФГУП «НПО «Микроген» в г. Нижнем Новгороде, как культуру, с подтвержденным по MALDI TOF таксономическим статусом, имеющую максимально высокий Score, и типичный для вида биохимический профиль.

Для проведения полногеномного секвенирования геномную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия), подготовку библиотек производили с помощью набора TrueSeq (Illumina Inc, США), секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina), Исходные риды были обработаны утилитой Trimmomatic со стандартными параметрами для Illumina. Затем обработанные риды использовались для сборки генома de novo при помощи программ Spades, MIRA 4.0, Newbler 2.6. Наилучшая сборка, использованная для последующего анализа, была выбрана на основании максимального значения N50 и суммарной длины сборки. Для идентификации и фильтрации загрязнений использовались утилиты BLAST и MEGAN. Аннотация генома производилась с помощью утилиты Prokka v. 1.11 [4] и геномного сервера RAST (<http://rast.nmpdr.org>), минимальная допустимая длина рамки считывания - 90 п.н. Поиск ортологов был выполнен с помощью утилиты OrthoMCL v1.7.

Для построения филогенетического дерева были выбраны однокопийные гены, представленные у всех рассматриваемых штаммов. Однокопийность определялась на основе построенных при помощи OrthoMCL групп гомологий. В качестве пороговых значений в OrthoMCL использовали параметры по умолчанию (BLAST e-value < 10e-5 и percent match > 50%), при этом алгоритм включает помимо применения пороговых значений процедуру кластеризации (алгоритм MCL),

на основе которой устанавливаются группы гомологии. Гены одного штамма входящие в одну группу гомологии являются наиболее вероятно паралогами и считались нами многокопийными.

Исследование CRISPR кассеты проводили с использованием программы CRISPRs research ([www.crispr.u-psud.fr](http://www.crispr.u-psud.fr)).

При расसेве на плотную питательную среду MPC-4 штамма *L. fermentum* 90 TC-4 наблюдали серые звездчатые плоские шероховатые колонии, диаметром 2-5 мм. В мазках отмечали характерные для вида *L. fermentum* полиморфные грамположительные палочки одинаковой толщины и разной длины – от коккобацилл до длинных нитей.

В ряде случаев на чашках кроме серых звездчатых плоских шероховатых колоний диаметром 2-5 мм наблюдали второй тип колоний - белые блестящие выпуклые с ровными краями, от 0,5 до 3 мм в диаметре. В мазках клеток колоний второго типа наблюдали грамположительные палочки средних размеров, равномерно окрашенные, расположенные поодиночке или в виде коротких цепочек - морфология культуры характерная для *L. plantarum*. Оба вида культуры были далее идентифицированы с использованием масс-спектрометрии и классического биохимического метода.

При MALDI TOF идентификации установлено, что культура, образующая серые шероховатые звездчатые колонии, относится к виду *L. fermentum*. Высокие значения Score values (выраженного в относительных единицах коэффициента сходства спектров) от 2,0 до 2,217 (категория А) достоверно подтверждали принадлежность культуры к данному виду. Культура, образующая белые блестящие выпуклые колонии, в свою очередь идентифицирована как *L. plantarum*, значения Score values варьировали от 1,862 (категория В) до 2,091 (категория А).

С использованием полученных масс-спектров рибосомальных белков референсных штаммов из коллекции лактобацилл ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора была построена дендрограмма, иллюстрирующая видовую принадлежность штаммов *L. fermentum* 90 TC-4 и их положение среди штаммов других видов рода *Lactobacillus* (рис. 1).

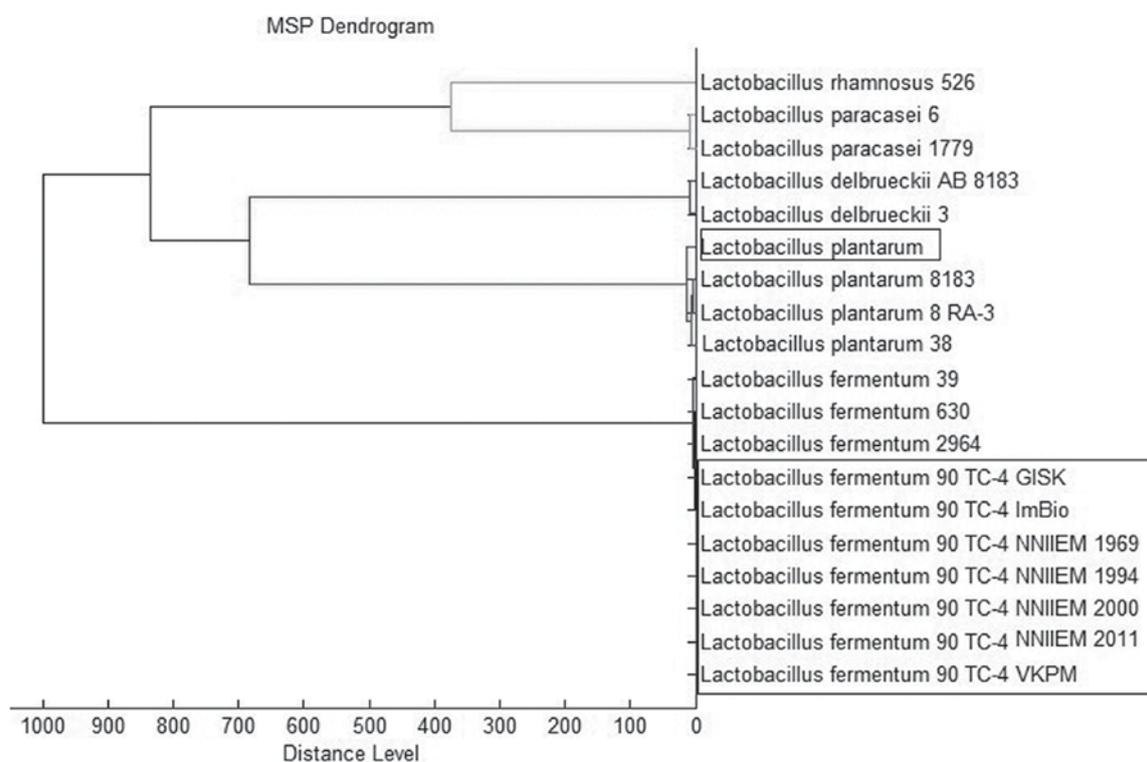


Рис. 1. Расположение штаммов *L. fermentum* 90 TC-4 среди штаммов рода *Lactobacillus* по результатам кластерного анализа MALDI масс-профилей: *L. plantarum* (отмечен рамкой) – штамм-спутник, загрязнивший штамм *L. fermentum* 90 TC-4; *L. fermentum* 90 TC-4 GISK - штамм, полученный из Научного центра экспертизы средств медицинского назначения; *L. fermentum* 90 TC-4 ImBio - штамм, полученный из коллекции маточных культур ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Нижний

Новгород; *L. fermentum* 90 ТС-4 VKPM - штамм, полученный из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ; *L. fermentum* 90 ТС-4 NNИЕМ 1969, 1994, 2000, 2011 - штаммы из Государственной коллекции лактобацилл ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора сушек различных годов; *L. plantarum* 8183, 8 RA-3, 38; *L. rhamnosus* 526, *L. paracasei* 6, 1779, *L. delbrueckii* АВ 8183, 3; *L. fermentum* 39, 630, 2964 - штаммы из Государственной коллекции лактобацилл ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.

На рисунке видно, что штаммы *L. fermentum* 90 ТС-4, полученные из разных коллекций, образуют единую группу (объединены рамкой) и кластеризуются с другими штаммами этого вида. Штамм-спутник *L. plantarum* вошел в состав группы, образованной штаммами этого вида.

При изучении биохимических свойств установлено, что все исследованные культуры обладают характерным биохимическим профилем, который соответствует заявленному в паспорте штамма [5]: ферментируют галактозу, глюкозу, фруктозу, мальтозу, лактозу, мелибиозу и раффинозу, гидролизуют эскулин.

Культура-спутник *L. plantarum* (всего исследовано 10 культур) характеризуется выраженной метаболической активностью, что соответствует данному виду: ферментирует глюкозу, целлобиозу, эскулин, фруктозу, галактозу, лактозу, мальтозу, маннозу, мелибиозу, салицин, сорбит, сахарозу, трегалозу.

Необходимо подчеркнуть, что виды *L. fermentum* и *L. plantarum* значительно отличаются по биохимическим свойствам, что обуславливает четкую дифференциацию этих двух видов [6].

Далее, видовая принадлежность изучаемых штаммов была подтверждена с помощью секвенирования гена 16S рРНК. Анализ последовательности данной детерминанты показал, что *L. fermentum* 90 ТС-4 относится к виду *L. fermentum*, наиболее близким является штамм *L. fermentum* IFO 3956 (коэффициент сходства – 99%).

Далее проводилось полногеномное секвенирование штамма, была произведена de novo сборка генома, в результате было собрано 93 контига со средним покрытием 254.12. Общая длина всех контигов составила 1,533,642 н.о., GC состав - 51,9 %. В процессе аннотации и анализа генома было определено 1620 последовательностей, кодирующих белки, 54 последовательности тРНК и 11 – рРНК.

Для сравнительного геномного анализа исследуемой бактерии и наиболее близких организмов использовались последовательности геномов вида *L. fermentum*, доступные в базе данных NCBI. Геномная последовательность штамма также задепонирована в базе данных NCBI BioProject (геномный проект ID: LBDH00000000).

Было проведено множественное выравнивание генов-ортологов, которые присутствуют у всех представителей рода *Lactobacillus*, на основе которого было построено филогенетическое дерево (рис.2).

Видно, что штамм *L. fermentum* 90 ТС-4 расположен в ветви, соответствующей штаммам данного вида, в то время как все штаммы *L. plantarum* сгруппированы в другой ветви. Таким образом, исследования группы генов ортологов в пределах рода *Lactobacillus* показали, что исследуемый штамм принадлежит к виду *L. fermentum*.

Также полученная геномная последовательность была проанализирована с использованием геномного сервера RAST (Rapid Annotation using Subsystems Technology) (<http://rast.nmpdr.org>) По данным RAST наиболее близкие к изученному изоляту штаммы также относятся к виду *L. fermentum*: *L. fermentum* IFO 3956, *L. fermentum* 28-3-CHN, *L. fermentum* ATCC 14931, *L. fermentum* СЕСТ 5716.

При анализе генома штамма *L. fermentum* 90 ТС-4 с использованием RAST установлено, что геном не содержит генов вирулентности и островков патогенности.

В геноме содержится 133 геномных детерминанты, вовлеченных в метаболизм углеводов, что отражает слабую биохимическую активность штамма. Установлено, что в геноме детерминированы характерные для гетероферментативных лактобацилл пути метаболизма углеводов (ферменты гликолиза и пентозофосфатного пути, соответствующие транспортные системы), метаболизма пирувата, моно-, ди- и олигосахаридов, сахароспиртов.

Были идентифицированы фосфотрансферазные системы (PTS) для различных сахаров, включая лактозу, фруктозу, глюкозу, сахарозу, галактозу, маннозу.

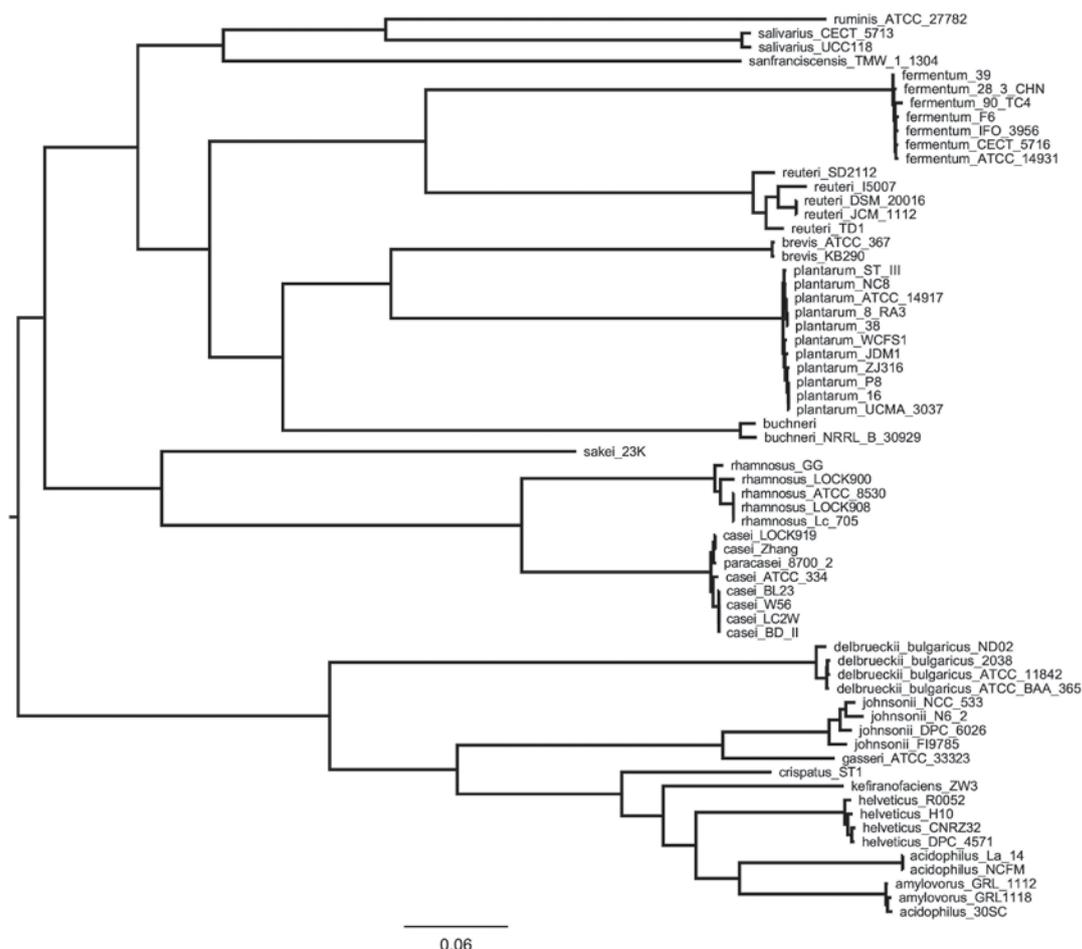


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основании анализа консервативных генов представителей рода *Lactobacillus* с использованием алгоритма Maximal Likelihood.

Детерминированы галактокиназа (LBDH01000037.1, WU69\_07355) и фосфофруктокиназа (LBDH01000015, WU69\_04305) - ферменты метаболизма галактозы и фруктозы, способность метаболизировать раффинозу, мелибиозу галактозу и лактозу связана с наличием в геноме  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидазы (LBDH01000037.1, WU69\_07340; LBDH01000063.1, WU69\_08605), а мальтозы – мальтозофосфорилазы (LBDH01000011.1, WU69\_03215). Штамм обладает  $\beta$ -гликозидазной активностью (LBDH01000092.1, WU69\_09220), способен расщеплять эскулин (6,7-дигидроксикумарин 6-гликозид).

Штамм не способен ферментировать маннозу, что было выявлено в ходе изучения его биохимических свойств, хотя согласно RAST в геноме детерминирован полноценный оперон, содержащий гены метаболизма маннозы. Оперон включает регулятор маннозного оперона ManO, фермент маннозо-6-фосфат изомеразу и три специфичных PTS.

Неспособность микроорганизма метаболизировать рибозу, возможно, связана с отсутствием соответствующей пермеазы RbsD (согласно данным RAST), что отличает данный штамм от прочих представителей вида, трегалозу – с отсутствием соответствующей фосфоенолпируватзависимой транспортной фосфотрансферной системы PTS Tre, а сахарозу - с отсутствием PTS ScrA.

Арабинозу микроорганизм не метаболизирует, так как отсутствует генетически детерминированный путь ее метаболизма (арабинозный оперон).

В рамках данного исследования была также охарактеризована CRISPR система штамма. Данная система представляет собой кластрированные, равноудаленные удаленные друг от друга короткие палиндромные повторы (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats),

которая обеспечивает защиту клеток от проникновения чужеродной генетической информации - бактериофагов и конъюгативных плазмид.

Кассета CRISPR/Cas штамма *L. fermentum* 90 TC-4 имеет размер 1308 п.н, имеет в своем составе комплекс генов, кодирующих Cas белки (WU69\_02845, WU69\_02850, WU69\_02855, WU69\_02860, WU69\_02865, WU69\_02870, WU69\_02875, WU69\_02880) и содержит 22 повтора, длиной 28 нуклеотидов, которые разделяют 21 уникальный спейсер. С большой долей вероятности система CRISPR/Cas данного штамма относится к типу I [7]. При исследовании палиндромного повтора с использованием BLAST установлено, что его последовательность аналогично последовательности повтора CRISPR-Cas системы штамма *L. fermentum* F-6.

Что касается нуклеотидных последовательностей спейсеров, то два из них гомологичны последовательностям участков геномов бактериофагов лактобацилл (*Lactobacillus phage LF1, complete genome*, номер GenBank HQ141410.1, *Lactobacillus phage LfeInf, complete genome*, номер GenBank KP054477.1), остальные спейсеры не имеют гомологии с известными нуклеотидными последовательностями.

Таким образом, в ходе выполненной нами работы были изучены варианты штамма *L. fermentum* 90 TC-4, полученные из различных коллекций. Идентификация, выполненная с использованием MALDI TOF масс-спектрометра, секвенирования гена 16S рРНК и полногеномного секвенирования подтвердила их таксономический статус и принадлежность к виду *L. fermentum*.

Было выявлено, что в ряде случаев штамм *L. fermentum* 90 TC-4 представлял собой смешанную культуру, так как был загрязнен культурой *L. plantarum*, что и могло послужить причиной «подмены» на каком-либо этапе работы со штаммом, так как при работе по лиофильному высушиванию и сохранению микроорганизма в коллекции отбирают «типичные» колонии в S-форме, подобные образуемым штаммом *L. plantarum*, в то время как штамм *L. fermentum* 90 TC-4 образует колонии R-типа серого цвета, что является его отличительной особенностью. После проведения работ по рассеву штамма, в Государственной коллекции лактобацилл ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной сохранена чистая культура штамма *L. fermentum* 90 TC-4.

В ходе настоящих исследований был получен подробный биохимический профиль штамма, изучены генетические детерминанты, ответственные за метаболизм углеводов, и описаны особенности строения CRISPR/Cas кассеты.

Необходимо подчеркнуть, что при работе с «музейными» штаммами микроорганизмов необходимо проводить контроль чистоты используемой культуры на всех стадиях эксперимента с использованием современных методов, например MALDI TOF масс-спектрометрии, для предупреждения возможной контаминации и получения ложных результатов.

То есть особую важность приобретает преаналитический этап исследования, в противном случае могут быть получены недостоверные результаты, несмотря на использование высокотехнологичных и специфичных методов исследований, включая полногеномное секвенирование.

#### Литература:

1. Ботина, С.Г., Реклассификация отечественных пробиотических культур рода *Lactobacillus* / С.Г. Ботина, К.М. Климина, Н.В. Коробан, А.М. Амерханова, В.В. Зинченко, В.Н. Даниленко // Генетика. – 2010. – Т. 46, № 11. – С. 1485-1492
2. Chagnaud, P. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria application to six common *Lactobacillus* species/ P. Chagnaud // J of Microbiol Meth. – 2001. – V.44. –P.139-148.
3. Tamura, K. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods/ K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson // Mol. Biol. and Evol. – 2011. – V. 28. P. 2731-273.DOI:10.1093/molbev/msr121.
4. Seemann, T. “Prokka: rapid prokaryotic genome annotation/ T. Seemann // Bioinformatics. – 2014. – V. 15. – P. 2068-9. DOI: 10.1093.
5. Тарасова, Н.Б. Сравнительное изучение лактобактерий и *E.coli* M-17 в целях разработки нового препарата – Лактобактерина: дис...докт. мед. наук: 03.096/ Тарасова Наталья Борисовна. – Горький, 1969. – 245 с.
6. The Prokaryotes / A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer, Hammes W.P., Hertel C. – Springer-Verlag, 1992. – 467 p.

7. Makarova, K.S. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems / K.S. Makarova, Y. I. Wolf, O.S. Alkhnbashi etc // Nature Reviews Microbiology. – 2015. – V.13. – P. 1-15.

## ОЦЕНКА МИКРОФЛОРЫ СВОБОДНО ОТДЕЛЯЕМОЙ МОКРОТЫ У ПАЦИЕНТОВ С ХОБЛ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Федотов В.Д.<sup>1,2</sup>, Самойлова О.Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Нижегородский НИИ гигиены и профпатологии» Роспотребнадзора, Нижний Новгород; <sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Нижний Новгород

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) представляет собой серьезную медико-социальную проблему отечественной и мировой медицины. ХОБЛ выходит на первое место среди причин преждевременной смерти легочных больных [1]. Одной из главных особенностей течения этой патологии является чередование обострений и периодов стабильного течения. Согласно авторитетным исследователям, одной из главных причин обострений является активация условно-патогенной микрофлоры бронхиального секрета [2].

Нап М. К. и соавт. [3] показали, что при нетяжелых формах ХОБЛ основными возбудителями являются *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* и т.д. Согласно же Garcia-Nucez M. и Hillas G. При тяжелых формах болезни ведущее значение приобретают синегнойная палочка и некоторые другие условно-патогенные микроорганизмы [4,5].

Вместе с тем, в этих исследованиях не сообщалось о влиянии коморбидной патологии на микробный пейзаж свободно отделяемой мокроты у больных с ХОБЛ. К тому же, подобных данных относительно ХОБЛ профессиональной этиологии сравнительно мало.

**Итак, целью исследования было:** изучить микробный пейзаж мокроты у пациентов ХОБЛ профессиональной этиологии в стабильной фазе заболевания в зависимости от сопутствующей патологии (бронхиальной астмы и сахарного диабета 2 типа).

### Материал и методы

Исследования выполнены на базе терапевтического стационара ФБУН ННИИГП Роспотребнадзора. Объектом наблюдения были рабочие металлургической и машиностроительной промышленности (производственный стаж мужчин, женщин 23,5±7,4 года и 20,2±4,8 лет), подвергавшиеся систематическому производственному воздействию кремнийсодержащей и металлической пыли в концентрациях, превышавших предельно допустимые уровни (более 10 мг/м<sup>3</sup>, при ПДК 2,0 мг/м<sup>3</sup>). Все пациенты находились под динамическим наблюдением.

Обследованные были разделены на 3 группы, сопоставимые по полу и возрасту. Первую группу составили 133 человека (115 мужчин и 18 женщин), страдающих нетяжелой ХОБЛ стабильного течения без сопутствующей патологии. Возраст обследованных этой группы составил 55,7±1,9 лет.

Вторую группу составили 110 пациентов (67 мужчин и 43 женщины) с наличием нетяжелой ХОБЛ стабильного течения и вторичной бронхиальной астмой, вне обострения; их возраст составлял 56,4±2,1 лет.

Третья группа состояла из 65 лиц (35 мужчин и 30 женщин) нетяжелой ХОБЛ стабильного течения и ассоциированным сахарным диабетом (СД) 2 типа; возраст в группе равнялся 56,1±2,0 годам. По поводу СД пациенты получали пероральную адекватную сахароснижающую терапию, у них отсутствовали клинически значимые микро- и макроангиопатии.

Длительность ХОБЛ во всех группах колебалась от 6 до 12 лет.

В ходе исследования проведен сравнительный анализ микробиоценоза мокроты у всех пациентов указанных групп. Материалом для бактериологического анализа служила свободно

отделяемая мокрота. Забор материала осуществлялся в соответствии с требованиями Приказа Минздрава СССР от 22.04.1985г. №535 [6]. Все образцы окрашивались по Граму с последующей бактериоскопией для оценки качества препарата и определения морфотипа бактерий. Образцы, удовлетворявшие критериям Murrey-Washington (<10 эпителиальных клеток и >25 лейкоцитов в поле зрения  $\times 100$ ) [7] исследовали на бактериальные культуры.

Для выявления аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов выполнялся посев на селективные и дифференциально-диагностические питательные среды: кровяной агар, шоколадный агар, энтерококкагар, среду Эндо, агар Бэрда-Паркера. Для выделения дрожжеподобных грибов рода *Candida* использовалась универсальная среда Сабуро и хромогенная среда для грибов рода *Candida*.

Чашки с кровяным и шоколадным агаром инкубировали при температуре +35 °С в атмосфере с повышенным содержанием углекислого газа в течение 20-24 часов. Чашки с селективными средами инкубировали при температуре +37 °С в течение 24-48 часов. Грибы выращивали при +28-30 °С в течение четырех суток.

Идентификация аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов проводилась с использованием общепринятых стандартных методов и коммерческих тест-систем: СИБ (Микроген), ПБДЭ и ПБДС (Диагностические системы), Ауксоколор (Bio-Rad).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel. При сравнении групп применяли двусторонний критерий Стьюдента.

### **Результаты и обсуждение**

При оценке состояния микробиоценоза мокроты выделены группы грамотрицательных бактерий (микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae: *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp и другие; неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы (НГОМ): *Ps. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp, *Alcaligenes* spp и др.), грамположительные кокки (стрептококки Pyogenic group, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp) и грибы. Результаты микробиологического исследования у пациентов всех групп показали отсутствие роста в 23,9% образцов мокроты. В первых двух группах микроорганизмы высевались соответственно в 78,4% и 67,8%, а при сочетании ХОБЛ и СД – достоверно чаще (в 91,7%) ( $p < 0,001$ ). Следует указать, что данные результаты были получены в период отсутствия обострения ХОБЛ при плановых обследованиях пациентов. Достоверное отличие данного показателя в третьей группе, вероятно, связано с неблагоприятным влиянием коморбидного СД.

В 39,1% положительных образцов мокроты был высеяна бактериальная монокультура, причем достоверно чаще в первой группе – соответственно в 43,2%.

При наличии у пациентов ХОБЛ сопутствующей патологии достоверно чаще высевались микробные ассоциации. Так, при сочетании ХОБЛ и БА (вторая группа) моноколонии были получены только в 37,1% ( $p_{1-2} < 0,001$ ,  $p_{2-3} < 0,001$ ). а при ХОБЛ и СД 2 (третья группа) - только в 31,3% положительных микробиологических посевов ( $p_{1-3} < 0,001$ ). Монокультуры наиболее часто были представлены семейством Enterobacteriaceae (28,4%), грибами рода *Candida* (43,0%) и бета-гемолитическими стрептококками (26,6%). Несмотря на отсутствие в выборке пациентов с тяжелой и крайне тяжелой ХОБЛ, *S. aureus* высевалась в 17,3%, а *Ps. aeruginosa* – в 7,3%.

Достаточно часто выделялись ассоциации двух, трех и более микроорганизмов (в 36,9% положительных образцов мокроты). В первых двух группах пациентов частота выделения ассоциаций микробов достоверно не различалась и составляла 35,3% и 30,7%, соответственно. При ХОБЛ с сопутствующим СД 2 типа этот показатель оказался статистически значимо выше – 59,4% ( $p < 0,001$ ). Наиболее частыми участниками ассоциаций выступали грамположительные кокки (бета-гемолитические стрептококки группы А, *S. aureus* и *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp.), грибы рода *Candida* и грамотрицательные бактерии (*E. coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Ps. aeruginosa*).

В нашем исследовании не было выявлено превалирования гемофильной палочки, которая, при ХОБЛ, по данным литературы, является основной причиной бактериальных обострений [2,8].

Частое обнаружение в посевах мокроты грибов рода *Candida* в диагностическом титре во всех четырех группах можно рассматривать как следствие регулярно проводимой антибактериальной

и гормональной терапии, а у больных с ХОБЛ и СД 2 типа активному размножению грибов способствовала и гипергликемия.

Среди грибов рода *Candida* во всех группах превалировал *C. albicans* (91,0%). Другие виды грибов встречались, как правило, с ней в ассоциации (*C. krusei*, *C. kefyr*, *S. cerevisiae*), и лишь у трех больных были выделены в монокультуре *C. tropicalis* (1) и *C. krusei* (2).

#### **Выводы**

1. Присоединение к профессиональной ХОБЛ вторичной бронхиальной астмы не приводит к достоверному изменению микробиоценоза свободно отделяемой мокроты.

2. Выраженные количественные и качественные изменения микробиоценоза дыхательных путей у пациентов, страдающих профессиональной ХОБЛ, наблюдаются лишь при развитии у них ассоциированного СД 2 типа. Это обусловлено, с одной стороны, изменением иммунореактивности, характерной для сахарного диабета, с другой стороны, - хронической гипергликемией, создающей идеальные условия для активного роста микроорганизмов.

3. Обнаружение грибов рода *Candida* дополнительно свидетельствует о необходимости назначения антибактериальной терапии по строгим показаниям, исключения самолечения и бесконтрольного применения противомикробных препаратов.

#### **Литература:**

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Global strategy for diagnosis, management, and prevention of COPD. 2014. [Electronic resource]. Available from: <http://www.goldcopd.org/> (Accessed June 5, 2014)

2. Microbiological study of patients hospitalized for acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AE-COPD) and the usefulness of analytical and clinical parameters in its identification (VIRAE study). / R. Boixeda, N. A. Rabella, G.Sauca, [et al.] // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2012. Vol. 7. P. 327–335.

3. Significance of the microbiome in obstructive lung disease. / M. K. Han, Y. J.Huang, J. J.LiPuma [et al.] // *Thorax*. 2012. Vol. 67(5). P. 456–463.

4. Severity-Related Changes of Bronchial Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease / M. Garcia-Nucez, L. Millares, X. Pomares, [et al.] // *J Clin Microbiol*. 2014. Vol. 52(12). P. 4217–4223.

5. Managing comorbidities in COPD. / G. Hillas, F. Perlikos, I. Tsiligianni [et al.]. // *International Journal of COPD*. 2015. Vol. 10. P. 95–109.

6. Приказ МЗ СССР от 22 апреля 1985г. №535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».

7. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum / P.R. Murray, J.A.Washington // *Mayo Clin Proc*. 1975. Vol. 50. P. 339-344.

8. Авдеев, С.Н. Антибактериальная терапия при обострении хронической обструктивной болезни легких. // *Пульмонология*. 2010. №2. С.96-106.

## **АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАРАЗИТАРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

**Шишканова Л.В., Головченко Н.В., Криворотова Е.Ю.**

*ФБУН Ростов НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора,  
Ростов-на-Дону*

**Введение.** В современной медицинской практике с каждым годом возрастает роль лабораторной диагностики как одного из основных методов постановки диагноза и инструмента мониторинга терапии [1]. До настоящего времени «золотым стандартом» диагностики большинства инва-

зий является паразитоскопическое исследование: макроскопическое исследование фрагментов или самих паразитов, микроскопия биологических сред с использованием специальных методов исследования материала [2]. Убедительным подтверждением диагноза ларвального гельминтоза может служить обнаружение возбудителя в биоптатах (мышц плеча или голени при трихинеллезе; печени, легких при токсокарозе). Однако эти, несомненно, самые достоверные методы малопримемлемы из-за своей инвазивности и потенциальной опасности при их проведении. Практически незаменимыми при диагностике тканевых гельминтозов стали иммунологические методы. По сравнению с другими методами детекции антигенов и антител иммуноферментный анализ обладает рядом преимуществ, которые обусловили его широкое применение во всех областях медицины. При интерпретации результатов следует принимать во внимание такие естественные ограничения данного метода как генетическая неоднородность населения, наличие лиц с низким уровнем антителообразования на антигены паразита или же перекрестные реакции с антигенами человека и возбудителя [2].

**Целью исследования** явилось определение диагностической ценности существующих методов лабораторной диагностики наиболее эпидемиологически значимых на юге России гельминтозов и протозоозов.

#### **Материал и методы.**

За период 2013-2015 гг. в клинике инфекционных и паразитарных болезней ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора был проведен анализ 1500 медицинских карт стационарных больных, из которых более 70% - жители г. Ростова-на-Дону и Ростовской области, поэтому, структура паразитарных инвазий в клинике в большей степени отражает заболеваемость паразитозами в Ростовской области. Для верификации диагноза паразитарной инвазии были использованы стандартные методы лабораторной диагностики, рекомендованные существующими нормативно-методическими документами: метод нативного и окрашенного мазка, метод эфир-формалиновой седиментации, метод обогащения по Берману в модификации Супряги, метод исследования материала из перианальных складок с применением набора Рабиновича. Для иммунологического обследования пациентов клиники использовали диагностические тест-системы «Токсокара-IgG-ИФА-БЕСТ», «Аскарида-IgG-ИФА-БЕСТ», «Эхинококк-IgG-ИФА-БЕСТ», «Лямблия-АТ-ИФА-БЕСТ», «Описторхоз-IgG-ИФА-БЕСТ» «Описторхоз-IgM-ИФА-БЕСТ» производства ЗАО «Вектор-Бест». Исследования сывороток крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) в соответствии с инструкциями к тест-системам и руководствуясь МУК 3.2.1173-02 «Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных заболеваний».

**Результаты исследования.** В структуре нозологических единиц паразитарные болезни составили 58,5%, тогда как на больных с патологией желудочно-кишечного тракта, различными аллергическими заболеваниями, новообразованиями, лейкомоидными реакциями эозинофильного типа, направленных для исключения паразитарных инвазий, пришлось 41,5%.

В связи с тем, что преобладающее число пациентов клиники являлись жителями г. Ростова-на-Дону и Ростовской области структура паразитарных заболеваний отражает заболеваемость паразитозами в Ростовской области и представлена в основном 13 нозоформами. Наиболее часто регистрируются энтеробиоз (35,5%), эхинококкоз (18,7%), токсокароз (15,5%), тениаринхоз (5,8%), дирофиляриоз (5,2%) (Рис. 1). У 20(4,3%) больных отмечалась сочетанная инвазия: энтеробиоза аскаридоз, энтеробиоз и дифиллоботриоз, энтеробиоз и лямблиоз, энтеробиоз и токсокароз, эхинококкоз и дикроцелиоз. Редкие, большей частью завозные из тропических стран, инвазии составили 0,5%. В клинике ежегодно регистрируются случаи аутохтонного стронгилоидоза (1,3%) у жителей Ростовской области, что свидетельствует о наличии условий для реализации риска заражения этим гельминтозом. Для обследования больных стронгилоидозом использовали методы обогащения по Берману в его модификации. У 8 больных с высокой интенсивностью инвазии данным методом выявлялись и особи остриц и их яйца. В г. Ростове-на-Дону функционируют 6 учреждений высшего профессионального образования, где обучаются иностранные студенты из стран Африки, Юго-Восточной Азии, Ближнего Востока и Центральной Америки, у которых

регистрируются случаи завозных тропических инвазий: антропонозный кожный лейшманиоз, мочеполовой шистосомоз и др. В 2013 году был диагностирован случай редкого гельминтоза - лозаоза у студентки из Экваториальной Гвинеи.

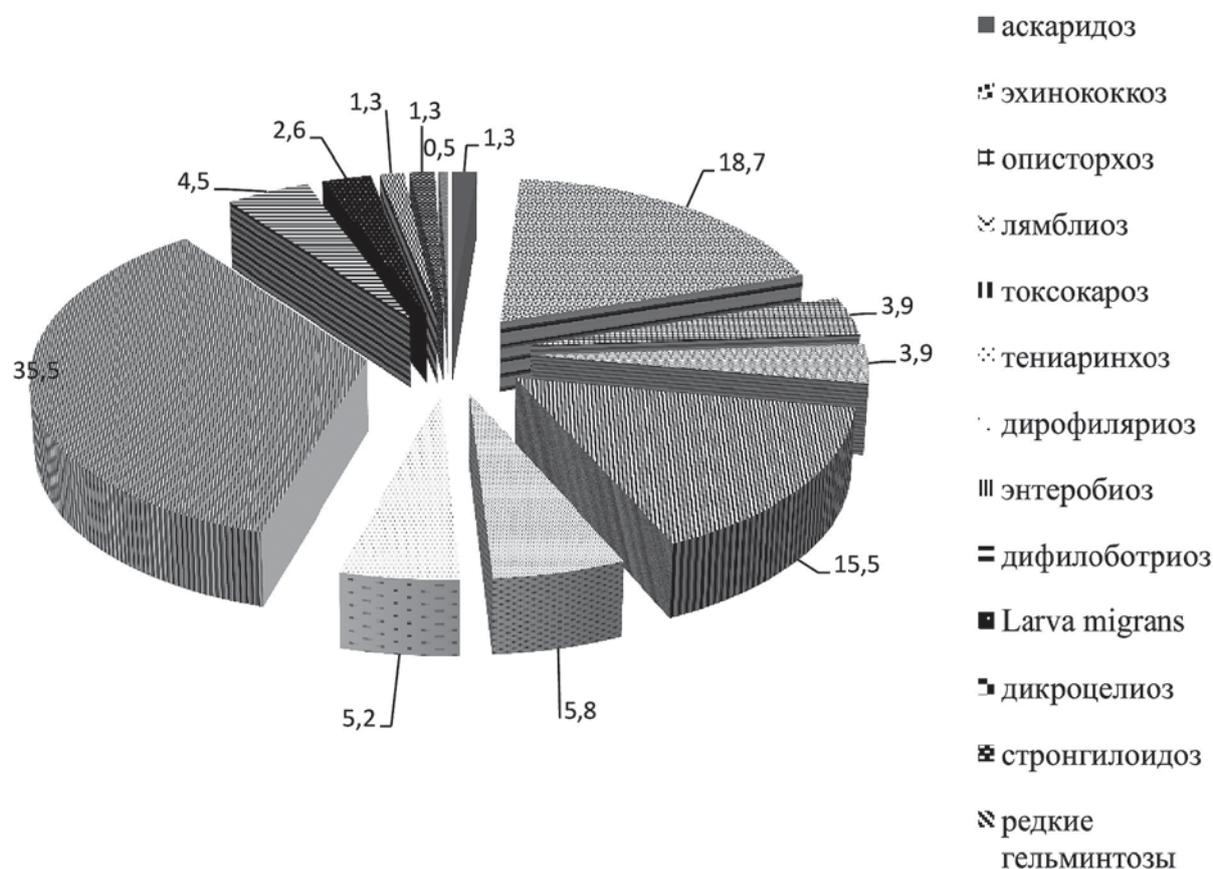


Рис. 1. Структура паразитарных инвазий больных клиники инфекционных и паразитарных болезней ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора

В структуре заболеваемости паразитарными болезнями по данным клиники доминирующим является энтеробиоз – контактный гельминтоз, поражающий в первую очередь детское население Ростовской области. Несмотря на то, что динамика заболеваемости данным гельминтозом в Российской Федерации в последние годы имеет устойчивую тенденцию к снижению (в 2014 г. - 148,72 на 100 тыс. населения в 2013 г - 150,2 на 100 тыс. населения) [1,3], нельзя исключить, что это обусловлено снижением числа обследованного населения на энтеробиоз и использованием малоэффективных методов лабораторной диагностики.

При обследовании больных методом исследования материала из перианальных складок яйца остриц в первом анализе выявлялись у 55,9% больных, при двукратном обследовании – у 81,7%, при трехкратном – у 91,7% больных (Табл. 1). Анализ эффективности других методов лабораторной диагностики энтеробиоза показал, что чувствительность метода эфир-формалиновой седиментации при трехкратном исследовании фекалий составила 26,9%. Однако применение данного метода позволило обнаруживать цисты лямблий, яйца аскарид и дифиллоботриид в кале больных с микст-инвазией.

Прирост относительного числа больных с выявленными яйцами остриц в зависимости от кратности исследования материала из перианальных складок.

Прирост относительного числа больных с яйцами остриц		
Кратность исследования кала		
1	2	3
+25,8% (p<0,001)		
	+16,1% (p<0,001)	

Актуальной проблемой педиатрии на юге России является геогельминтозы и в первую очередь токсокароз за счет интенсивной контаминации объектов окружающей среды жизнеспособными яйцами *Toxocara canis* [4,5]. Диагностика токсокароза затруднена отсутствием патогномичных симптомов инвазии и способов достоверной специфической диагностики, особенно в регионах, где имеет место значительная доля серопозитивных лиц за счет контакта с обсемененными объектами окружающей среды [6].

Доля больных токсокарозом в клинике паразитарных болезней нашего института составила 15,5%, среди которых более 80,0% - дети раннего возраста (до 5 лет).

При интерпретации результатов ИФА с токсокарозным антигеном учитываются клинические и другие лабораторные проявления инвазии токсокарами.

По нашим наблюдениям, из 72 пациентов клиники паразитарных болезней больных токсокарозом только у 1 (1,4%) ребенка был зарегистрирован отрицательный результат ИФА при уровне эозинофилии 45%. Титр антител 1/400 отмечался у 8 человек (11,1%), однако, как видно на Рис. 2, эозинофилия периферической крови колебалась от 8% до 50%. У 12 (16,7%) больных с эозинофилией 11% - 40% регистрировался титр антител 1/800. Титр 1/1600 был отмечен у 25 пациентов (34,7%), уровень эозинофилии в этой группе больных колебался от 8% до 40%. У 22 лиц (30,6%) регистрировался титр токсокарозных антител 1/3200 при уровнях эозинофилии от 7% до 65%. У 5 (6,9%) больных с титром антител 1/6400 эозинофилия периферической крови составляла 12%, 23%, 36%, 50% и 69%. Достоверной зависимости титра антител от выраженности клинических проявлений инвазии и уровня эозинофилии не наблюдалось.

Отсутствие корреляции этих показателей вполне объяснимо с клинической точки зрения, так как понятно, что уровень антител класса G (как и при трихинеллезе) больше зависит от срока инвазии, и в ранний период при выраженных клинических проявлениях, сопровождающихся высокими показателями эозинофилии, титры антител могут быть ниже так называемых «диагностических». Таким образом предлагаемый производителями тест систем вариант интерпретации анализа ИФА с токсокарозным антигеном на основе «диагностических титров» с клинической точки зрения не целесообразен. Однако следует отметить, что положительный результат ИФА с токсокарозным антигеном, как и эозинофилия периферической крови являются наиболее постоянными лабораторными признаками инвазии токсокарами.

Наблюдение больных в динамике с целью определения и длительности сохранения антител при токсокарозе показало, что через месяц после проведенной этиотропной терапии у 65 % больных регистрировалось увеличение титров антител в 2 и более раз, и их уровень оставался неизменным при отсутствии повторных инвазий в течение как минимум 2 лет.

Актуальными биогельминтозами для Северного Кавказа являются тениаринхоз и эхинококкоз [7]. За период с 2003 по 2013 в клинике паразитарных болезней получали лечебно-диагностическую помощь 55 больных эхинококкозом, в том числе 9 детей в возрасте от 3 до 15 лет (16,4%). Неоспоримой является ведущая роль инструментальных методов диагностики гидатидозов, однако, существенное значение для прогноза развития рецидивов и эффективности проведенного хирургического и консервативного лечения имеет иммуноферментный анализ с целью определения IgG к эхинококковому антигену [8]. Из числа больных, обратившихся в клинику паразитарных болезней до хирургического лечения, отрицательные результаты ИФА с

эхинококковым антигеном регистрировались у 9 пациентов (42,9%), при этом через месяц после оперативного вмешательства отрицательный результат указанного исследования наблюдался только у 4 пациентов (19,1%), таким образом у 5 больных имел место высокий риск развития рецидива за счет диссеминации протосколексов во время хирургического вмешательства (Рис. 3). В соответствии с рекомендациями ВОЗ все больные эхинококкозом подлежат диспансерному наблюдению вплоть до получения 2 отрицательных результатов ИФА с эхинококковым антигеном с интервалом в 6 месяцев.

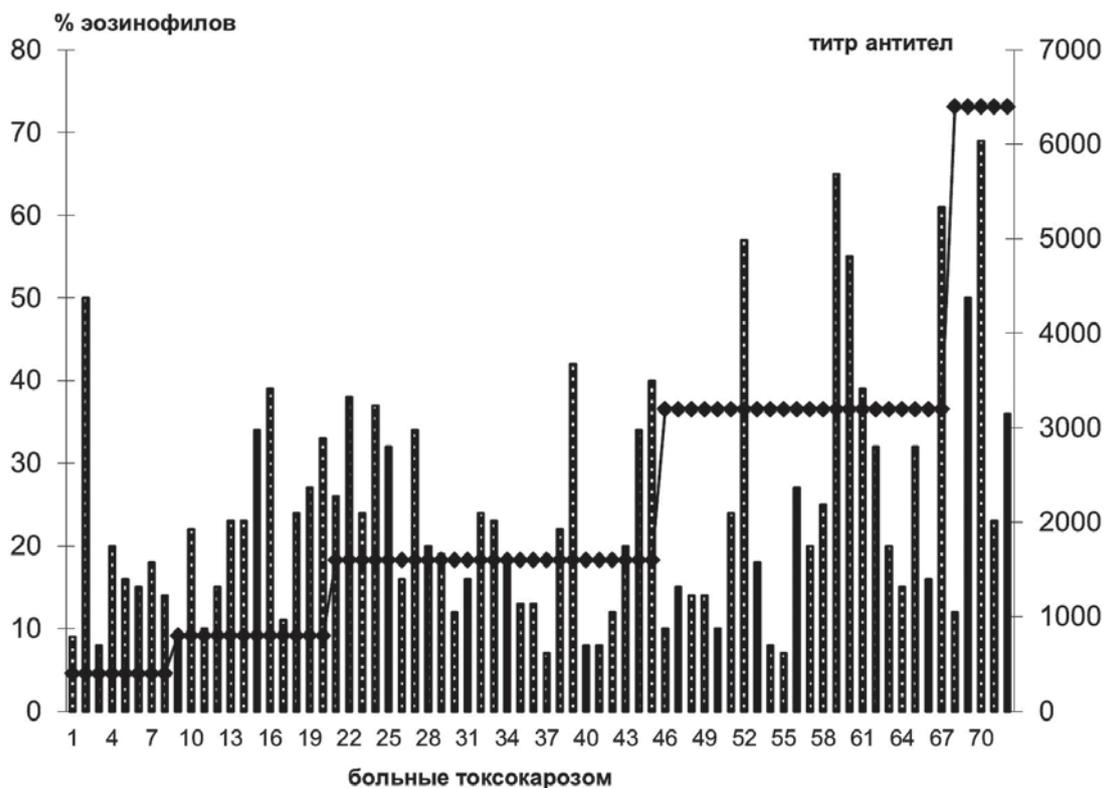


Рис. 2. Соотношение уровня эозинофилии и уровня антител в ИФА с токсокарозным антигеном

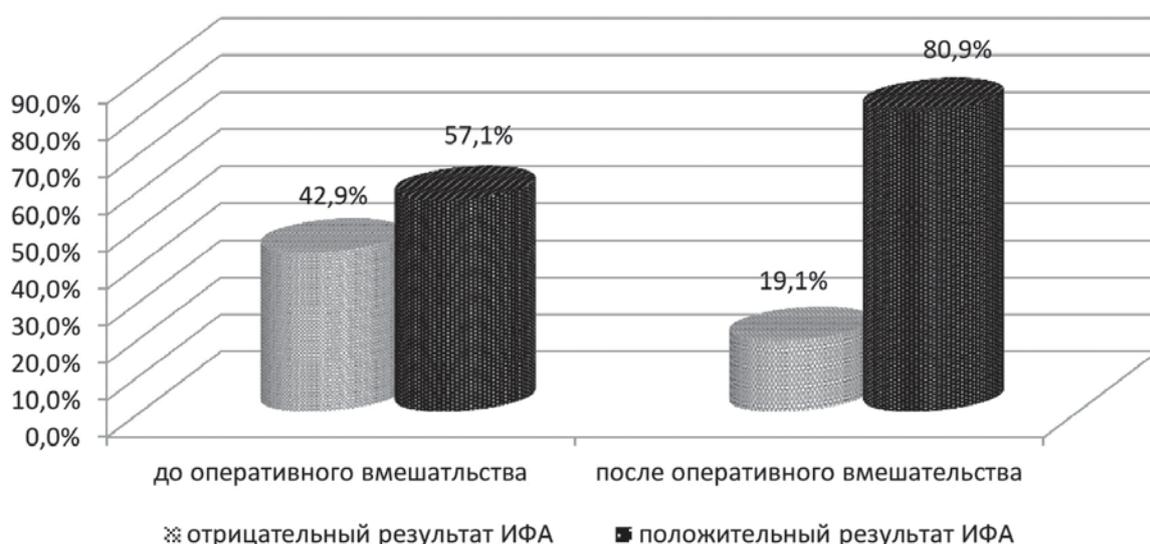


Рис. 3. Динамика результатов ИФА с эхинококковым антигеном до и после оперативного вмешательства

Заболееваемость тениаринхозом на некоторых территориях Северного Кавказа превышает среднефедеральный уровень более чем в 10 раз [9]. При данной инвазии самочувствие больных может оставаться удовлетворительным, так анализ медицинской документации 27 больных тениаринхозом, получавших лечение в клинике паразитарных болезней показал, что более чем у 85% больных единственной жалобой при поступлении было отхождение члеников или крупных фрагментов гельминта. Только у 7,9% пациентов отмечались умеренные диспептические явления (тошнота, схваткообразные боли в животе, послабление стула и др.). В течение 1-го года заболевания за медицинской помощью обратились 47% больных, 59,6% страдали тениаринхозом в течение 2-4 лет, 7 пациентов не обращались к врачу в течение 8-10 лет и в одном случае - 15 лет. Диагноз верифицировался паразитоскопией члеников гельминта до и после антигельминтной терапии. Инвазия была выявлена при профилактическом осмотре у 3 больных (11,1%). У 62,5% больных яйца тениид были обнаружены при использовании метода перианального соскоба. В гемограмме анемия регистрировалась у 19,2% больных, лейкоцитоз – 10,6%, ускоренное СОЭ – 21,3%, эозинофилия – 29,8%, лимфоцитоз – у 8,5%. При этом у больных со сроком инвазии более 4 лет показатели периферической крови были в пределах нормы.

Несмотря на то, что диروفилариоз относят к группе редких гельминтозов человека, в последние годы на ряде территорий Российской Федерации эта инвазия занимает не последнее место в структуре паразитарной патологии человека, в тоже время наблюдается расширение ареала распространения диروفиларий [10]. Паразитологическая диагностика диروفилариоза человека основывается на морфологическом или гистологическом исследованиях гельминта, удаленного хирургическим путем. При невозможности выполнения хирургического вмешательства [11] альтернативной, как и при большинстве тканевых гельминтозов, может быть иммуноферментный анализ, но коммерческая тест-система в Российской Федерации отсутствует.

Для решения вопроса диагностики диروفилариоза разработан и запатентован способ получения очищенного соматического антигена из неполовозрелых самок *Dirofilaria repens*, удаленных у людей, для выполнения ИФА с целью выявления IgG к *D. repens*.

Для оценки эффективности работы полученного антигена для диагностики диروفилариоза обследованы методом ИФА для выявления IgG к *D. repens* сыворотки крови 129 пациентов. У 57 - диагноз диروفилариоз был установлен после оперативного вмешательства и морфологической идентификации гельминта. Остальные 72 из 129 – условно-здоровые лица и больные паразитарными болезнями. Полученный цифровой материал распределен в ячейки четырехпольной таблицы (Табл. 2). Истинно положительные результаты ИФА регистрировались у 43 больных, ложно отрицательные - у 14, истинно отрицательные - у 64 и ложноположительные - у 8.

Таблица 2.

Соотношения между результатами ИФА и наличием заболевания

		<i>Больные с удаленным паразитом</i>	
		<b>ДА</b>	<b>НЕТ</b>
<i>Наличие антител к D. repens</i>	<b>ДА</b>	<b>a</b> 43 (33, 3%)	<b>b</b> 8 (6, 2%)
	<b>НЕТ</b>	<b>c</b> 14 (10, 9%)	<b>d</b> 64 (49, 6%)

Примечание: результаты: а – истинно положительные; b – ложноположительные; с – ложноотрицательные; d – истинно отрицательные.

Рассчитаны основные показатели диагностической значимости ИФА для диагностики дирофиляриоза человека: распространенность, прогностическая ценность, чувствительность, специфичность и точность.

Чувствительность иммунологического теста с очищенным соматическим антигеном из неполовозрелых самок *D. immitis* оказалась равной  $75,4 \pm 3,8$  %, а специфичность -  $88,9 \pm 2,8$  %. Точность результатов ИФА для диагностики дирофиляриоза человека равнялась  $82,9 \pm 3,8$  %. Распространенность антител IgG к *D. immitis* в популяции составила  $44,2 \pm 4,4$  %. Показатель прогностической ценности положительного результата составил  $84,3 \pm 3,2$  %, а прогностической ценности отрицательного результата -  $82,1 \pm 3,4$  %. Используя результаты ИФА с очищенным соматическим антигеном из неполовозрелых самок *D. immitis* и с сыворотками крови людей, провели ROC-анализ диагностической эффективности теста (Рис. 4).

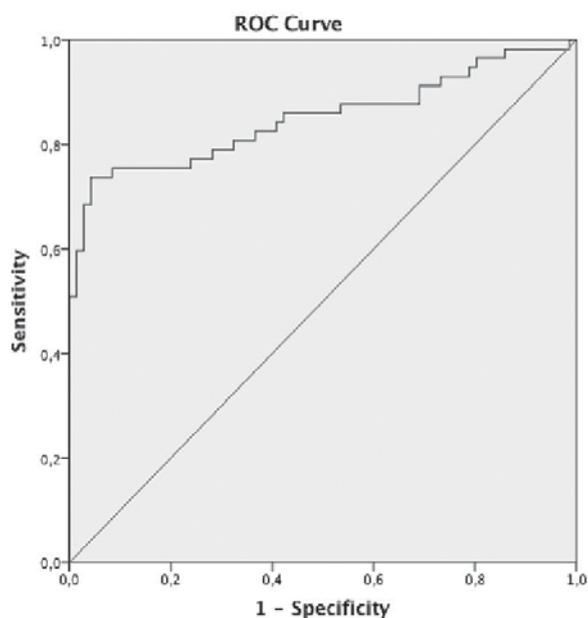


Рис 4. ROC-кривая ИФА с соматическим антигеном *D. immitis* и с сыворотками крови человека.

Показатель AUC в данном случае равен 0,850. Результат ROC-анализа и высокий показатель AUC подтверждает высокую специфичность и чувствительность диагностического теста на подкожный дирофиляриоз.

Высокие показатели диагностической значимости ИФА с очищенным соматическим антигеном *D. immitis* свидетельствуют об его эффективности для диагностики дирофиляриоза у человека.

**Заключение.** Одним из важных факторов оптимизации диагностики кишечных паразитозов является выбор метода и кратности обследования [12].

Наиболее важным диагностическое значение при тениаринхозе имеют: опрос больного на предмет отхождения члеников гельминта, перианальный соскоб, исследования кала методами осаждения.

#### Литература:

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году: Государственный доклад. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2015. – 206 с.

2. Ермакова Л.А. Диагностическая значимость иммуноферментного анализа при ларвальных гельминтозах (трихинеллез, эхинококкоз, токсокароз). / Ермакова Л.А., Твердохлебова Т.И., Пшеничная Н.Ю. // Профилактическая и клиническая медицина. 2012. № 3. С. 59-63.

3. Упырев А.В. Санитарно-паразитологический мониторинг в очагах энтеробиоза/ Упырев А.В., Хроменкова Е.П., Димидова Л.Л., Ермакова Л.А., Хуторянина И.В., Ковтунов А.И., Славина А.М., Шендо Г.Л., Кобзева Л.Л.//Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2014. № 15. С. 329-331.
4. Хроменкова Е.П. Структура эпидемиологической значимости объектов оружающей среды в санитарной паразитологии/ Хроменкова Е.П., Димидова Л.Л., Твердохлебова Т.И., Упырев А.В., Хуторянина И.В.// Здоровье населения и среда обитания. 2015. № 7 (268). С. 46-49.
5. Думбадзе О.С. Изучение степени контаминации яйцами *Toxosara canis* объектов окружающей среды на юге России/ Думбадзе О.С., Твердохлебова Т.И., Шишканова Л.В., Хроменкова Е.П.//В сборнике: Итоги и перспективы изучения проблем инфекционных и паразитарных болезней.- Тюмень, 2015. С. 120-126.
6. Хроменкова Е.П. Актуальность проведения санитарно-паразитологического мониторинга на юге России / Хроменкова Е.П., Димидова Л.Л., Твердохлебова Т.И.// Инфекция и иммунитет, 2012. Т. 2. № 1-2. С. 387.
7. Пшеничная Н.Ю. Актуальные биогельминтозы юга России/ Пшеничная Н.Ю., Головченко Н.В., Хроменкова Е.П., Яговкин Э.А., Соловьев М.Ю.// В сборнике: Проблемы современной медицины: актуальные вопросы Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. Красноярск, 2015. С. 49-52.
8. Ермакова Л.А. Актуальные вопросы рецидивного эхинококкоза в Ростовской области. // Цитокины и воспаление. 2014. Т. 13. № 3. С. 91.
9. Информационный сборник статистических и аналитических материалов «Заболеваемость протозоозами и гельминтозами населения Российской Федерации в 2013-2014 гг.». – М., 2015.
10. Росоловский А.П. Дирофиляриоз в Новгородской области/ Росоловский А.П., Пьяных В.А., Игнатьева В.И. и др //Мед. паразитол. , 2013, № 1, С.- 34-35.
11. Корхов А.П. Случай редкой внутриглазной локализации *Dirofilaria spp.* у человека./ Корхов А.П., Темиров Н.Э., Нагорный С.А. и др. //Мед. паразитол., 2009. № 1. С. 59.
12. Ермакова Л.А. Оценка эффективности многократного копрологического исследования для диагностики лямблиоза/ Ермакова Л.А., Пшеничная Н.Ю., Амбалов Ю.М., Черникова Е.А.// Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2007. № 4. С. 32-34.

## **ВАЛИДАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ ВАКЦИН**

**Холматов К.И., Антонычева М.В., Белоусов А.Д., Вахрушина Н.И., Астафьева С.В.,  
Лобовикова О.А., Шульгина И.В.**

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт  
Микроб» Роспотребнадзора, Саратов*

Валидация - документально оформленные действия, которые в соответствии с принципами надлежащей производственной практики доказывают, что определенная процедура, процесс, оборудование, исходные материалы, деятельность или система приводят к ожидаемым результатам с заранее установленными критериями приемлемости [1,2]. Этот процесс аттестации является трудоемким, затратным по времени и средствам. Валидацию технологических процессов необходимо проводить с использованием образцов не менее трех серий продукта с целью доказательства, что процесс (в пределах установленных параметров) стабилен при производстве продукта требуемого качества [1]. При производстве вакцинных препаратов приготовление питательных сред является началом технологической цепочки в производстве вакцинных препаратов, и имеет критические трудно контролируемые процессы (фильтрация, стерилизация) [1,3].

Технологическим этапом приготовления питательных сред, используемых в производстве вакцин для профилактики особо опасных инфекций (холера, туляремия), является процедура очистки и осветления от различных видов загрязнения (нерастворенные частицы пептона, негидролизованное

комплекс-протеиды белка, меланин подобный пигмент и др.). Для их удаления применяют изделия производства «Технофильтр» - патронный глубинный фильтр ЭПВг.П-050-Д-250 с размером пор 0,5 мкм, и патронный мембранный фильтр ЭПМ.К-080/045-Д-250М с двуслойной мембраной и микронным рейтингом соответственно 0,8 и 0,45 мкм [4,5,6,7]. Необходимо подчеркнуть, что фильтрующие элементы «Технофильтр» изготавливаются в чистых помещениях 7 и 8 классов чистоты ИСО согласно ГОСТ Р ИСО 14644-5-2005 в соответствии с требованиями GMP[1,8]. Фильтроэлементы проходят контроль по специфическим показателям, указанным в программе квалификационных испытаний и имеют все необходимые сопроводительные документы.

В аттестацию производственного процесса входит квалификация проекта, монтажа, функционирования и эксплуатации [1]. При проведении валидации необходимо проводить процедуру квалификации материалов в данном случае фильтровального оборудования [1, 8]. В данной статье рассматривается валидация технологического процесса фильтрации и стерилизации при условии, что предыдущие этапы квалификации проекта, оборудования и его монтажа выполнены.

Эффективность фильтрации зависит от загрязнения среды, ее температуры, pH, химической и механической устойчивости фильтра, адсорбции фильтровального материала и сопровождающих процесс потерь. Для определения эффективности фильтрации предполагается использование физико-химических и биологических показателей качества среды, связанных с трудоемкими и затратными по времени анализами, результаты которых получают после использования среды для глубинного культивирования микроорганизмов. В связи с вышеизложенным технологическая операция по фильтрованию питательных сред, относится к трудно контролируемым процессам и подлежит валидации [1,2].

Для проведения валидации фильтрации питательных сред, используемых в производстве вакцин, необходимы показатели давления (манометр), температуры (термометр), оптической плотности (фотоколориметр), объема среды, физико-химические показатели качества среды (определение хлоридов по Фольгардту, количественное определение пептона с помощью биуретовой реакции, определение общего азота с реактивом Неслера, определение сахаров с тимоловым реактивом). К фильтрам предъявлялись следующие требования: способность удерживать балластные частицы, отсутствие адсорбции компонентов питательных сред, отсутствие абсорбции материала в среду, высокая химическая совместимость, высокая производительность, целостность, устойчивость к температурному воздействию. Проверка удерживающей способности и адсорбционных свойств проводилась с учетом реальных условий производства питательных сред и условий фильтрации (температура  $(65\pm 5)$  °С, рабочее давление 0,1 МПа). Стабильность результатов трех серий испытуемых продуктов свидетельствует об адекватном режиме фильтрации и отсутствии негативного влияния фильтроматериалов на питательные среды, используемые в производстве вакцин (таб. 1,2).

Таблица 1.

Влияние процесса фильтрации на показатели питательной среды (ПС) на основе панкреатического гидролизата казеина с пептоном (1%) для глубинного культивирования вакцинного штамма холерного вибриона.

№	Показатель	ПС до фильтрации	ПС после фильтрации
1	pH среды	8,0±0,1	7,94±0,1
2	Прозрачность среды (по оптической плотности, КФК-2, $\lambda=540$ ; 10 мм)	0,3±0,001	0,045±0,001
3	Содержание пептона, %	1	0,95±0,01
4	Потери общего N, %	-	0,01
5	Потери $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , %	-	0
6	Потери NaCl, %	-	0,5±0,01
7	Потери объема среды, %	-	0,06

Таблица 2.

Влияние процесса фильтрации на показатели питательной среды на основе панкреатического гидролизата фибрина (ПС) для глубинного культивирования вакцинного штамма туляремийного микроба.

№	Показатель	ПС до фильтрации	ПС после фильтрации
1	рН среды	7,2±0,1	7,2±0,1
2	Прозрачность среды (по оптической плотности, длина волны, КФК-2 $\lambda=540$ ; 10 мм)	0,38±0,001	0,25±0,001
3	Потери общего N, %	-	0,01±0,005
4	Потери глюкозы, %	-	0,05±0,01
5	Потери NaCl, %	-	0,5±0,01
6	Потери объема среды, %	-	0,12

Следующим технологическим процессом, подлежащим валидации, является стерилизация питательных сред, для которой, как правило, используют способ стерилизации влажным теплом в паровых стерилизаторах [9,10].

Эффективность паровой стерилизации питательных сред зависит от многих факторов: температуры, давления, продолжительности воздействия насыщенного пара при температуре стерилизации, полноты удаления воздуха из камеры, конфигурации и объема емкостей, полноты заполнения камеры, уровня первоначальной контаминации сырья и посуды, и др. [10,11]. Стерилизация является примером специального процесса, поскольку ее эффективность не может быть проверена во всей партии продукции [12]. Таким образом, режим стерилизации питательных сред используемых в производстве вакцин должен быть валидирован [12]. При проведении валидации паровой стерилизации каждой среды необходимо использование одинаковых по объему и материалу емкостей.

Для подтверждения результатов трудно контролируемых процессов при стерилизации питательных сред, используемых в производстве вакцин, использовали физические (показания манометров, термометров), химические (наружные и внутренние термовременные индикаторы) и биологические методы контроля (автономные биологические индикаторы) при режиме стерилизации 120 оС в течение 30 мин [11]. Одновременно использовали термодатчик, погруженный в емкость с питательной средой, и индикаторы: наружные «Фарматест 120/30», внутренние «Фарматест 120/10» и биологические «Биостер пар 112/10». Работа осуществлялась на аттестованном автоматическом стерилизационном оборудовании паровом стерилизаторе STERIVAP HP 669-1ED (Чехия). Качество среды проверяли на соответствие химическим и биологическим показателям [13]. Стерильность среды и отсутствие изменений показателей качества сред по результатам стерилизации трех серий свидетельствует об адекватном и стабильном стерилизационном режиме (табл.3,4).

Таблица 3.

Влияние процесса стерилизации на показатели питательной среды на основе панкреатического гидролизата казеина с пептоном до 1% (ПС) для глубинного культивирования вакцинного штамма холерного вибриона.

№	Показатель	ПС до стерилизации	ПС после стерилизации
1	рН среды	8,2±0,1	8,0±0,1
2	Стерильность	не стерильно	стерильно
3	Эффективность среды, млрд м.к./мл	-	72±2

Таблица 4.

Влияние процесса стерилизации на показатели питательной среды на основе панкреатического гидролизата фибрина (ПС) для глубинного культивирования вакцинного штамма туляремийного вибриона.

№	Показатель	ПС до фильтрации	ПС после фильтрации
1	рН среды	7,2±0,1	7,2±0,1
2	Стерильность	не стерильно	стерильно
3	Эффективность среды, млрд м.к./мл	-	35±0,5

От стабильности процессов фильтрации и стерилизации питательных сред, используемых в производстве вакцин, напрямую зависит качество сред. Адекватность технологических процессов фильтрации и стерилизации в приготовлении питательных сред, для глубинного культивирования микроорганизмов при производстве вакцинных препаратов, подтверждено результатами биологических показателей при глубинном культивировании в жидкой среде из панкреатического гидролизата казеина с пептоном (1%) вакцинного штамма *Vibrio cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41, и при глубинном культивировании в жидкой среде из панкреатического гидролизата фибрина вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ [14].

#### Литература:

1. «Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств», утв. приказом Министерства промышленности и торговли РФ от 14 июня 2013 г. N 916.
2. ГОСТ Р ISO 9000-2011 Межгосударственный стандарт системы менеджмента качества.
3. Дятлов И.А., Кутырев В.В., Храмов М.В. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы. Москва, 2012.-415 с.
4. Холматов К.И., Антонычева М.В., Белоусов А.Д., Вахрушина Н.И., Астафьева С.В. Оптимизация фильтрации питательной среды на основе панкреатического гидролизата казеина в процессе производства вакцины холерной бивалентной // Биотехнология: реальность и перспективы: Мат. Международ. науч.-практ. конф. Саратов: ИЦ«Наука» 2014.-с. 223-225.
5. Антонычева М.В., Волох О.А., Холматов К.И., Авдеева Н.И., Вахрушина Н.И., Астафьева С.В., Никифоров А.К. Технологические особенности фильтрации питательной среды на основе гидролизата фибрина для глубинного культивирования туляремийного микроба // Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии: мат-лы Всерос. науч.-практ. конф. (Иркутск, 25-27 июня, 2015г.).- Иркутск: Изд-во ИРНИТУ, 2015.- с. 187-189.
6. Холматов К.И., Антонычева М.В., Белоусов А.Д., Вахрушина Н.И., Астафьева С.В. Особенности фильтрации питательной среды для глубинного культивирования холерного вибриона // Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии: мат-лы Всерос. науч.-практ. конф. (Иркутск, 25-27 июня, 2015г.).- Иркутск: Изд-во ИРНИТУ, 2015.- с. 277-279.
7. Холматов К.И., Антонычева М.В., Белоусов А.Д., Вахрушина Н.И., Астафьева С.В. Технологические решения фильтрации сред для глубинного культивирования микроорганизмов // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: материалы VII Всерос. науч.-практ. конф. Молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора.- СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2015.- с. 207-208.
8. Тарасов А.В., Тарасова С.А., Андреев С.В., Рогожкин Е.В., Кондрашков Д.О., Яворская Е.С. Валидация процесса стерилизующей фильтрации в производстве готовых лекарственных средств // Фармацевтические технологии и упаковка №6, 2013. – с. 124-125.
9. <http://medinfo.dp.ua/stat/s207/htm>. Global industry Analisis. Inc. USA, 2009. / Дата обращения 25.09.2013.
10. Васильев Н.С., Лямкина О.Д. Проблемы паровой стерилизации водных растворов // Дезинфекционное дело.-2005, № 1.- с. 57-62.

11. ГОСТ Р ИСО 11134-2000. Стерилизация медицинской продукции. Требования к валидации и текущему контролю. Промышленная стерилизация влажным теплом. - М.: Госстандарт России, 2000.

12. Белоусов А.Д., Антонычева М.В., Вахрушина Н.И., Шульгина И.В., Галетова С.С., Лобовикова О.А., Холматов К.И. Контроль режимов стерилизации растворов питательных сред // Дезинфекция. Антисептика, 2015. - т. VI, № 1(21). - с. 44-48.

13. Методические указания «Методы контроля бактериологических питательных сред» МУК 4.2.2316-08.

14. Никифоров А.К., Антонычева М.В., Волох О.А., Еремин С.А., Киреев М.Н., Жулидов И.М., Алешина Ю.А., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Холматов К.И. Разработка питательных сред на основе непищевого сырья для глубинного культивирования штаммов холерного вибриона // Проблемы особо опасных инфекций, Выпуск 1, январь 2015. - с. 85-88.

## **ОСОБЕННОСТИ ПРЕДРЕГИСТРАЦИОННЫХ ИСПЫТАНИЙ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO* ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

**Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Никифоров А.К., Феськова А.С.**

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»  
Роспотребнадзора, Саратов*

Целью лабораторной диагностики особо опасных инфекции (ООИ) является как выявление возбудителя для подтверждения клинического диагноза, так и осуществление эпидемиологического мониторинга за возбудителями инфекционных болезней.

В соответствии с приказом Роспотребнадзора № 88 от 17.03.08 г. «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» лабораторная диагностика особо опасных инфекции (ООИ) осуществляется на территориальном, региональном и федеральном уровнях. Для эффективного и своевременного проведения лабораторной диагностики центры всех организационных уровней должны быть укомплектованы зарегистрированными медицинскими изделиями для *in vitro* диагностики (МИ ИВД) в соответствии с возложенными на них функциями.

В настоящей работе рассмотрены особенности организации работ по проведению предрегистрационных испытаний МИ ИВД ООИ в целях государственной регистрации.

За последние несколько лет законодательная и нормативная база по государственной регистрации медицинских изделий [1, 2] претерпела значительные изменения, что создает определенные проблемы для субъектов обращения медицинских изделий.

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», как субъект обращения медицинских изделий, выполняет несколько функций: разработка, производство и реализация МИ ИВД ООИ; проведение технических испытаний МИ ИВД ООИ в рамках Аккредитованного испытательного лабораторного центра (ИЛЦ); проведение клинических испытаний МИ ИВД ООИ как организация, включенная в перечень Росздравнадзора [3] и проведения испытаний готовой продукции с целью подтверждения соответствия в форме декларирования [4].

Многофункциональная деятельность института «Микроб» позволяет рассмотреть проблемы обращения МИ ИВД особо опасных инфекций как со стороны заявителя, так и со стороны эксперта.

Государственная регистрация медицинских изделий для диагностики *in vitro* проводится на основании результатов лабораторно-экспериментального изучения, технических испытаний, клинических исследований, с учетом классификации в зависимости от потенциального риска их применения, а также экспертизы качества, эффективности и безопасности.

Целью лабораторно-экспериментального изучения медицинских изделий для *in vitro* диагностики особо опасных инфекций является определение их качества с помощью адекватных методов контроля. Этот этап может быть осуществлен исключительно на базе профильного учреждения, имеющего необходимые условия и разрешительные документы для работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (лицензия, квалифицированный персонал, помещения и оборудование).

Лабораторные серии МИ для диагностики *in vitro* производят в соответствии с лабораторным регламентом или инструкцией по изготовлению и контролю. Изучение МИ проводит разработчик в соответствии с программой. Результаты лабораторно-экспериментального изучения МИ для диагностики *in vitro* оформляют в виде протокола, включающего обоснование целесообразности разработки МИ для диагностики *in vitro*; дизайн исследования; результаты исследования аналитической чувствительности и специфичности; диагностической чувствительности и специфичности в сравнении с аналогами; исследование стабильности при хранении и транспортировании [5]; анализ полученных данных.

При положительных результатах лабораторно-экспериментального изучения МИ для диагностики *in vitro* разработчик составляет проекты технической и эксплуатационной документации.

К технической документации на медицинское изделие относятся: технические условия; опытно-промышленный регламент; протокол предварительных испытаний; сертификаты системы менеджмента качества разработки, производства (при наличии); результаты лабораторно-экспериментального изучения при разработке медицинского изделия.

Технические условия [6] должны содержать сведения, регламентирующие конструкцию МИ для диагностики *in vitro*; технические требования к МИ и методы их проверки; данные для эксплуатации МИ; данные для технического обслуживания и ремонта МИ; данные для утилизации или уничтожения МИ.

Эксплуатационная документация (инструкция по применению) - документ, предназначенный для ознакомления потребителя с конструкцией медицинского изделия, регламентирующий условия и правила эксплуатации (использование его по назначению, техническое обслуживание, текущий ремонт, хранение и транспортировка), гарантированные производителем значения основных параметров, характеристик (свойств) медицинского изделия, гарантийные обязательства, а также сведения о его утилизации или уничтожении.

В соответствии с опытно-промышленным регламентом разработчик выпускает экспериментально-производственные серии МИ ИВД и проводит предварительные испытания на соответствие требованиям проекта ТУ. По результатам работы оформляют протокол предварительных испытаний медицинского изделия.

Технические [7, 8, 9] испытания проводят на соответствие требованиям проекта ТУ с целью проверки качества и безопасности медицинского изделия для диагностики *in vitro* ООИ при использовании его в соответствии с назначением, предусмотренным документацией производителя.

Технические испытания медицинских изделий для диагностики *in vitro* ООИ основываются на анализе данных научно-технической литературы по безопасности, эффективности, функциональности, а также применению МИ; результатов проведенных предварительных и лабораторных испытаний медицинского изделия.

Технические испытания медицинских изделий для диагностики *in vitro* осуществляются испытательной организацией в срок, не превышающий 30 рабочих дней со дня предоставления заявителем в испытательную организацию документов и образцов медицинского изделия. Срок проведения технических испытаний медицинских изделий для диагностики *in vitro* по согласованию с заявителем может быть продлен руководителем испытательной организации, но не более чем на двадцать рабочих дней.

Технические испытания медицинских изделий для диагностики *in vitro* особо опасных инфекций осуществляются испытательной организацией, аккредитованной на техническую компетентность и независимость (наличие аттестата аккредитации).

Для проведения технических испытаний медицинских изделий для диагностики *in vitro* ООИ заявитель представляет в испытательную организацию: заявление о проведении техниче-

ских испытаний МИ для диагностики *in vitro*; образцы МИ для диагностики *in vitro* ООИ вместе с принадлежностями, необходимыми для применения МИ по назначению; копии протоколов предварительных испытаний медицинского изделия (при наличии); сведения о нормативной документации на медицинское изделие для диагностики *in vitro*; техническую и эксплуатационную документацию производителя на медицинское изделие для диагностики *in vitro*; фотографические изображения общего вида медицинского изделия для диагностики *in vitro* вместе с принадлежностями, необходимыми для применения медицинского изделия по назначению.

Порядок проведения технических испытаний МИ ИВД предусматривает: идентификацию медицинского изделия; определение и согласование с заявителем вида медицинского изделия и класса потенциального риска применения медицинского изделия в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утвержденной Минздравом РФ [10, 11]; анализ технической документации производителя на медицинское изделие; составление программы и методики технических испытаний; проведение технических испытаний представленных заявителем образцов МИ ИВД вместе с принадлежностями, наборами реагентов и контрольными материалами, необходимыми для подтверждения функциональных характеристик (аналитической чувствительности, специфичности, воспроизводимости, линейности и др.), указанных в технической и эксплуатационной документации производителя; оценку и анализ данных, относящихся к медицинскому изделию, для проверки его качества и безопасности; доработку проектов технической и эксплуатационной документации производителя на медицинское изделие по результатам испытаний (при необходимости); оформление и выдачу заявителю акта оценки результатов технических испытаний медицинского изделия для диагностики *in vitro* [12].

При технических испытаниях МИ ИВД для диагностики ООИ в качестве контрольных материалов, как правило, необходимо применение микроорганизмов I-II групп патогенности, что требует соблюдения мер безопасной работы по СП 1.3.3118 – 13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и наличия соответствующей лицензии у экспертной организации. Использование стандартных образцов предприятия, представляющих собой генно-инженерные конструкции, несущие специфические фрагменты нуклеотидной последовательности ДНК возбудителей особо опасных инфекций, позволяет существенно снизить уровень биологической опасности. Такой подход к методам контроля дает более широкие возможности при выборе экспертной организации.

Программу технических испытаний медицинских изделий для диагностики *in vitro* составляет заявитель совместно с испытательной организацией, проводящей технические испытания медицинских изделий для диагностики *in vitro*, утверждает руководитель испытательной организации. После завершения технических испытаний и получения акта оценки результатов технических испытаний медицинского изделия для диагностики *in vitro* заявитель формирует регистрационное досье для представления в Росздравнадзор (с целью получения разрешения на проведение клинических испытаний [13]).

Регистрационное досье должно содержать: заявление о государственной регистрации медицинского изделия; сведения о нормативной документации на медицинское изделие; техническую документацию производителя на медицинское изделие; эксплуатационную документацию производителя на медицинское изделие, в том числе инструкцию по применению или руководство по эксплуатации медицинского изделия; фотографические изображения общего вида медицинского изделия вместе с принадлежностями, необходимыми для применения медицинского изделия по назначению; документы, подтверждающие результаты технических испытаний медицинского изделия; опись документов.

Росздравнадзор направляет регистрационное досье в подведомственные организации, осуществляющие проведение экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для целей государственной регистрации, в соответствии с постановлением Правительства Российской Федерации от 27 декабря 2012 г. № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий»: ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники» Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения (ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора); ФГБУ «Центр мониторинга и клинико-эко-

номической экспертизы» Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения» (ФГБУ «ЦМИКЭЭ» Росздравнадзора) [14].

При положительных результатах I этапа экспертизы качества, эффективности и безопасности экспертная организация оформляет заключение о возможности проведения клинических испытаний, на основании которого Росздравнадзор выдает разрешение на проведение клинических испытаний.

Клинико-лабораторные испытания медицинских изделий для диагностики *in vitro* особо опасных инфекционных заболеваний проводят в лабораторных условиях на искусственно контаминированном клиническом материале с применением музейных тест-штаммов из государственных, национальных, исследовательских и иных коллекций патогенных микроорганизмов [7, 14]. Для снижения уровня биологической опасности предпочтение следует отдавать вакцинным штаммам.

Клинико-лабораторные испытания проводят на базе организаций, отвечающих требованиям Приказа МЗ РФ № 300н от 16.05.2013 [3] и включенных в перечень Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения. Для клинико-лабораторных испытаний МИ ИВД ООИ учреждения в обязательном порядке должны иметь лицензию на работу с микроорганизмами I-II групп патогенности. Испытания могут быть проведены также на базе организации-разработчика, имеющего необходимые разрешительные документы для работы с патогенными биологическими агентами I-II групп, с привлечением специалистов из учреждений, включенных в перечень Росздравнадзора [3].

Для проведения клинико-лабораторных испытаний МИ ИВД заявитель представляет в испытательную организацию: заявление о проведении клинических испытаний; разрешение на проведение клинических испытаний, выданное Росздравнадзором; образцы МИ ИВД вместе с принадлежностями (оборудование, наборы реагентов, калибраторы, реактивы, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды), необходимыми для применения медицинского изделия по назначению; сведения о нормативной документации на МИ ИВД; техническую документацию производителя на МИ ИВД; акт оценки результатов технических испытаний с протоколом; эксплуатационную документацию на МИ ИВД; документы (материалы), содержащие анализ данных применения медицинского изделия *in vitro* (при наличии).

При рассмотрении представленной документации на МИ ИВД согласовывают программу и продолжительность клинико-лабораторных испытаний, которая определяется назначением и сложностью медицинского изделия.

Порядок проведения клинико-лабораторных испытаний МИ ИВД предусматривает [7]: анализ представленной документации; проведение клинико-лабораторных испытаний образцов медицинского изделия вместе с принадлежностями, необходимыми для применения медицинского изделия по назначению; оценку и анализ полученных данных и их соответствие заявленным характеристикам; доработку эксплуатационной документации производителя на МИ ИВД по результатам испытаний (при необходимости); оформление и выдачу заявителю акта оценки результатов клинико-лабораторных испытаний.

После проведения оценки соответствия медицинского изделия в форме клинических испытаний заявитель предоставляет в Росздравнадзор для направления на II этап экспертизы качества, эффективности и безопасности следующие документы: заявление о возобновлении государственной регистрации МИ ИВД; акт оценки результатов клинических испытаний МИ ИВД с приложением утвержденной программы и протоколов клинических испытаний; подробные данные по использованию медицинских изделий в медицинской практике, данные отдаленных результатов наблюдения (при наличии); эксплуатационную документацию на медицинское изделие (инструкция по медицинскому применению).

Росздравнадзор направляет регистрационное досье в организацию, осуществлявшую I этап экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для целей государственной регистрации. При положительных результатах II этапа экспертизы качества, эффективности и безопасности экспертная организация дает заключение о возможности применения МИ ИВД на территории РФ, на основании которого Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения оформляет регистрационное удостоверение.

Таким образом, в настоящей работе предложена комплексная схема документооборота при организации работ по проведению предрегистрационных испытаний в целях государственной регистрации медицинских изделий для *in vitro* диагностики особо опасных инфекций, что позволит повысить эффективность процедуры внедрения новых средств диагностики в практическое здравоохранение.

Литература:

1. Постановление Правительства РФ от 27.11.2012 № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».
2. Федеральный закон от 23.11. 2011 г. № 323-ФЗ «Об охране здоровья граждан».
3. Приказ МЗ РФ от 16.05.2013 № 300н «Об утверждении требований к медицинским организациям, проводящим клинические испытания медицинских изделий, и порядка установления соответствия медицинских организаций этим требованиям».
4. ГОСТ 2.114-95 - Единая система конструкторской документации. Технические условия.
5. ГОСТ Р ЕН 13640-2010 – Исследования стабильности реагентов для диагностики *in vitro*.
6. Постановление Правительства РФ от 1 декабря 2009 г. № 982 «Об утверждении единого перечня продукции, подлежащей обязательной сертификации, и единого перечня продукции, подтверждения соответствия которой осуществляется в форме принятия декларации о соответствии»
7. Приказ МЗ РФ от 09.01.2014 № 2н «Об утверждении порядка проведения оценки соответствия в форме технических испытаний, токсикологических исследований, клинических испытаний медицинских изделий в целях их государственной регистрации».
8. ГОСТ Р 51088-2013 - Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
9. ГОСТ Р 51352-2013 - Медицинские исследования для диагностики *in vitro*. Методы испытаний.
10. Приказ МЗ РФ от 16.06.2012 № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий».
11. Приказ МЗ РФ от 25.09.2014 № 557н «О внесении изменения в приложение № 1 к приказу МЗ РФ от 06.06.12 г. № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий».
12. МР по порядку проведения экспертизы, качества, эффективности и безопасности медицинских изделий. Утв. ФГБУ «ЦМИКЭЭ» и ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора 14.11.2013 г.
13. Приказ МЗ РФ от 14.10.2013 № 737н «Об утверждении Административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения по предоставлению государственной услуги по государственной регистрации медицинских изделий»
14. ГОСТ Р ИСО 14155-2014 - Клинические исследования.

## **БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ. ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ЧУМЫ**

**Щипелева И.А., Марковская Е.И.**

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный  
институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону*

Создание методов и средств защиты населения от опасных и особо опасных патогенов в чрезвычайных ситуациях природного и искусственного происхождения является наиважнейшим в условиях обезумевшего противостояния разных слоёв общества и современной цивилизации.

Вероятность использования возбудителя чумы в качестве агента биотерроризма объясняет

неувядающий интерес учёных к данной инфекции. Сотрудниками противочумных институтов и противочумных станций, в течение многих лет изучавших возбудителя чумы – *Yersinia pestis* во всех его проявлениях, накоплен огромный потенциал научных знаний. Богатый материал получен в области антибактериальной терапии инфекции.

Результатом многолетней работы в этом направлении, после огромного количества проведённых экспериментов, стали разработанные схемы применения антибактериальных препаратов и их комбинаций для экстренной профилактики и лечения чумы, которые включены в методические указания федерального уровня [1].

Драматическое нарастание антибиотикорезистентности и значительное сокращение количества новых антибиотиков, требует расширения арсенала средств этиотропной терапии чумы.

Сужение номенклатуры рынка химиопрепаратов отражается на перспективах лечения особо опасных инфекций, в том числе чумы. В 2002 году число разрешённых химиотерапевтических средств составляло 64 наименования, а в 2008 году – 37. Особенно негативно этот процесс проявляется в отношении аминогликозидов: в 2002 г. – 11 разработанных препаратов, а в 2008 г. – 2, тетрациклинов – 5 и 1, сульфаниламидов – 10 и 2, соответственно [2].

Рассматривая перспективу дальнейших тенденций в совершенствовании антибактериальной терапии чумы, можно обозначить большой пул интересных направлений. Прежде всего, это изучение новых антибактериальных препаратов. Многообещающее будущее сулят учёные пенибактерину, новому липопептидному антибиотику широкого спектра действия, активному в отношении устойчивых к антибиотикам штаммов разных групп микроорганизмов. *In vitro* катионно-активная молекула пенибактерина связывается с отрицательно заряженными эндотоксинами грамотрицательных бактерий, что может быть причиной нейтрализации липополисахаридов. На модели септического шока у мышей две дозы пенибактерина по 500 мкг значительно увеличивали выживаемость животных при летальном уровне возбудителя инфекционного процесса. Пенибактерин показал низкую токсичность в эксперименте на примере линии почечных клеток человека [3].

Аминогликозид нового поколения – плазомицин, устойчивый к действию аминогликозид-модифицирующих ферментов, активен в отношении разнообразной коллекции грамотрицательных палочек. Плазомицин был высокоактивен в отношении всех видов семейства *Enterobacteriaceae*, как продуцирующих, так и не продуцирующих бета-лактамазы, расширенного спектра (ESBL), что было показано *in vitro* в сравнении с другими антибиотиками. Антибиотик продемонстрировал активность также в отношении *Pseudomonas aeruginosae* и *Staphylococcus aureus* [4].

Есть перспективы использования авибактама – нового не беталактамного ингибитора широкого круга бета-лактамаз, включающего ферменты классов А, С и некоторые класса Д, благодаря которым такие патогены, как *Pseudomonas aeruginosae* и *Enterobacteriaceae spp.*, инактивируют бета-лактамы антибиотиков. Авибактам проходит клинические испытания в комбинациях с цефалоспорином и азтреонамом. Авибактам может стать первым ингибитором бета-лактамаз, который обеспечит активность беталактамов, при устойчивости опосредованной ферментами класса С и представляющей нарастающую проблему как при госпитальных, так и внебольничных инфекциях [5]. Активность этих перспективных антибиотиков ещё предстоит изучить в экспериментах при чумной инфекции.

А новый антибиотик цетромицин предположительно может быть использован для лечения и профилактики инфекционных заболеваний, таких как туляремия, чума, сибирская язва. На основании клинических испытаний показана перспективность его применения при лечении инфекций дыхательных путей [6]. Доказана его эффективность на модели крыс после заражения высоковирулентным штаммом *Yersinia pestis*. Интересно, что выжившие крысы, получавшие препарат, перенесли последующее двукратное воздействие даже более высокой летальной дозы *Yersinia pestis* при отсутствии лечения антибиотиками [7].

Разработана интересная схема лечения экспериментальной чумы липосомальными формами антибиотика цефепима и имунофана, обеспечившая выживаемость животных до 100%. Липосомы преодолевают мембранно-клеточные барьеры и снижают дозы лечебных препаратов, делая эффективность терапевтического действия более выраженной. Рациональная

схема этиотропного лечения экспериментальной чумы липосомальной формой цефепима в течение пяти дней с предварительным однократным введением за 24 часа до начала лечения липосомальной формы имунофана, позволила снизить курсовые дозы антибиотика и повысить эффективность терапии [8].

Одним из современных средств лечения септического синдрома является «Полиоксидоний» – физиологически активный препарат, обладающий иммуностропной активностью, детоксицирующими и антиоксидантными свойствами. В развитии тяжести инфекционного процесса важная роль принадлежит воздействию возбудителя на иммунную систему макроорганизма, следствием чего является формирование иммунодефицитного состояния. При экспериментальной генерализованой форме инфекции у белых мышей, вызванной штаммом *Y. pestis 231*, выявлено повышение эффективности антибиотикотерапии при включении полиоксидония в схему лечения. Продолжительность жизни и количество выживших животных, заражённых возбудителем чумы, при профилактическом и экстренном введении полиоксидония на фоне лечения антибиотиком увеличиваются [9].

Другой путь связан с перспективой фаговой терапии в комбинации с антибиотиками. Использование фагов для лечения бактериальных инфекций имеет почти вековую историю, но интерес к фагам упал после открытия антибиотиков. Сейчас фаги рассматриваются как альтернативные лекарственные средства. Традиционная фаговая терапия использует вирулентные бактериофаги, и клинические результаты показали обнадеживающие результаты. Современные подходы к фаговой терапии были разработаны *in vitro* и на животных моделях. Комбинированная терапия «фаги + антибиотики» значительно снижали бактериальную нагрузку патогенов. Есть сведения, что биоинженерные фаги решили многие проблемы традиционной фаговой терапии, как-то: адресную доставку лекарств и обратимость лекарственной устойчивости бактерий [10].

Для отработки схем и методов лечения инфекций, вызываемых бактериями рода *Yersinia*, с помощью специфических бактериофагов, необходимы исследования по изучению механизмов взаимодействия в системе «фаг – прокариоцит». Проведено электронно-микробиологическое исследование взаимодействия бактерий *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* со специфическими бактериофагами в условиях *in vitro*. Показана динамика морфологических изменений бактерий под действием специфических фагов: изменения клеток, разрыв их оболочек, выброс содержимого вместе со зрелыми фаговыми частицами, что подтверждает перспективность этого направления [11].

Для преодоления факта антибиотикорезистентности в качестве альтернативной стратегии лечения инфекции, вызванной грамположительными микроорганизмами, разработаны реагенты фаготерапии, содержащие очищенные вирусные лизины, однако препараты данного типа не оказывают эффекта на грамотрицательные организмы, поскольку не способны к проникновению через внешнюю мембрану бактерий. Конкретно для возбудителя *Yersinia pestis* – грамотрицательного патогена создан гибридный токсин. Структура пестицина позволила создать реагент фаготерапии, который специфично поражает *Yersinia* [12].

Существует возможность увеличения антибактериальной активности при комбинации антибиотиков с антимикробными пептидами человека, под действием которых, в клеточных стенках бактерий происходит пертурбация мембран или образование пор, что усиливает проникновение антибиотиков внутрь клетки и повышает антибактериальный эффект. Феномен изучен с помощью электронной микроскопии на 10 токсигенных и 10 нетоксигенных штаммах *Clostridium difficile* при использовании пептидов человека с антибиотиками: моксифлоксацином, тигециклином, пиперациллином-тазобактамом. Этот комбинированный метод рассматривается, как новая стратегия усиления активности антибиотиков [13].

Имеются сообщения о перспективности применения антиадгезивных средств в терапии инфекционных заболеваний, в том числе чумы. Экспериментально установлено, что плазма и сыворотка крови человека резко снижают прикрепление бактерий к эритроцитам; плазма обладает более выраженным действием. Показано, что за адгезивное свойство ответственны как термолабильные, так и термостабильные компоненты плазмы и сыворотки. Поиски антиадгезивных препаратов могут идти в двух направлениях: блокирующие рецепторы микроба

или клетки организма хозяина. Более предпочтительны первые, так как они в меньшей мере влияют на процессы, происходящие в тканях организма [14].

Можно искать подходы, используя биологический феномен бактериоциногении, то есть синтез бактериями высокомолекулярных антибиотиков – бактериоцинов, веществ белково-пептидной природы, убивающих родственные виды или штаммы, тормозящие их рост. В отличие от известных антибиотиков бактериоцины имеют сравнительно узкий спектр действия, так как активны против бактерий того же или филогенетически родственных видов. Особенно это характерно для веществ, выделенных из грамотрицательных бактерий. *Y. pestis* вырабатывает пестицины, которые с помощью генетической инженерии нужно направить на уничтожение себе подобных вирулентных, вызывающих болезнь [15].

Исследован потенциал вирулентности штамма *Y. pestis* в условиях модельной микрогравитации. Освоение человеком космического пространства привело к необходимости оценить последствия пространственного стресса на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы. У некоторых грамотрицательных кишечных патогенных бактерий, например, *Salmonella typhimurium*, в условиях модельной микрогравитации или в реальных условиях космического полёта был выявлен переходный гипервирулентный фенотип. Экспериментальные результаты показали, что выращенный в таких условиях штамм *Y. pestis* имел сниженную индуцированную HeLa клетками цитотоксичность. Также, пролиферация штамма возбудителя чумы была ниже в сравнении с условиями NG-роста в течение 8-часовой инфекции макрофагов. Характеристика роста *Y. pestis* при низкой гравитации может дать новое понимание патогенеза бактериальной инфекции и позволит определить новые цели, которые могут быть использованы для разработки новых антимикробных препаратов, а также потенциальных живых аттенуированных вакцин [16].

Необходимость разработки новых лекарственных препаратов против чумы заставляет искать разные подходы. Сравнительный анализ метаболических путей 245 ферментов-мишеней штамма *Y. pestis* показал, что 25 из этих энзимов являются потенциально слабыми ферментами. В качестве примера была смоделирована структура «узкого места» фермента *MurE*-лигазы. Показана возможность определять мишень потенциального лекарственного препарата, что облегчает разработку новых противомикробных средств [17].

Санитарно-эпидемиологическое благополучие населения является актуальной задачей здравоохранения не только отдельных стран, но и всего мирового сообщества. На сегодняшний день в структуре мировой заболеваемости высок процент инфекционной патологии, что сформулировано как понятие «глобализация распространения инфекционных болезней» [18]. В этой связи необходимо активизировать процесс научного познания и эксперимента в области особо опасных инфекций, в том числе чумы.

#### Литература:

1. МУ 3.4.1030-01. Организация, обеспечение и оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий в случае завоза или возникновения особо опасных инфекций, контагиозных вирусных геморрагических лихорадок, инфекционных болезней неясной этиологии, представляющих опасность для населения Российской Федерации и международного сообщения: Методические указания. М.: 2001;64.
2. Калининский В.Б., Бондарева Т.А., Борисевич И.В. Анализ обеспеченности схем экстренной профилактики и лечения особо опасных бактериальных инфекций химиотерапевтическими препаратами, разрешёнными для применения в России//Соврем. технол.в реализации глобальной стратегии борьбы с инф. болезнями на территории гос-в-участн. СНГ: Матер. IX Межгос. науч.-практ. конф. гос-в-участн. СНГ (30 сентября – 2 октября, 2008 г., Волгоград, 2008. – С. 83-84.
3. Huang E., Yousef A.E. Paenibacterin, a novel broad – spectrum lipopeptide antibiotic, neutralises endotoxins and promotes survival in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* – induced sepsis. International journal of antimicrobial agents June 2014. Article in press.
4. Walkty A., Adam H., Baxter M. et al. In vitro activity of plazomicin against 5,015 gram – nega-

- tive and gram - positive clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals as part of the canward study, 2011 – 2012. *Antimicrob. agents chemotherapy* 2014; 58: 5: 2554 – 2563.
5. Lahiri S.D., Johnstone M.R., Ross P.L. et al. Avibactam and class c  $\beta$  - lactamases: mechanism of inhibition, conservation of the binding pocket, and implications for resistance. *Antimicrobial agents chemotherapy* October 2014; 58: 10: 5704 – 5713.
  6. Mansour H., Chahine E.B., Karaoui L.R., El-Lababidi R.M. Cethromycin: A New Ketolide Antibiotic//*Ann. Pharmacother.* 2013; 47(3):368-379.
  7. Rosenzweig J.A., Brackman S.M., Kirtley M. L., Sha J., Erova T.E., Yeager L.A., Peterson J. W., Xu Z.Q., Chopra A.K. Evaluation of a new chemotherapeutic: cethromycin-mediated protection against the plague pathogen, *Yersinia pestis*, in a rat model of infection and its comparison with levofloxacin//*Antimicrob. Agenst Chemother.* -2011.-Vol.55, N11.- P.5034-5042.
  8. Борздова И.Ю., Малецкая О.В., Логвиненко О.В., Царева Н.С. Разработка схемы лечения экспериментальной чумы липосомальными формами антибиотика и иммуномодулятора. *Акт. проблемы болезней, общих для человека и животных: 60 лет ФКУЗ Ставропольский ПЧИ Роспотребнадзора (23-24 мая 2012 г., Ставрополь).* Ставрополь, 2012; 114 – 115.
  9. Бондарева Т.А., Поярко А.Ю., Вахнов Е.Ю. Использование полиоксидония в комплексном лечении генерализованных форм экспериментальной чумы. *Проблемы особо опасн. инф.* 2009; 1: 99: 67 – 69.
  10. Viertel T.M., Ritter K., Horz H.-P. Viruses versus bacteria - novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug - resistant pathogens. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 2014; 69: 9: 2326 – 2336.
  11. Чернядьев А.В., Дудина Л.Г., Литвинец С.Г. и др. Электронно-микроскопическое исследование взаимодействия клеток *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* со специфическими бактериофагами. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2014; 4: 80 –82.
  12. Lukacik P., Barnard T.J., Keller P.W., Chaturvedi K.S., Seddiki N., Fairman J.W., Noinaj N., Kirby T.L., Henderson J.P., Steven A.C., Hinnebusch B.J., Buchanan S.K. Structural engineering of a phage lysin that targets Gram-negative pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109, 25: 9857-9862.
  13. Nuding S., Frasch T., Schaller M. et al. Synergistic effects os antimicrobial peptides and antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial agents chemotherapy* October 2014; 58:10: 5719 – 5725.
  14. Оборин В.А., Пименов Е.В., Ивонин А.Г., Романов В.Е. Перспективы применения антиадгезивной терапии при инфекционных заболеваниях, обусловленных возбудителями чумы, сибирской язвы и сальмонеллеза. *Диагностика, лечение и проф-ка опасн. и особо опасн. инф. забол. Биотехнология.: Матер. Всерос. науч. конф., посвящ. 80-летию со дня основания ФГУ «48 ЦНИИ МО».* Киров, 2008; 1: 99 – 103.
  15. Егоров Н.С., Баранова И.П. Бактериоцины. Образование, свойства, применение. *Антибиотики и химиотерапия* 1999; 6: 33 – 40.
  16. Rosenzweig J.A., Chopra A.K. The effect of low shear force on the virulence potential of *Yersinia pestis*: new aspects that space-like growth conditions and the final frontier can teach us about a formidable pathogen. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2: 107.
  17. Sharma A., Pan A. Identification of potential drug targets in *Yersinia pestis* using metabolic pathway analysis: as a case study. *Eur. J. Med. Chem.* 2012; 57: 185-195.
  18. Chin C. S., Sorenson J., Harris J.B. et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain//*N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 364. – P. 33-42.

## РАЗДЕЛ 3. ИММУНОЛОГИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

### РЕГУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СТАДИЕЙ ИКСОДОВОГО КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА

Григорьева С.А., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б., Кальгина Г.А.,  
Курлаева Л.В., Фадеева Н.В.

*ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой  
инфекционной патологии» Роспотребнадзора, Тюмень*

#### **Аннотация:**

В статье представлен анализ продукции цитокинов и других иммунологических показателей у пациентов с хронической формой иксодового клещевого боррелиоза. Выявлены количественные изменения ключевых цитокинов и их влияние на гуморальный и клеточный тип иммунного ответа при этих заболеваниях.

Проблема иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ) чрезвычайно актуальна во всем мире. Это объясняется широким распространением инфекции, наличием ее тяжелых хронических форм, нередко приводящим к инвалидизации человека. Тюменская область России является природным очагом ИКБ. Возбудители ИКБ относятся к семейству Spirochaetaceae, роду *Borrelia*. Наиболее острые вопросы в проблеме ИКБ связаны с неизученностью механизмов формирования хронической органной патологии. Цикличность течения, полиморфизм симптоматики позволяют предполагать участие иммунной системы в патогенезе ИКБ.

**Цель работы** состояла в сравнении уровня и соотношения про- и противовоспалительных цитокинов и их регулирующем влиянии на иммунный ответ у больных хронической формой ИКБ.

#### **Материалы и методы.**

Под наблюдением находилось 15 пациентов с хронической формой иксодового клещевого боррелиоза. Все обследованные лица – до начала лечения. Средний возраст пациентов составил  $32 \pm 5,3$  лет. Определяли уровень цитокинов ИЛ-4, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-8, концентрацию иммуноглобулинов классов G, A, M у наблюдаемых больных. Также проводили определение субпопуляционного состава лимфоцитов и активность фермента миелопероксидазы гранулоцитов. В контрольную группу вошли здоровые люди г.Тюмени сопоставимые по возрасту.

В наших исследованиях мы определяли спонтанные уровни ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4, ИЛ-8 у больных хронической формой ИКБ. В результате исследований выявлен повышенный уровень ИЛ-4 и ИЛ-8. Гиперпродукция цитокинов ведет к развитию системной воспалительной реакции и может служить причиной развития ряда патологических состояний [1, 2]. Не менее важную роль цитокины играют в регуляции дифференцировки и функциональной активности лимфоцитов [3]. Направление иммунного ответа связано с одним из вариантов активации лимфоцитов с преимущественным участием клонов Т-лимфоцитов: хелперов первого (Th-1) или второго (Th-2) типа. Концентрация ИФН- $\gamma$  составляет  $28,0 \pm 7,5$  пг/мл. Содержание ИЛ-4 в сыворотке крови равно  $45 \pm 11$  пг/мл и достоверно ( $p < 0,05$ ) превышает концентрацию ИЛ-4 у здоровых людей ( $20 \pm 2,5$  пг/мл) более, чем в два раза. Соотношение ИФН- $\gamma$ / ИЛ-4 снижено в группе с хронической стадией ИКБ до 0,62 (в контроле 1,25). Это говорит о преобладании Th-2 типа иммунного ответа. ИЛ-4 - ключевой цитокин Th-2 клонов лимфоцитов. При анализе субпопуляционного состава лимфоцитов выявлено достоверное ( $p < 0,01$ ) снижение относительного и абсолютного содержания Т-клеток с цитотоксической функцией ( $12 \pm 2,3$  процента у больных ИКБ против  $20 \pm 0,7$  процентов в группе ЗЛ;  $281 \pm 53$  кл/мкл у больных ИКБ против  $382 \pm 29$  кл/мкл в группе ЗЛ). В результате нарушения соотношения субпопуляций Т-лимфоцитов, индекс Т-х/Тцит. достоверно ( $p < 0,05$ ) повышен в группе больных ИКБ до  $4,5 \pm 1,1$  против  $1,74 \pm 0,1$  в группе ЗЛ. (Рис.1.).

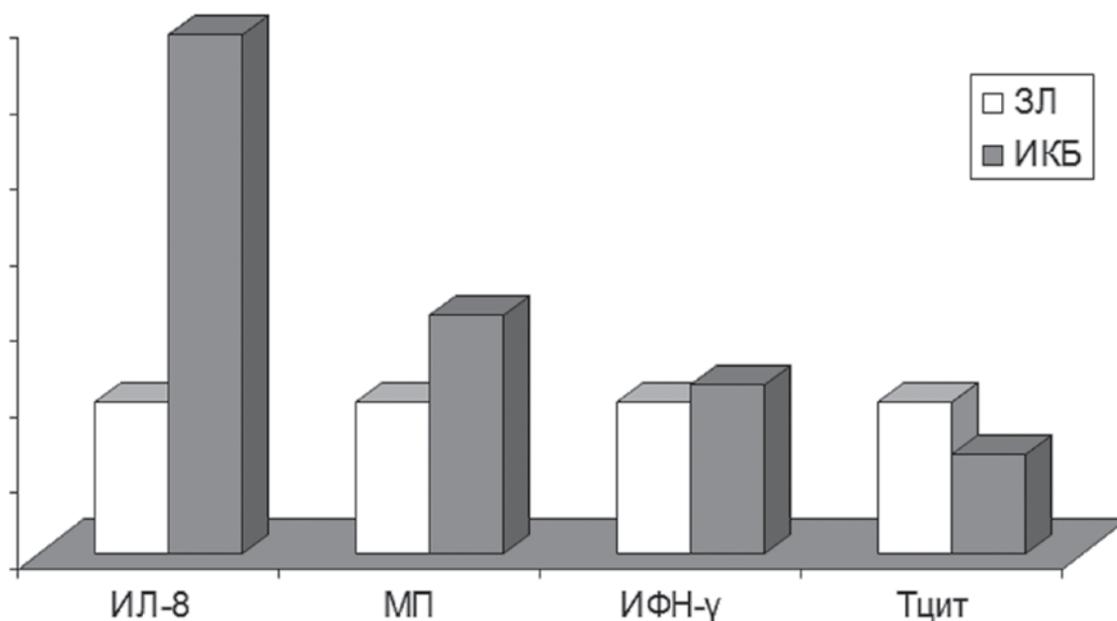


Рис. 1. Показатели неспецифической резистентности и клеточного иммунитета у пациентов с хронической стадией ИКБ.

Количество В-лимфоцитов достоверно ( $p < 0,01$ ) повышено у этих больных: относительное содержание  $20 \pm 1,8$  против  $15 \pm 0,5$  у ЗЛ и абсолютное:  $471 \pm 50$  кл/мкл против  $277 \pm 9$  кл/мкл у ЗЛ. У больных ИКБ достоверно повышена концентрация всех классов иммуноглобулинов. Концентрация иммуноглобулина G составила  $15,1 \pm 0,4$  мг/мл против  $10,6 \pm 0,4$  мг/мл в группе ЗЛ ( $p < 0,05$ ), иммуноглобулина А составило  $2,8 \pm 0,7$  мг/мл против  $1,44 \pm 0,1$  мг/мл у ЗЛ ( $p < 0,05$ ), иммуноглобулина М -  $2,3 \pm 0,2$  мг/мл против  $1,3 \pm 0,03$  мг/мл у ЗЛ ( $p < 0,001$ ) (Рис.2.).

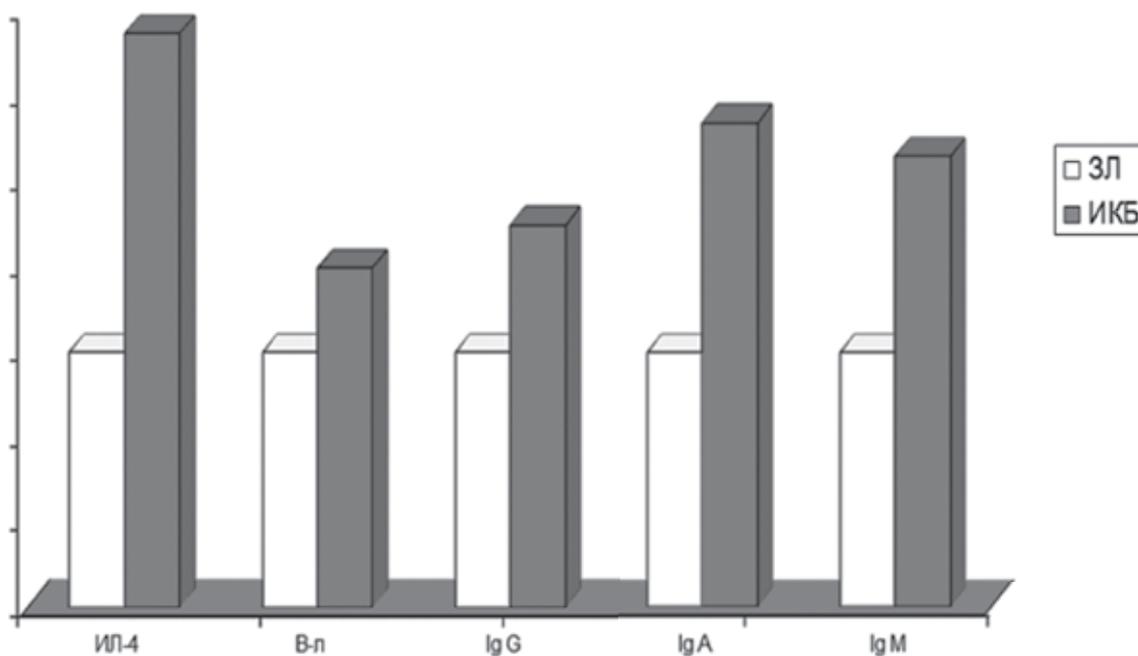


Рис. 2. Показатели гуморального иммунитета пациентов с хронической стадией ИКБ.

Анализ уровня ИЛ-8: продукция этого цитокина повышена и составляет  $103 \pm 23,1$  пг/мл. Это достоверно выше ( $p < 0,01$ ), чем в группе ЗЛ: 30 пг/мл. Этот интерлейкин относится к хемокинам, которые усиливают направленную миграцию лейкоцитов в очаг воспаления и вместе с другими цитокинами увеличивают их функциональную активность: фагоцитоз и продукцию кислородных радикалов, направленную на элиминацию патогена. Незавершенный фагоцитоз в первую стадию иксодового клещевого боррелиоза, а также способность боррелий к длительному внутриклеточному переживанию в фибробластах могут играть значительную роль в формировании хронического процесса [4]. Для оценки регулирующего влияния этого цитокина была исследована функциональная активность нейтрофилов. Для этого определялась активность внутриклеточного фермента миелопероксидазы этих клеток. Этот показатель достоверно ( $p < 0,05$ ) повышен в группе хронической формы ИКБ по сравнению с группой здоровых людей (343 у.е. у больных с ИКБ против 218 у.е. в группе ЗЛ) (Рис.1.).

Таким образом, уровни и соотношение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов изменяются в хроническую стадию иксодового клещевого боррелиоза. Они оказывают регулирующее влияние на иммунный ответ в инфицированном организме. Вместе с изменением продукции и соотношения ключевых цитокинов, изменяется субпопуляционный состав лимфоцитов и продукция антител. Эти изменения подтверждают преобладание направленности иммунного ответа по Th-2 пути. Возможная недостаточность антигенспецифического иммунного ответа, его клеточного компонента, компенсируется усилением функциональной активности неспецифической защиты, которую берут на себя нейтрофилы. Это проявляется увеличением активности миелопероксидазы нейтрофилов. Хроническая несбалансированность активации Т-хелперных клонов, о которой можно судить по измененной концентрации и соотношению регуляторных цитокинов, приводит к развитию иммунопатологических состояний, связанных с проявлениями аллергии или аутоиммунитета.

#### Литература:

1. Ананьева Л.П., Барскова В.Г., Скрипникова И.А., Смир А.С. Стадийное течение лаймборрелиоза у больных с мигрирующей эритемой в дебюте // Проблемы клещевых боррелиозов: Сб. научных трудов под ред. Э.И. Коренберга.- М.,1993.- С.66-74.
2. Бараулина А.С., Кологривова Е.Н., Жукова О.Б., Чечина О.Е. Особенности продукции цитокинов при хронизации иксодового клещевого боррелиоза. Бюллетень сибирской медицины, 2010.- № 1. -С.21-26.
3. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление. 2004.- № 2.-С.16-22.
4. Железникова Г.Ф., Скрипченко Н.В., Васильева Ю.П. и др. Ранний цитокиновый и иммунный ответ при иксодовом клещевом боррелиозе у детей // Мед. иммунология.- 2002.- Т.4. № 3.- С.459-466.

## **ЭКСПРЕССИЯ V $\alpha$ 1-6 В Т-ХЕЛПЕРАХ, СОЗРЕВАЮЩИХ С В-ЛИМФОЦИТАМИ**

**Воронина Е.В., Талаева М.В., Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е.**

*ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

**Введение.** Исследование общих закономерностей работы иммунной системы, понимание механизмов реализации иммунного ответа и способов взаимодействия иммунокомпетентных клеток необходимы не только для более полного представления о процессах, протекающих в нашем организме, но и для разработки принципиально новых способов лечения и борьбы с инфекциями. Данная работа посвящена изучению экспрессии ядерного фактора V $\alpha$ 1-6 в Т-хелперах, которые созревают в смешанной культуре с В-лимфоцитами. Фолликулярные Т -

хелперы (Тфх) – одна из субпопуляций CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, основной функцией которой является стимуляция гуморального иммунного ответа [1-3]. Тфх критически необходимы для формирования герминативных центров внутри фолликулов вторичных лимфоидных органов, а также для событий, которые происходят внутри этой зоны: соматических гипермутаций в В-клетках, приводящих к созреванию аффинитета антител, переключения изотипов иммуноглобулинов, образования В-клеток памяти и долгоживущих плазмочитов. Отсутствие хелперной помощи во время созревания В-лимфоцита, приводит его к апоптозу [1-6]. В-клеточная зона лимфоидных фолликулов, межфолликулярное пространство со смешанной зоной распределения Т- и В-лимфоцитов – основные места локализации и выполнения специфических функций Тфх [1, 4, 5]. Зрелые Тфх, выделенные из лимфоидных органов человека, имеют фенотип CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>, продуцируют ИЛ-21 и ИЛ-4 и отличаются высокой экспрессией ICOS и PD-1, OX40, CD40L, CD84; а так же экспрессией ядерных факторов, управляющих их созреванием: репрессора транскрипции Bcl-6 и фактора транскрипции c-MAF [1, 6-9]. Предполагается, что для дифференцировки в Тфх наивным CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам необходимо активироваться с помощью дендритных клеток (ДК) в Т-клеточной зоне лимфатического узла, экспрессировать хемокиновый рецептор CXCR5 для миграции в В-клеточную зону, и вступить в когнатные взаимодействия с В-лимфоцитами. Однако, в модели с мышами, инфицированными нематодой *Heligmosomoides polygyrus*, показано, что созревание Тфх и Т-хелперов 2 типа (Тх2) происходит вблизи фолликулов и требует миграции ДК в эту зону лимфатических узлов [10]. В свою очередь, мы недавно показали, что наивные CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты *in vitro* созревают в Тх, фенотипически идентичные Тфх, под действием В-лимфоцитов и не требуют участия ДК в этом процессе [11]. Транскрипционный фактор Bcl-6 способствует экспрессии генов, придающих специфический фенотип Тфх, при этом Bcl-6 подавляет экспрессию ряда транскрипционных факторов, служащих регуляторами дифференцировки для других субпопуляций Т-хелперов (TBX21 – фактора дифференцировки Тх1, GATA3 – Тх2 и RORc – Тх17) [12-15].

Bcl-6 впервые был обнаружен в В-клеточных неходжкинских лимфомах [16,17]. Этот фактор транскрипции известен своей проонкогенной активностью, поскольку подавляет гены, ответственные за индукцию апоптоза и арест клеточного цикла, в частности, гены белков p53, ATR и CHEK1 [18, 19]. В 2009 году была обнаружена активность Bcl-6 в Т-хелперах. Было показано, что этот репрессор транскрипции критически необходим для созревания Т-фолликулярных хелперов. [12, 13, 14]. Поскольку созревание этих Т-клеток не нуждается в экспрессии ключевых ядерных факторов других групп Т-хелперов, Bcl-6 был признан мастер-регулятором данной субпопуляции. В нашей прошлой работе мы показали, что эффективное созревание Тфх, формирующее специфический набор функционально значимых для этих клеток молекул, происходит при контакте с В-лимфоцитами [11]. Полученные данные ставят вопрос об экспрессии специфического регулятора программы созревания Т-фолликулярных хелперов – Bcl-6 в Т-хелперах, вступающих во взаимодействия с В-лимфоцитами. В данной работе нами было показано, что наивные Т-лимфоциты, стимулированные аллогенными В-лимфоцитами, созревают в Т-лимфобласты с фенотипом Тфх и экспрессией ядерного фактора транскрипции Bcl-6.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлись наивные Т-хелперы и В-лимфоциты, которые получали с помощью иммуномагнитной сепарации из неприлипающей к пластику фракции мононуклеарных клеток периферической крови взрослых здоровых доноров. Для иммуномагнитной сепарации использовались наборы EasySep® Human Naïve CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit и EasySep® Human B Cell Enrichment Kit (Stemcell technologies, США) в соответствии с инструкциями производителя. Чистота полученных популяций клеток оценивалась при помощи лазерной проточной цитометрии по экспрессии типичных молекул для данных популяций и отсутствию линейных маркеров других групп клеток. Для этого использовали конъюгаты моноклональных антител (МКА) к молекулам CD3, CD4, CD14, HLA-DR (Сорбент, Москва), CD45, CD19 (BD Biosciences, США), CCR7, CD45RA и CD45RO (eBioscience, 244

США). В работе использовались популяции лимфоцитов с чистотой не менее 95 %. При засеве смешанной культуры Т- и В-лимфоцитов использовали соотношение 1:5, соответственно. Смешанные культуры выращивали в круглодонных 96-луночных планшетах в среде RPMI 1640 с 10 % ЭТС в течение 5 суток. Для оценки экспрессии ядерного фактора Bcl-6 после окрашивания поверхностных маркеров клетки фиксировали и их мембраны пермеабилizировали с помощью набора реагентов Foxp3 Fixation/Permeabilization Kit (eBioscience, США) согласно рекомендациям производителя для окрашивания ядерных белков. После этого клетки окрашивали МКА к Bcl-6, конъюгированными с аллофикоцианином (eBioscience, США). Окрашенные пробы анализировали на проточном цитофлюориметре FACS Calibur (BD Biosciences, США). Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения CellQuest. Статистический анализ проводили с использованием t-теста Стьюдента для зависимых выборок.

**Результаты.** Для изучения экспрессии Bcl-6 в Т- и В-лимфоцитах использовали смешанные культуры. Наивные Т-лимфоциты получали с помощью иммуномагнитной сепарации с негативной селекцией. Доля целевой субпопуляции CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> клеток в изолятах составляла от 95,2 до 98,2%. В-лимфоциты также выделяли с помощью иммуномагнитной сепарации. В работе использовали изоляты, содержащие от 98,7 до 99% В-клеток с фенотипом CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>. При засеве смешанных культур Т- и В-лимфоцитов использовали соотношение 1:5, для воссоздания *in vitro* преобладания В-клеток в фолликулах и перифолликулярном пространстве. Стимуляция Т-лимфоцитов аллогенными В-лимфоцитами способствовала превращению части клеток в лимфобласты. К пятым суткам культивирования лимфобласты значительно увеличивались в размерах, что позволяло их четко отделять от покоящихся лимфоцитов в соответствии с показателями прямого и бокового светорассеивания. Анализ экспрессии вариантов молекулы CD45RO в смешанных культурах Т-хелперов с В-клетками показал, что более половины CD4<sup>+</sup> лимфобластов экспрессировали CD45RO, в то время как Т-хелперы из контрольной культуры и Т-хелперы лимфоцитарного гейта из смешанной культуры оставались незрелыми. Распределение CD4<sup>+</sup> Т-клеток смешанных культур по 4 группам с различной экспрессией CCR7 и CXCR5 представлено на рис. 1. Т-хелперы контрольных культур сохраняли экспрессию CCR7. Подавляющее большинство CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов смешанных культур с В-лимфоцитами сохраняли набор хемокиновых рецепторов, характерный для наивных Т-хелперов: CCR7<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>. В то же время, созревающие CD4<sup>+</sup> Т-лимфобласты в смешанных культурах с В-лимфоцитами формировали две большие группы с фенотипом, отличным от исходного. Самая многочисленная группа демонстрировала набор хемокиновых рецепторов, характерных для Тfh (CCR7<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup>), а другая группа – фенотип зрелых эффекторов и эффекторных Т-клеток памяти (CCR7<sup>-</sup>CXCR5<sup>-</sup>). При этом, CXCR5<sup>+</sup> клетки не только утрачивали экспрессию CCR7, но и усиленно экспрессировали ICOS, PD-1 и OX-40. Таким образом, фенотип наиболее многочисленной группы CD4<sup>+</sup> Т-лимфобластов, созревающей в смешанной культуре с В-лимфоцитами, соответствовал фенотипу Т-фолликулярных хелперов. Для оценки экспрессии белка Bcl-6 в Т-лимфоцитах применялась комбинация поверхностного и внутриклеточного окрашивания. В нестимулированных Т-лимфоцитах контрольных культур средние значения содержания Bcl-6<sup>+</sup> клеток были ниже 2%. В Т-лимфоцитах смешанных культур содержание Bcl-6<sup>+</sup> клеток несколько возросло, но не превышало 4% от общего количества CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, тогда как в Т-лимфобластах смешанных культур более 7% CD4<sup>+</sup> клеток экспрессировали Bcl-6 (Рис. 2, б). Оценка распределения Bcl-6 в группах Т-лимфоцитов показала его наличие на CXCR5<sup>+</sup> Т-лимфобластах смешанных культур, но отсутствие на CCR7<sup>+</sup> Т-лимфобластах (Рис. 2, а). Анализ содержания Bcl-6<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> клеток практически не выявил клеток с таким фенотипом в Т-лимфоцитах контрольных культур и не прошедших трансформацию в бласты Т-лимфоцитах смешанных культур. В то же время, содержание Bcl-6<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> клеток среди Т-лимфобластов смешанных культур практически соответствовало общему повышенному содержанию Bcl-6<sup>+</sup> клеток в этой группе: около 6% этих клеток несли одновременно и Bcl-6, и CXCR5 (Рис. 2, в).

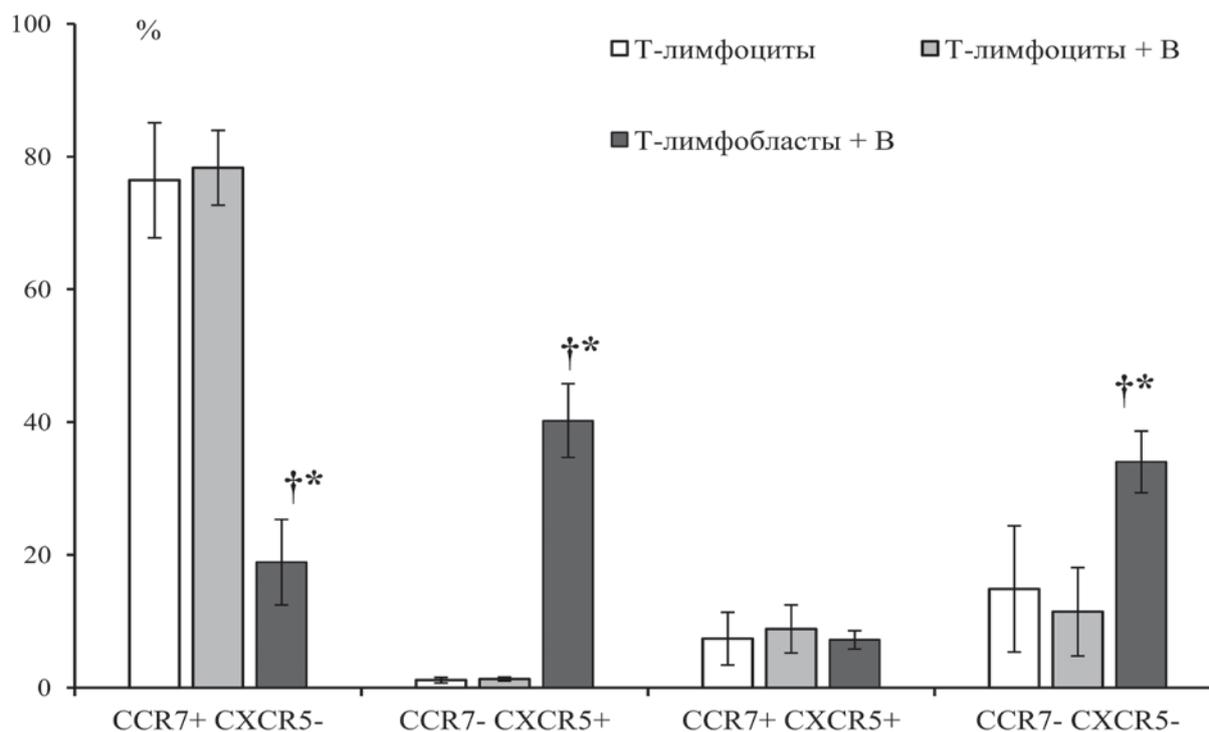


Рис. 1. Созревание CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в смешанных культурах с В-лимфоцитами. Содержание групп CD4<sup>+</sup> Т-клеток, различающихся по экспрессии CCR7 и CXCR5, среди лимфоцитов и лимфобластов смешанных культур. Фенотип клеток обозначен под гистограммами, принадлежность к лимфоцитам или лимфобластам в контрольных культурах и в смешанных культурах с В-лимфоцитами (+ В) – в легенде. Достоверные отличия от контрольных Т-лимфоцитов обозначены - \*, различия между лимфоцитами и лимфобластами - † (p<0,05).

**Обсуждение.** В данной работе исследовались аллогенные смешанные культуры Т- и В-лимфоцитов. Наивные Т-лимфоциты вступали в когнатные взаимодействия с В-лимфоцитами. Происходила активация Т-лимфоцитов, которые получали стимулирующий сигнал от В-лимфоцита, распознавая чужие аллельные варианты белков, представленных комплексом пептид-МНС II класса. Активация Т-лимфоцитов сопровождалась их пролиферацией и трансформацией в более крупные Т-лимфобласты, которые хорошо отделялись при лазерной проточной цитометрии от Т-лимфоцитов по показателям светорассеивания. Оценка зрелости Т-клеток по экспрессии молекулы CD45RO, показала, что практически все созревшие в культуре с В-лимфоцитами Т-клетки сосредоточены в гейте лимфобластов.

Созревающие CD4<sup>+</sup> Т-лимфобласты в смешанных культурах с В-лимфоцитами сформировали многочисленную группу, которая экспрессировала характерный для Тfh хемокиновый рецептор CXCR5, и утрачивала CCR7. Т-лимфобласты, экспрессирующие CXCR5, из смешанных культур с В-лимфоцитами, фенотипически соответствовали Тfh: они приобретали ICOS, PD-1 и OX-40. Внутриклеточное окрашивание репрессора транскрипции Bcl-6, фактора, который считается основным мастер-регулятором Тfh, выявило, что CXCR5<sup>+</sup> Т-лимфобласты из смешанной культуры с В-лимфоцитами значительно увеличивали экспрессию ядерного белка Bcl-6. Эти данные подтверждают наше предположение о том, что взаимодействия с В-лимфоцитами вполне достаточно для запуска программы созревания наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в Т-фолликулярные хелперы.

**Заключение.** Показано, что наивные CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, стимулированные В-клетками *in vitro*, фенотипически идентичные Тfh, экспрессируют ядерный фактор транскрипции Bcl-6 – мастер-регулятор созревания Тfh. По-видимому, фолликулярные В-лимфоциты способствуют созреванию Т-фолликулярных клеток-помощников, которые, в свою очередь, необходимы

для созревания В-лимфоцитов, способных к переключению изотипов иммуноглобулинов и созреванию аффинитета антител.

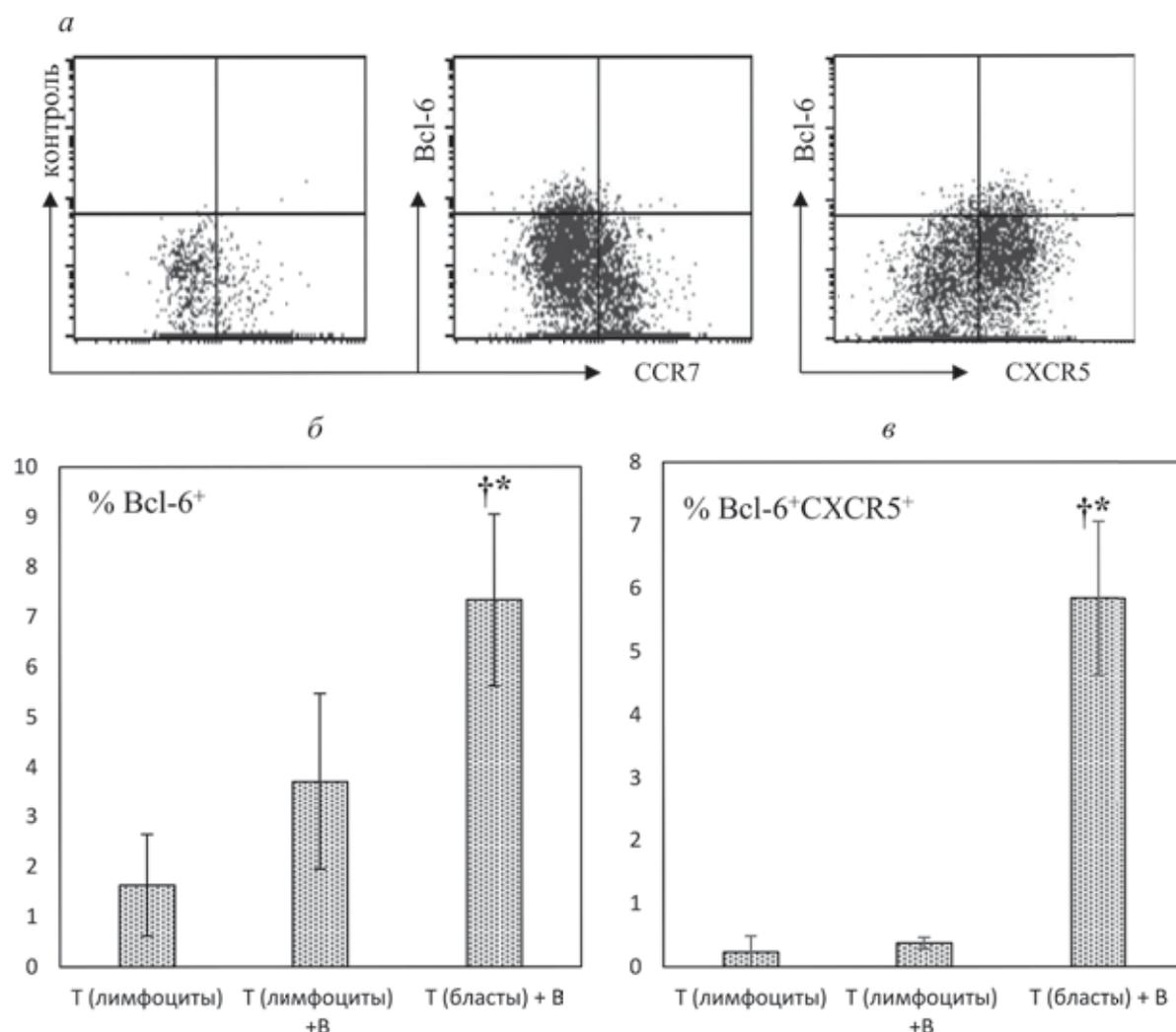


Рис. 2. Экспрессия белка Bcl-6 в Т-лимфоцитах смешанных культур. а – пример экспрессии Bcl-6, CCR7 и CXCR5 на гейтированных CD4<sup>+</sup> Т-лимфобластах из смешанных культур Т-клеток с В-лимфоцитами; слева – контроль окрашивания Bcl-6. б – средние значения содержания Bcl-6<sup>+</sup> клеток среди CD4<sup>+</sup> клеток в смешанных культурах. в - содержание CXCR5<sup>+</sup>Bcl-6<sup>+</sup> клеток среди CD4<sup>+</sup> клеток в смешанных культурах. Типы анализируемых клеток – в легенде, типы использованных контрольных и смешанных культур – под графиком.

Работа поддержана грантами РФФИ 13-04-00264а, 16-34-00041мол\_а.

#### Литература:

1. Ma, C.S. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells / C.S Ma., E.K. Deenick, M.Batten, S.G.Tangye // J. Exp. Med. – 2012. – Vol. 209. – № 7. – P.1241-1253.
2. Fazilleau, N. Follicular helper T cells: lineage and location. / N. Fazilleau, L. Mark, L.J. McHeyzer-Williams, M.H. McHeyzer-Williams // Immunity. – 2009. – Vol. 30 – № 3. – P. 324-335.
3. Топтыгина, А.П. Лимфоидный фолликул – территория иммунного ответа. / А.П. Топтыгина // Иммунология. – 2012. – Vol. 33. – №3. – P.162-169.

4. McHeyzer-Williams, L. Follicular helper T-cells as cognate regulator of B cell immunity / L.McHeyzer-Williams, N.Pelletier, L.Mark et al. // *Curr. Opin. Immunol.* – 2009. – Vol. 21. – P. 266–273.
5. Fazilleau, N. Follicular helper T cells: lineage and location/ N.Fazilleau, L.Mark, L. McHeyzer-Williams et al. // *Immunity.*– 2009. – Vol. 30. – P. 324–335.
6. Wang, C. Phenotype, effector function, and tissue localization of PD-1-expressing human follicular helper T cell subsets. / C.Wang, P.Hillsamer, C.H.Kim // *BMC Immunology.* – 2011. – 12:53.
7. Hutloff, A. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28 / A.Hutloff, A.Dittrich, R. Kroczek et al. // *Nature.* – 1999. – Vol. 397. – P. 263–266.
8. O’Shea, J.J. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. / J.J.O’Shea, W.E.Paul // *Science.* – 2010. – Vol. 327. – P.1098-1102.
9. Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). / S.Crotty // *Annu. Rev. Immunol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 621–663.
10. Leyn, B. Regulation of TH2 development by CXCR5+ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells. / B.Leyn, A.Ballesteros-Tato, J.L.Browning, R.Dunn, T.D.Randall, F.E.Lund // *Nat. Immunol.* – 2012. – Vol. 13. – № 7 – P. 681-690.
11. Талаев, В.Ю. Созревание Т-фолликулярных хелперов *in vitro* / В.Ю. Талаев, М.В. Плеханова, Е.В. Воронина, О.Н. Бабайкина, // *Иммунология.* – 2015. – Т. 36. – №6. – С. 336.
12. Yu, D. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. / D.Yu, S.Rao, L.M.Tsai, S.K.Lee, Y.He, E.L.Sutcliffe, M.Srivastava, M.Linterman, L.Zheng, N.Simpson, et al. // *Immunity.* – 2009. – Vol. 31. – P. 457–468.
13. Johnston, R.J. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. / R.J.Johnston, A.C.Poholek, D.DiToro, I.Yusuf, D.Eto, B. Barnett, A.L.Dent, J.Craft, S.Crotty // *Science.* – 2009. – Vol. 325. – P. 1006–1010.
14. Nurieva, R.I. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. / R.I. Nurieva, Y.Chung, G.J.Martinez, X.O.Yang, S.Tanaka, T.D.Matskevitch, Y.H.Wang, C.Dong // *Science.* – 2009. – Vol. 325 – P. 1001–1005.
15. Bunting, K.L. New effector functions and regulatory mechanisms of BCL6 in normal and malignant lymphocytes. / K.L.Bunting, A.M.Melnick // *Curr Opin Immunol.* – 2013 June. – Vol. 25 – № 3 – P. 339–346.
16. Kerckaert J.P. LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. / Kerckaert J.P., Deweindt C., Tilly H., Quief S., Lecocq G., Bastard C. // *Nat Genet.* – 1993 Sep. – Vol. 5 – № 1 – P. 66-70.
17. Ye, B.H. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. / B.H.Ye, F.Lista, F.Lo Coco, D.M.Knowles, K.Offit, R.S.Chaganti, R.Dalla-Favera // *Science.* – 1993 Oct. – Vol. 262(5134). – P. 747-50.
18. Baron, B.W. Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B-cell lymphomas / B.W.Baron, G.Nucifora, N.McCabe, R.3rd Espinosa, M.M.Le Beau, T.W.McKeithan // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1993. — Т. 90, вып. 11. — С. 5262—5266.
19. Duy, C. BCL6 enables Ph+ acute lymphoblastic leukaemia cells to survive BCR-ABL1 kinase inhibition / C.Duy, C.Hurtz, S.Shojaee, L.Cerchietti, H.Geng, S.Swaminathan, L.Klemm, S.M.Kweon, R.Nahar, M.Braig, E.Park, Y.M.Kim, W.K.Hofmann, S.Herzog, H.Jumaa, H.P. Koeffler, J.J.Yu, N.Heisterkamp, T.G.Graeber, H.Wu, B.H.Ye, A.Melnick, M.Mьschen // *Nature.* — 2011. —Т. 473, вып. 7347. — С. 384—8.

## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА НА ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БРУЦЕЛЛЕЗОМ

Костюченко М.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В.,  
Санникова И.В., Дейнека Д.А.

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь  
ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава  
России, Ставрополь

Апоптоз – явление запрограммированной гибели отдельных клеток в многоклеточном организме (поврежденных, мутантных, инфицированных). Данный физиологический механизм элиминации клеток задействован в процессах дифференциации и морфогенеза, в поддержании клеточного гомеостаза, в обеспечении важных аспектов развития и функционирования иммунной системы [1, 2, 3].

Адекватный баланс между позитивной активацией лимфоцитов (пролиферацией, клональной экспансией) и их «негативной» активацией (апоптозом) является одним из основных принципов функционирования иммунной системы [4].

В последнее время большое внимание уделяется изучению апоптоза с точки зрения влияния его на различные патологические процессы [5]. При этом нарушения апоптоза могут быть как в сторону его ослабления, так и усиления. Повышенная активация программируемой клеточной гибели (ПКГ) является одним из звеньев нейродегенеративных и миелодиспластических заболеваний, ишемических повреждений различных органов и других патологических состояний. Напротив, ингибирование процессов ПКГ наблюдается при опухолевых процессах [6], аутоиммунных заболеваниях. Заболевания вирусной этиологии сопровождаются нарушениями регуляции клеточной гибели. При этом отмечается как усиление апоптоза (цитомегаловирусная инфекция), так и его ингибирование (вирус герпеса, вирус Эпштейна-Барр). Выраженный апоптоз лимфоцитов также имеет место у человека и животных, инфицированных возбудителем чумы, сибирской язвы и других особо опасных инфекций [7, 8].

Бактериальные инфекции с внутриклеточной локализацией возбудителя (*Mycobacteria tuberculosis*, *Chlamydia spp.* и др.) обладают способностью, как активировать, так и ингибировать апоптотические сигнальные пути, используя различные механизмы, что отражается в клинических проявлениях и персистенции инфекции. Бактерии могут содержать некоторые апоптотические молекулы, такие как общие структурные компоненты – липополисахариды у грамотрицательных бактерий, липотейхоевая кислота клеточной стенки грамположительных бактерий, а также факторы вирулентности, такие как экзотоксины, цитолизины и гемолизины. Через эти субстанции бактерии способны быть триггерами как внутреннего, так и внешнего путей апоптоза у микроорганизмов при вне- и внутриклеточной локализации [16].

При большинстве бактериальных инфекций избыточный апоптоз развивается в ответ на действие экзотоксинов (суперантигенов), вызывающих активацию и массовую пролиферацию Т-лимфоцитов с их последующей гибелью по механизму апоптоза (активационный апоптоз).

Имеются данные, указывающие на способность *Brucella spp.* ингибировать апоптоз инфицированных макрофагов с целью пролонгации срока жизни фагоцитов и, соответственно, увеличения времени эндцитобиоза и внутриклеточной репликации бруцелл [11, 12].

По мнению ряда исследователей, наиболее оптимальным методом выявления апоптотических клеток в крови является проточная цитофлуориметрия, с помощью которой можно определить потерю части ДНК апоптотических клеток, оценить интенсивность экспрессии «рецепторов смерти» и их лигандов на цитоплазматической мембране [13].

Среди маркеров апоптоза наибольший интерес представляет рецептор апоптоза CD95 (FAS, APO-1), интенсивность экспрессии которого указывает на активацию иммунных клеток и их готовности к FAS-индуцированному апоптозу. Его лигандом служит тримерная молекула, относящаяся к семейству фактора некроза опухоли – FasL (CD178) [14, 15]. Взаимодействие Fas

с FasL индуцирует апоптоз клетки. Известно, что рецептор CD95, выступающий как поздний активационный маркер, конститутивно экспрессируется на поверхности клеток многих типов: преимущественно на Т-хелперах, активированных Т- и В-лимфоцитах, а также на тимоцитах фибробластах, гепатоцитах. FasL экспрессируется в основном на активированных Т-лимфоцитах и натуральных киллерах, связываясь с тремя молекулами Fas рецептора [16, 17].

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили больные бруцеллезом в острой ( $n = 45$ ) и хронической ( $n = 15$ ) форме, находящиеся на лечении в отделении по диагностике, лечению и экспертной профпатологии бруцеллеза ГБУЗ СК «Городская клиническая больница № 2» г. Ставрополя. В качестве сравнительного контроля обследовали 10 условно-здоровых людей не больных, не переболевших бруцеллезом и не вакцинированных против этой инфекции.

Оценку содержания CD95+ (Fas-рецептор) и CD178+(FasL-рецептор) и CD3+ лимфоцитов в периферической крови осуществляли стандартным методом прямого однопараметрического иммунофлюоресцентного окрашивания. Использовали FITC-меченные моноклональные антитела против CD95 и CD3 и меченные PE антитела против CD178 (Beckman Coulter, США). В контрольные пробы вносили меченные FITC или PE иммуноглобулины соответствующего изотипа. Анализ осуществляли на проточном цитометре FACS Calibur (Beckton Dickinson, США) с помощью программы Cell Quest Pro.

Обеззараживание исследуемого материала осуществляли в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий Стьюдента, при уровне надежности  $P \geq 0,95$ . Для выявления коррелятивной связи применяли метод ранговой корреляции Спирмена, с помощью которого оценивали тесноту связи между признаками, считая значения коэффициента меньше 0,19 - очень слабая, от 0,20 до 0,29 - слабая, от 0,3 до 0,49 - умеренная, от 0,5 до 0,69 - средняя и более 0,7- сильная степень корреляции при  $p \leq 0,01$  статистически высокая значимая корреляция, при  $p \leq 0,05$  значимая корреляция [18].

**Цель работы** - выявить особенности экспрессии маркеров апоптоза CD 95+ (Fas-рецептор) и CD 178+ (FasL-рецептор) на лимфоцитах периферической крови у больных острым и хроническим бруцеллезом.

**Результаты исследований.** У больных острым бруцеллезом отмечается снижение количества Т-лимфоцитов (CD3+) в среднем до  $63,00 \pm 2,91$  % по сравнению с обследуемой контрольной группой –  $72,20 \pm 3,45$  %,  $p < 0,01$ . При хроническом бруцеллезе уровень клеток с экспрессией CD3+ рецепторов несколько снизился и составил  $68,67 \pm 2,89$  %, однако статистически не отличался от данных контроля. Относительное содержание лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы CD95 у людей контрольной группы составило  $9,27 \pm 0,50$  %. У больных острой формой бруцеллеза уровень лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор, был значительно выше и находился в пределах  $24,67 \pm 1,58$  %, что является статистически достоверным по сравнению с контрольными значениями  $p < 0,001$ . Анализ проведенных исследований показал, что у пациентов с хронической формой бруцеллеза относительное содержание лимфоцитов с рецепторами CD95 было также выше контрольных величин и составляло  $14,44 \pm 1,20$  %,  $p < 0,001$ .

Анализ маркера CD178 на лимфоцитах у больных острой формой бруцеллеза установил двукратное увеличение уровня лимфоцитов, экспрессирующих рецептор FasL –  $1,02 \pm 0,08$  % по сравнению с контролем –  $0,51 \pm 0,03$  %,  $p < 0,001$ . При хроническом бруцеллезе уровень лимфоцитов, имеющих на мембране молекулу CD 178, не отличался от такового в группе больных острым бруцеллезом, составив в среднем  $0,91 \pm 0,12$  %, и был статистически выше контрольных значений  $p < 0,01$ .

Проведенный анализ корреляционной связи динамики количества лимфоцитов, экспрессирующих CD3 и CD95, выявил обратную связь средней силы – 0,608,  $p \leq 0,05$  при остром бруцеллезе и обратную умеренную – при хроническом бруцеллезе – 0,450,  $p \leq 0,05$ .

Таким образом, проведенные исследования показали, что у больных острым и хроническим бруцеллезом наблюдается снижение количества Т-клеток и увеличение относительного содержа-

ния лимфоцитов, экспрессирующих маркеры апоптоза - CD95+ и CD178+. При этом, у обследуемых с острой формой инфекции выявлено статистически большее число лимфоцитов, несущих трансмембранные белки – «рецепторы смерти», что можно связать с формированием индуцированной программируемой гибели лимфоцитов с целью элиминации из периферического кровотока антигенреактивных специфических клеток.

Выявленная корреляционная зависимость характеризует патогенетические взаимосвязи интенсивности клеточных апоптотических сигналов при остром и хроническом бруцеллезе с уровнем Т-клеток, а содержание лимфоцитов с маркерами апоптоза коррелирует с остротой инфекции.

Учитывая выявленную особенность экспрессии рецепторов апоптоза лимфоцитами крови у больных бруцеллезом, показатели CD 95+ (Fas-рецептор) и CD 178+ (FasL-рецептор) в перспективе можно использовать при постановке клеточных тестов с антигенспецифической активацией лимфоцитов *in vitro* в качестве диагностических маркеров болезни, а также для выявления степени остроты (тяжести) инфекционного процесса, прогнозирования течения бруцеллеза и оценки эффективности проводимой терапии.

#### Литература:

1. Самуилов В.Д. Программированная клеточная гибель / В.Д. Самуилов, А.В.Алескин, Е.М. Лагунова // Биохимия. - 2000. - Вып. 65.- № 8.- С. 1029-1046.
2. Ярилин А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах / А.А. Ярилин // Иммунология.- 1996.- №6.- С. 10-23.
3. Kerr J.F.R., Wyllie A.H. Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics / J.F.R Kerr, A.H. Wyllie // Brit J Cancer. – 1972. - №26 (2). - P.239-257.
4. Ярилин А.А. Апоптоз / А.А. Ярилин // Эстетическая медицина. – 2004.-Т.III.- №2.- 111 с.
5. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме / А.А. Ярилин // Патофизиология и экспериментальная терапия. - 1998.- №2.- С. 38-48.
6. Pan H., Yin C., Dyke T.V. Apoptosis and cancer mechanisms / H. Pan, C. Yin, T.V. Dyke // Cancer Surveys. – 1997. – Vol. 29. - P. 305-327.
7. Danthi P. Enter the kill zone: initiation of death signaling during virus entry / P. Danthi // Virology. – 2011. - Vol. 411. – P. 316–324.
8. Hay S. A time to kill: viral manipulation of the cell death program / S. Hay, G.Kannourakis // J. Gen. Virol. – 2002. - Vol. 83. - P. 1547–1564.
9. Dean D. Persistent Chlamydia trachomatis infections resist apoptotic stimuli / D.Dean, V.C. Powers // Infect. Immun. - 2001. - Vol. 69. - P. 2442–2447.
10. Lee J. Macrophage apoptosis in tuberculosis / J. Lee, M. Hartman, H.Kornfeld // Yonsei Med. J.-2009.-Vol. 50. - P. 1–11.
11. Fernandez-Prada C.M. Interactions between Brucella melitensis and human phagocytes: bacterial surface Opolysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis / C.M.Fernandez-Prada, E.B. Zelazowska, M. Nikolich [et al.] // Infect Immun.-2003.-Vol. 71.-P. 2110–2119.
12. Gross A. In vitro Brucella suis infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells / A.Gross, A.Terraza, S.Ouahrani-Bettache [et al.] // Infect Immun.-2000. - Vol. 68.-P. 342–351.
13. Войткова В.В. Изучение апоптоза методом проточной цитофлуориметрии (обзор литературы) / В.В. Войткова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. - № 6 (76). - Ч.1. – С. 220 – 225.
14. Фильченков А.А. Участие системы Fas/Fas-лиганд в регуляции гомеостаза и функционировании клеток иммунной системы / А.А.Фильченков, Ю.М. Степанов, В.М. Липкин, Н.Е. Кушлинский // Аллергология и иммунология.- 2013. -Т. 3, № 1. -С. 24 - 35.
15. Krammer P.H. CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis: live and let die / P.H.Krammer // Adv Immunol. - 1999. - Vol. 71. - P. 163-210.
16. Сомова Л.М. Апоптоз и инфекционные болезни / Л.М. Сомова, Н.Н. Беседнова, Н.Г. Плехова // Инфекция и иммунитет.- 2014.-Т. 4, № 4.-С. 303–318.
17. Lavrik I.N. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC / I.N. Lavrik, P.H. Krammer // Cell Death Differ.-2012. - Vol. 19. - P. 36–41.
18. Кобзарь А. И. Прикладная математическая статистика / А.И. Кобзарь - М.: Физматлит, 2006. – 628 с.

## СТИМУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОГО ОТВЕТА БЕЛКОМ E7 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

**Кропотов В.С.**

*ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, Нижний Новгород*

Клеточный иммунитет играет критическую роль в развитии ВПЧ-инфекции. Известно, что пациенты с различными нарушениями клеточного звена иммунитета имеют более высокий уровень ВПЧ, индуцирующий как доброкачественные, так и злокачественные опухоли [1,2]. В настоящее время считается, что основную роль в онкотрансформации инфицированных клеток играют вирусные белки E6 и E7. Они довольно иммуногенны, хорошо распознаются Т-лимфоцитами и проявляют свой эффект через формирование комплексов со специфическими белками — p53 и Rb, которые обычно выполняют в клетке противоопухолевую функцию. У вирусов с высоким онкогенным потенциалом комплексы E6-p53 и E7-Rb более стабильны, а инфицированные вирусом клетки неотвратимо становятся раковыми. [3]

Наиболее эффективно ВПЧ инфекция элиминируется при формировании клеточной доминанты в иммунном ответе. У пациенток с ЦИН различной степени наблюдались высокие уровни антител к вирусным протеинам, что свидетельствует о достаточном уровне гуморальной составляющей ответа и одновременно о ее полной беспомощности. [2,3]

Единственно надежным способом борьбы с вирусом ВПЧ на сегодняшний день является вакцинация, причем введение вакцины должно активировать преимущественно клеточное звено иммунного ответа [3,4,5]. Одним из возможных способов добиться этого эффекта является рекомбинация вирусных протеинов с мощным активатором клеточного звена. В качестве такого активатора может выступать HSP 70 *Mycobacterium tuberculosis*. В нашем исследовании была использована смесь онкогенных протеинов: E7 (6 типа вируса ВПЧ) и E7 (11 типа вируса ВПЧ) конъюгированная с HSP 70 *Mycobacterium tuberculosis* ( в дальнейшем «препарат»)

Оценка клеточного звена иммунного ответа проводилась на мышах линии BALB/c в различные сроки после введения им препарата с использованием метода проточной цитофлуорометрии. В качестве маркеров использовались комбинации моноклональных антител, выявляющие CD4 (маркер общей популяции Т-helper), CD4\_CD195 (Т-helper первого типа); CD8 (маркер Т-killer).

Было установлено, что однократное введение препарата вызывает активацию Т-клеток (включающую пролиферацию и дифференциацию соответствующего клона/клонов, что проявляется в увеличении их количества в тканях селезенки у животных в эксперименте. Динамика численности популяции Т-хелперов представлена на рис. 1. Максимальное увеличение численности Th наблюдалось на 21 сутки после введения препарата, в последующие периоды измерения наблюдалось снижение числа данных клеток в исследуемой ткани.

Наращение пула цитотоксических Т-лимфоцитов происходило несколько быстрее (на 14-й день после вакцинации), чем у Т-хелперов (рис. 2).

Регуляторные Т-лимфоциты выполняют функцию регулирования активности других иммунокомпетентных клеток. Высокая экспрессия этих клеток может свидетельствовать о подавлении, а их низкая активность - о стимуляции иммунного ответа. Динамика численности популяции регуляторных представлена на рис. 3. Динамика увеличения пула регуляторных Т-лимфоцитов после однократной вакцинации развивалась аналогично динамике, характерной для Т- лимфоцитов и естественных киллеров (т.е. с максимальным пиком на ранних сроках – на 14 день после вакцинации) и, соответственно, быстрее, чем у Т-хелперов (рис.3).

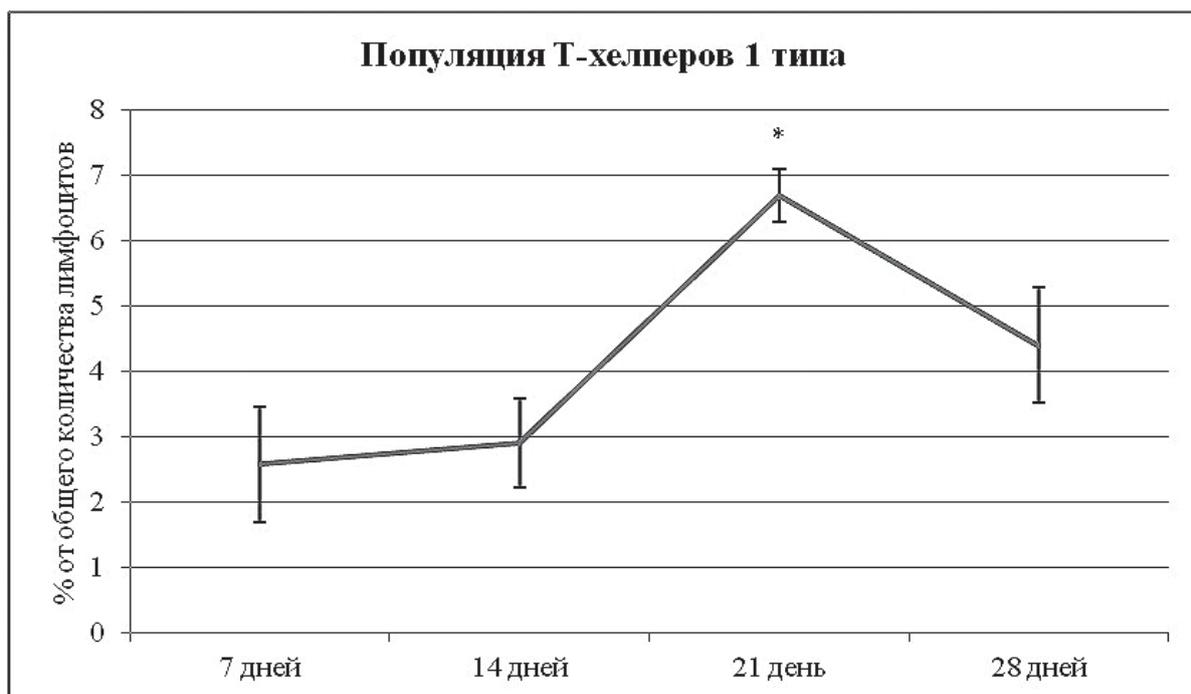


Рисунок 1. Изменение концентрации зрелых Т-хелперов первого типа (фенотип CD4\_CD195) в селезенке мышей.

\* -  $p < 0,05$  относительно показателей на 7 сутки.

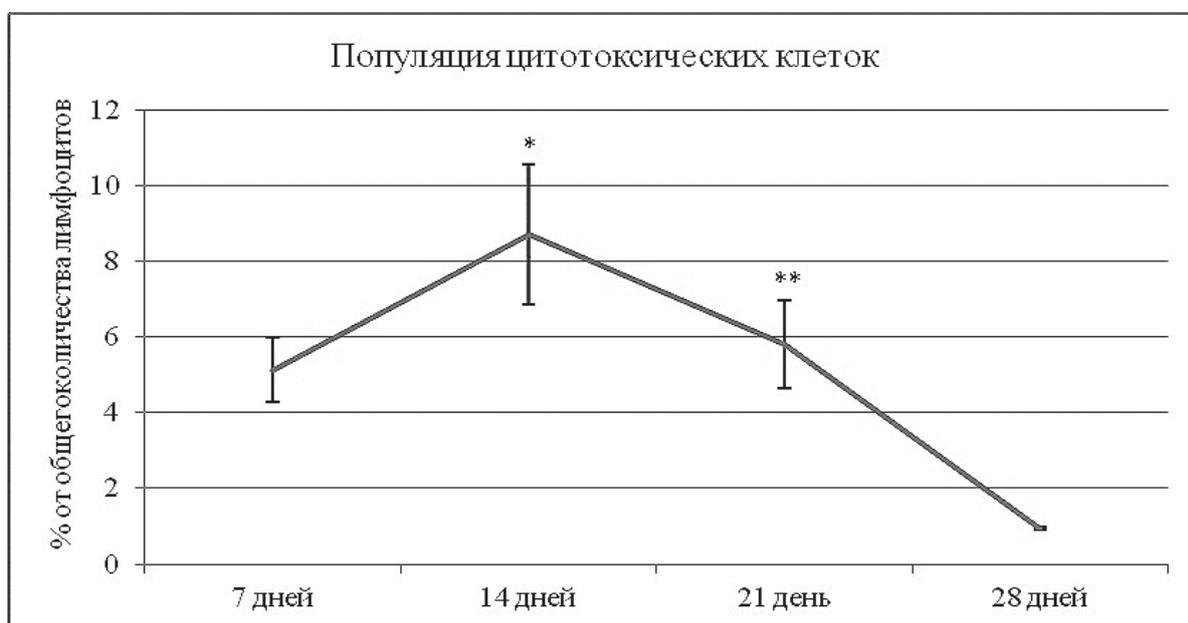


Рисунок 2. Изменение концентрации цитотоксических Т-лимфоцитов (фенотип CD3\_CD8) в селезенке мышей после однократной вакцинации.

\* -  $p < 0,05$  относительно показателей на 7 сутки;

\*\* -  $p < 0,05$  относительно показателей на 14 сутки

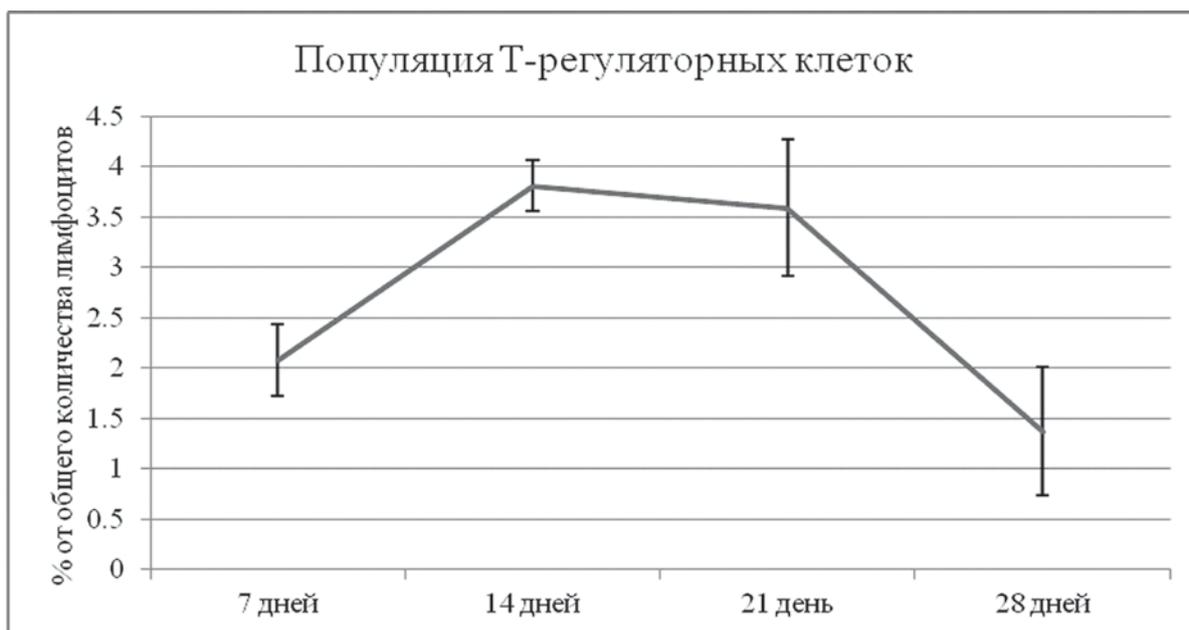


Рисунок 3. Изменение концентрации популяции **регуляторных Т-лимфоцитов** (фенотип CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) в селезенке мышей после однократной вакцинации.

Исходя из приведенных данных можно сделать вывод, что введение комбинации вирусного белка E7 с HSP 70 вызывает активную стимуляцию клеточного звена иммунного ответа у мышей.

#### Литература:

1. Галицкая М.Г., Намазова-Баранова Л.С., Ткаченко Н.Е., Гайворонская А.Г. Вакцинация против папилломавирусной инфекции: безопасное решение глобальной проблемы. Педиатрическая фармакология. 2011 г., Том 8., № 4
2. Li L.L., Wang H.R., Zhou Z.Y., Luo J., Wang X.L., Xiao X.Q., Zhou Y.B., Zeng Y. C3-Luc Cells Are an Excellent Model for Evaluation of Cellular Immunity following HPV16L1 Vaccination. PLoS One. 2016 Feb 22;1
3. Allen CT, Clavijo PE, Van Waes C, Chen Z. Anti-Tumor Immunity in Head and Neck Cancer: Understanding the Evidence, How Tumors Escape and Immunotherapeutic Approaches. Cancers (Basel). 2015 Dec 9;7(4):2397-414
4. Buckley N., Huber A., Lo Y., Castle P.E., Kemal K., Burk R.D., Strickler H.D., Einstein M.H., Young M., Anastos K., Herold B.C., Am J. Association of High-Risk Human Papillomavirus with Genital Tract Mucosal Immune Factors in HIV-Infected Women. Reprod Immunol. 2016 Feb;75(2):146-54
5. Koskimaa H.M., Paaso A., Welters M.J., Grønman S., Syrjänen K., van der Burg S.H., Syrjänen S. J., Human papillomavirus 16-specific cell-mediated immunity in children born to mothers with incident cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and to those constantly HPV negative. Transl Med. 2015 Nov 25;13(1):370

## УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ БОРРЕЛИОЗОМ, ХРОНИЧЕСКИМ ПРИОБРЕТЕННЫМ ТОКСОПЛАЗМОЗОМ И ИХ СОЧЕТАНИЕ

Курлаева Л.В., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б., Кальгина Г.А., Григорьева С.А.,  
Фадеева Н.В.

*ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, Тюмень*

### **Аннотация:**

В статье представлен анализ продукции цитокинов у пациентов с хронической формой иксодового клещевого боррелиоза, хроническим приобретенным токсоплазмозом и сочетанием этих болезней у 40 пациентов. Выявлены количественные изменения и соотношение ключевых цитокинов гуморального и клеточного типов иммунного ответа при этих заболеваниях.

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), или болезнь Лайма – трансмиссивное, инфекционное заболевание, занимающее по широте распространения одно из ведущих мест среди природно-очаговых заболеваний. Заболевание характеризуется разнообразием клинических проявлений с поражением различных органов и систем (кожи, сердца, сосудов, поджелудочной железы, печени, нервной системы, опорно-двигательного аппарата и др.) [1]. Часто протекает в латентной форме, с тенденцией к рецидивам и хроническому течению, растянутому на месяцы и годы. Нередко приводит к длительной утрате трудоспособности или инвалидизации больного.

Возбудители ИКБ – боррелии, относящиеся к комплексу *Borrelia burgdorferi sensu lato*, объединяющему 12 геновидов этих спирохет [2]. В настоящее время патогенность для человека доказана для трех геновидов боррелий: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi sensu stricto* [3]. Переносчиками боррелий являются клещи рода *Ixodes*. В России основное эпидемическое значение имеют *I. persulcatus* и *I. ricinus* [3, 4]. Зараженность иксодовых клещей боррелиями в разных биотопах и регионах РФ составляет от 10 до 60%; в Северо-Западных районах страны она еще выше. Болезнь Лайма в нашей стране впервые была серологически верифицирована в 1985 г., в 1991 г. включена в официальный перечень нозологических форм, встречающихся в России.) [5].

Тюменская область России является активным природным очагом ИКБ.

Токсоплазмоз–системное паразитарное заболевание, характеризующееся большим разнообразием клинических проявлений и отсутствием характерных симптомов. Он относится к инфекционным заболеваниям и вызывается внутриклеточным паразитом класса простейшие - *Toxoplasma gondii*. [6,7].

Нозоареалы иксодового клещевого боррелиоза и токсоплазмоза на значительном их протяжении совпадают, что создает предпосылки для возникновения микстзаболеваний среди населения. Важная роль при оценке состояния здоровья людей зараженных боррелиями, токсоплазмами, а так же при сочетании к этих инфекций отведена оценке иммунного ответа.

При попадании возбудителя в различные органы и ткани происходит активное раздражение иммунной системы, что приводит к генерализованному и местному гуморальному и клеточному гипериммунному ответу. На этой стадии заболевания идет выработка антител IgM, а затем IgG. При более длительном присутствии иммуногена (отсутствие лечения) повышается уровень циркулирующих иммунных комплексов. Скопление иммунных комплексов в пораженных тканях, привлекает нейтрофилы, последние вырабатывают различные медиаторы воспаления, биологически активные вещества и ферменты, вызывающие воспалительные и дистрофические изменения в тканях и активируют фагоцитоз. Например, при ИКБ клеточный иммунный ответ формируется по мере прогрессирования заболевания, при этом наибольшая реактивность мононуклеарных клеток проявляется в тканях «мишенях». Повышается уровень Т-хелперов и Т-цитокинических клеток. Установлено, что степень изменения клеточного звена иммунной системы зависит от тяжести течения заболевания. Ведущую роль в патогенезе поражения соединительной ткани несут липосахариды, входящие в состав боррелий, которые стимулируют секрецию интерлейкина-1 клетками моноцитарно-макрофагального ряда, некоторыми Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами

и др. Интерлейкин-1 в свою очередь стимулирует секрецию простагландинов, активирует воспаление в тканях. Существенное значение имеют процессы, связанные с накоплением специфических иммунных комплексов, содержащих антигены спирохет, в синовиальной оболочке суставов, дерме, почках, миокарде.

При первично-латентном токсоплазмозе, для которого характерно отсутствие ухудшения качества жизни при персистенции возбудителя, наблюдается определенный баланс Th1- и Th2-типов иммунного ответа [8]. Известно, что при токсоплазмозе нарушение баланса происходит при снижении концентрации ИФН- $\gamma$ . Снижение уровня ИФН- $\gamma$  приводит к нарушению «токсоплазмцидной» функции макрофагов, трансформации специфических Th0-клеток в Th1-клетки, что ведет к усилению цитолиза клеток, инфицированных токсоплазмами. Поступающие во внеклеточное пространство паразиты частично лизируются специфическими антителами в присутствии комплемента. Часть возбудителей подвергается фагоцитозу, носящему незавершенный характер. Внутри клетки возбудитель образует собственную оболочку, угнетает антигенпрезентирующую функцию и тем самым создает условия для своего сохранения, так как даже в случае лизиса клетки он остается живым. Этот процесс поддерживается за счет хронического недостатка ИФН- $\gamma$ .

Важными показателями при оценке состояния иммунной системы являются цитокины. Они представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма. Важную роль цитокины играют в регуляции дифференцировки и функциональной активности лимфоцитов[9].

Недостаточность и противоречивость сведений о развитии иммунного ответа при сочетании иксодового клещевого боррелиоза и хронического приобретенного токсоплазмоза послужили основанием для проведения исследований системы цитокинов в сыворотке крови у больных с хронической формой ИКБ, ХПТ и при сочетании этих инфекций.

Цель работы состояла в сравнении уровня хемокина и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-8, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4) у больных с вышеперечисленными патологиями.

#### **Материалы и методы.**

Материалом исследования служила сыворотка пациентов ТНИИКИП сероположительных по ИКБ и ХПТ, а также сыворотка пациентов, у которых были выявлены обе формы заболевания. Содержание цитокинов в сыворотке крови определяли методом твердофазного ИФА с использованием тест систем ЗАО «Вектор-БЕСТ» (г. Новосибирск). Под наблюдением находилось 40 пациентов, из них 9 человек с иксодовым клещевым боррелиозом, 23 человека с хроническим приобретенным токсоплазмозом и 8 человек с сочетанием этих патологий. Все обследованные лица – до начала лечения. Средний возраст пациентов составил 50 лет. В контрольную группу вошли здоровые люди г. Тюмени.

#### **Результаты и обсуждение**

В большей степени у обследованных больных (ИКБ, ХПТ и сочетании этих патологий) варьировала концентрация хемокина (ИЛ-8). Хемокины усиливают направленную миграцию лейкоцитов в очаг воспаления и вместе с другими цитокинами увеличивают их функциональную активность: фагоцитоз и продукцию кислородных радикалов, направленную на элиминацию патогена. У пациентов с хронической формой ИКБ этот показатель составил  $103 \pm 6,8$  пг/мл, это достоверно ( $p < 0,01$ ) выше, чем в группе сравнения ( $30 \pm 2,2$  пг/мл), у пациентов с ХПТ –  $123 \pm 8,2$  пг/мл ( $p < 0,001$ ), у пациентов с сочетанием этих инфекций –  $146 \pm 8,4$  пг/мл ( $p < 0,001$ ). Это свидетельствует о том, что более выражена продукция хемокинов у больных с микстпатологией.

При анализе уровня ИФН- $\gamma$  нами выявлено, что уровень этого цитокина, при ИКБ ( $28 \pm 4,2$  пг/мл) и ХПТ ( $20 \pm 2,8$  пг/мл) приблизительно остается на уровне здоровых людей ( $25 \pm 2,8$  пг/мл.). У больных с микстпатологией, наблюдается снижение продукции этого цитокина и составляет  $18 \pm 1,8$  пг/мл.

Содержание ИЛ-4 в сыворотке крови больных хронической фазой иксодового клещевого боррелиоза равно  $45 \pm 3,9$  пг/мл (против  $20 \pm 0,8$  пг/мл. у здоровых людей) и достоверно превышает нормальный показатель более чем в два раза. Уровень того же цитокина у больных ХПТ достиг  $49 \pm 14,3$  пг/мл., что значительно выше показателей в контрольной группе. При сочетании

двух этих инфекций, наблюдается незначительное снижение уровня ИЛ-4 ( $37 \pm 6,1$ ) по сравнению с уровнем в группах с моноинфекциями, но превышает уровень показателя в контрольной группе. Концентрация исследуемых цитокинов представлена в гистограмме «Уровень цитокинов у больных хроническим боррелиозом, хроническим приобретенным токсоплазмозом и их сочетании» (рис.1.).

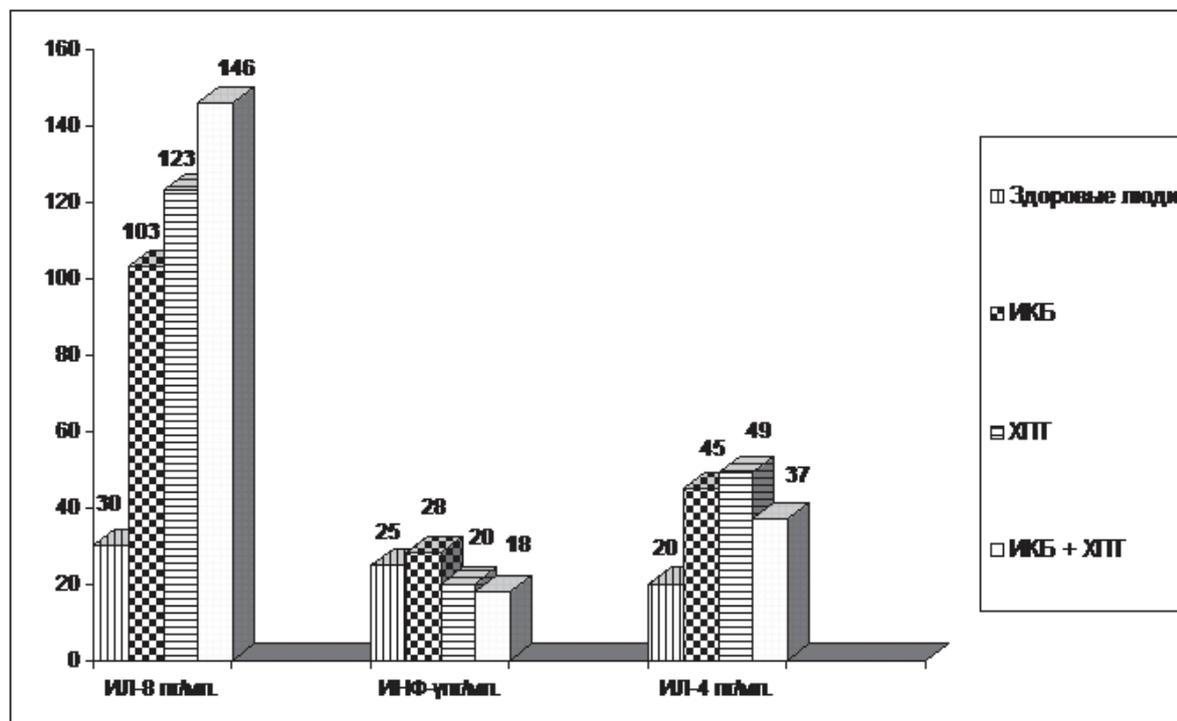


Рис.1. Уровень цитокинов у больных хроническим боррелиозом, хроническим приобретенным токсоплазмозом и их сочетании.

Таким образом, наши исследования выявили преобладание концентрации ИЛ-4, являющегося ключевым в развитии th-2 типа иммунного ответа. Уровень ИНФ- $\gamma$  у больных ИКБ имеет тенденцию к повышению, это свидетельствует о преобладании гуморального типа иммунного ответа. Во всех исследуемых группах наблюдается достоверное увеличение концентрации хемокина ИЛ-8, в большей степени у лиц с микстзаболеванием (в 5 раз). Можно предположить развитие дисбаланса в цитокиновой системе у людей с микстпатологией.

#### Литература:

1. Бактериальные болезни: Учебное пособие / Под ред. Н. Д. Ющука. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 976 с.
2. Postic D., Assous M.V., Grimont P.A., Baranton G. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1994. V. 44. P. 743–752.
3. Wang G., Van Dam A.P., Schwartz I., Dankert J. // J. Clin. Microbiol. 1999. V. 12. P. 633–653.
4. Lyme Borreliosis and Tick-Borne Encephalitis // Eds. Oschmann P., Kraiczy P. et al. Germany, Bremen, 1999.
5. Селиванов Е.В. Иксодовый клещевой боррелиоз // Вестник «Лаборатории ДНК – Диагностики». 2012. №1(14). С.18-26.
6. Буланьков Ю.И., Никитин А.Ф., Васильев В.В., Соловьев А.И. Классификация токсоплазмоза// Вопросы инфекционной патологии: Сб. научн. трудов, посвящ. 80-летию каф. инфекционных болезней.- СПб., 1998.-С.121-126.
7. Боброва О.В. Особенности патогенеза токсоплазменной инфекции//Международный медицинский журнал. 2009. №3. – С. 129-134.

8. Бейф Т.В. Персистенция как важный биологический признак оппортунистических патогенов протозойной природы//Матер. Всерос.науч.конф.»Клинические перспективы в инфектологии»-СПб., 2001.-С.20-29.

9. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции//Цитокины и воспаление. 2004. №2. С.16-22.

## **ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ НА АДГЕЗИВНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК С *CANDIDA ALBICANS* IN VITRO**

**Лукова О.А., Заславская М.И.**

*ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, Нижний Новгород*

Кандидоз слизистых оболочек начинается с адгезии грибов рода *Candida* на поверхности эпителиальных клеток [1, 2]. Возможность последующего закрепления и размножения патогена зависит от вирулентности штамма, а также от уровня резистентности слизистых оболочек [3, 4, 5]. Антимикробная устойчивость слизистых определяется многими факторами, в частности, функциональной активностью эпителиоцитов, которая способна меняться под действием различных стимулов [6, 7].

Целью настоящей работы было определение способности цитокинов регулировать адгезивные реакции эпителиоцитов слизистых оболочек с *Candida albicans*.

Культуру *C. albicans* штамм 601 из коллекции кафедры микробиологии и иммунологии НижГМА получали в дрожжевой фазе после инкубации (24ч, 37°C) на агаре Сабура (HiMedia Laboratory, India). Посевы смывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР, рН 7,2-7,4), трижды отмывали десятикратным объемом ЗФР (1000г, 15 мин) и ресуспендировали в концентрации 107 кл/мл в ЗФР.

Клетки буккального и вагинального эпителия получали от здоровых женщин 25-36 лет путем соскоба с внутренней поверхности ротовой или вагинальной полости соответственно. Эпителиальные клетки трижды отмывали от слизистого секрета ЗФР (40г, 5 мин), готовили взвесь с концентрацией 106 кл/мл.

Концентрацию клеток микромицетов и эпителиоцитов определяли путем измерения оптической плотности суспензии на денситометре DEN-1 (ООО «Biosan», Латвия). В эксперименте эпителиоциты обрабатывали цитокинами (“Sigma”, USA) в течение 30 мин при 37°C. В работе использовали интерлейкин-1 (IL-1) – 10-12 г/мл, интерлейкин-6 (IL-6) -10-12 г/мл, интерлейкин-8 (IL-8) – 10-12 г/мл, фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) – 10-9 г/мл и  $\alpha$ -интерферон человека (INF $\alpha$ ) – 10-9 г/мл. В контроле использовали эпителиальные клетки, не подвергавшиеся воздействию гормонов. Каждая серия экспериментов проводилась на эпителиоцитах, полученных от 5 доноров.

Проводили искусственную колонизацию *C. albicans* на клетках эпителия, для чего взвесь эпителиоцитов инкубировали (30 мин, 37°C) в равных объемах с клетками кандид. Эпителиоциты отмывали от несвязавшихся кандид, из осадка эпителиальных клеток готовили мазки, которые, после фиксации метанолом окрашивали 0,25% водным раствором азура А (“Sigma”, USA). Подсчитывали количество кандид, закрепившихся на одном эпителиоците, рассчитывали средний показатель (канд/эпит) после световой микроскопии 100 эпителиальных клеток.

Определение жизнеспособности эпителиальных клеток до и после обработки цитокинами проводили на проточном цитофлюориметре BD FACS Canto II System with Fluidics Cart (6-color, blue/red, США). Для этого, к 100 мкл эпителиоцитов добавляли 20 мкл красителя 7AAD (7-Amino Actinomycin D), инкубировали 15 минут. Учитывали количество клеток с поврежденными мембранами (мертвые) и способными, в отличие от живых, окрашиваться 7AAD [8].

Статистическую обработку данных проводили по общепринятой методике. Рассчитывали среднюю арифметическую и ее стандартную ошибку ( $M \pm m$ ). Достоверность различий оценива-

ли при помощи критериев Вилкоксона-Манна-Уитни. Различия расценивали как статистически значимые при  $p < 0,05$ .

Процент жизнеспособных эпителиоцитов в контроле и среди клеток, подвергавшихся воздействию гормонов или цитокинов, был сходным и составлял 62-77%.

Было проведено сравнение действия некоторых провоспалительных цитокинов: интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-8) – 10-12 г/мл, фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) и  $\alpha$ -интерферон человека (INF $\alpha$ ) на возможность эпителиоцитов слизистых оболочек ротовой полости вступать в адгезивные контакты с *C.albicans* in vitro. Преинкубация эпителиальных клеток с IL-1, IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$  - повышала адгезию *C.albicans* на эпителиоцитах в  $1,3 \pm 0,1$ ,  $1,2 \pm 0,06$ ,  $1,8 \pm 0,5$  и  $2,0 \pm 0,2$  раз соответственно по сравнению с контролем ( $p=0,033$ ,  $p=0,046$ ,  $p=0,025$ ,  $p=0,017$ ). В то же время, обработка эпителиоцитов INF $\alpha$  приводила к снижению адгезии на них кандид в  $2,1 \pm 0,3$  раза ( $p=0,012$ ) Результаты представлены в таблице 1.

Таким образом, эксперименты показали, что патологические процессы, протекающие на уровне слизистых оболочек и сопровождаемые синтезом большого количества цитокинов [9], участвующих в развитии воспалительной реакции: IL-1, IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$  - способны увеличивать риск развития кандидоза. В то же время, цитокины с опосредованной антимикробной активностью (INF $\alpha$ ) способствуют снижению контаминации эпителиоцитов *C. albicans*.

Литература:

Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В.. Кандидоз. М: Триада-Х, 2001. 472 с.

1. Williams D.W., Jordan R. P. C., Wei X., Alves C.T., Wise M. P, Wilson M.J., Lewis M.A.O. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces J. Oral. Microbiol. 2013. Vol. 5. N. 10. P. 340-358.

2. Cannon R.D., Holmes A.R., Mason A.B., Monk B.C. Oral candida: clearance, colonization, or candidiasis? J. Dent. Res. 1995. Vol. 74. N.5. P.1152-1161.

3. Naglik J.R., Moyes D.L., Wдchtler B., Hube B. Candida albicans interactions with epithelial cells and mucosal immunity. Microbes Infect. 2011. N. 13. P. 963-976.

4. Ueta E., Tanida T., Doi S., Osaki T. Regulation of Candida albicans growth and adhesion by saliva. J. Lab. Clin. Med. 2000. Vol. 136. N 1. P. 66-73.

5. Маянский Н.А., Абаджиди М.А., Маянская И.В., Заславская М.И., Махрова Т.В. Реактивность буккальных эпителиоцитов: индикация местных и общих нарушений гомеостаза // Клиническая лабораторная диагностика. 2004. № 8. С. 31-34.

6. Ochiel D.O., Fahey J.V., Ghosh M., Haddad S.N., Wira C.R. Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: Role of Sex Hormones in Regulating Uterine Epithelial Cell Protection Against Pathogens. Curr Womens Health Rev. 2008. Vol.4. N. 2. P.102-117.

7. Perfetto S.P., Chattopadhyay P.K., Lamoreaux L., Nguyen R., Ambrozak D., Koup R.A., Roederer M. Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. J. Immunol. Methods. 2006. Vol. 313. N. 1-2. P. 199-208.

8. Серебренникова С.Н., Семинский И.Ж. Роль цитокинов в воспалительном процессе. Сибирский медицинский журнал, 2008. № 8. С. 5-8.

## **ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТОЧНЫХ ФАКТОРОВ НА АДГЕЗИВНУЮ АКТИВНОСТЬ CANDIDA ALBICANS В РЕАКЦИЯХ С БУККАЛЬНЫМИ ЭПИТЕЛИОЦИТАМИ**

**Махрова Т.В.**

*ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, Нижний Новгород*

Воспаление является обязательным атрибутом кандидоза [1]. Поэтому сывороточный эксудат, представляя неотъемлемый компонент кандидозного процесса, может существенно влиять на его развитие, включая адгезивные реакции кандид в системах с эпителием.

Гуморальные факторы, принимающие участие в воспалении, включают антитела, компле-

мент и другие элементы, способствующие или препятствующие реакции [2,3]. Это определило круг задач, связанных с изучением влияния гуморальных факторов сыворотки на адгезию кандид в реакциях с буккальным эпителием.

#### **Материалы и методы исследований**

В работе использовали штамм *C. albicans* 601 из коллекций кафедры микробиологии и иммунологии НГМА. Культуру *C. albicans* получали в дрожжевой фазе на агаре Сабуро (НИИ по изготовлению питательных сред, г. Махачкала) (24 ч, 37°C). Посевы смывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР), отмывали десятикратным объемом, удаляли клеточные агрегаты центрифугированием (40 g, 2 мин) и ресуспендировали в ЗФР в концентрации  $10^7$  клеток/мл. Концентрацию кандид определяли методом спектрофотометрии при  $\lambda=540$  нм.

Клетки буккального эпителия получали от здоровых, не курящих доноров 18-20 лет, утром, натощак, с внутренней поверхности щеки, дважды отмывали ЗФР (40 g, 5 мин) и готовили взвесь с концентрацией  $10^6$  кл/мл.

Оценку адгезии в системе «*C. albicans* - буккальные эпителиоциты» проводили следующим образом: равные объемы (по 0,5 мл) взвеси эпителиоцитов и кандид инкубировали в течение 30 мин при 37°C в растворе Хенкса без фенолового красного, встряхивая каждые 5 мин. Эпителиоциты трехкратно отмывали ЗФР от не прикрепившихся кандид (40g, 5 мин). Из осадка клеток готовили мазок, который после фиксации этанол-эфирной смесью окрашивали 0,25% раствором азура А. Определяли индекс адгезии, т.е. среднее количество кандид в пересчете на один эпителиоцит (учитывали 100 клеток).

Для изучения влияния сыворотки крови на адгезию *C. albicans* к буккальным клеткам к осадку кандид ( $10^7$  клеток) добавляли 0,5 мл свежего пула сыворотки от 10-15 доноров, инкубировали при 37°C, 30 мин, отмывали десятикратным объемом ЗФР и после инкубации с буккальными эпителиоцитами оценивали результат.

В ряде опытов для удаления антител сыворотку истощали микробной взвесью под контролем РЭМА в режиме, исключающем активацию комплемента. Для этого 0,5 мл сыворотки инкубировали 30 мин при 4°C с центрифугатом микробных клеток (109 клеток) и после центрифугирования (4000g, 20 мин) использовали в опытах.

Изучение влияния комплемента на адгезивные реакции кандид проводили с истощенной сывороткой, в которую добавляли ингибиторы, полностью выключавшие комплемент (0,01 М этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)) или влиявшие на его альтернативный путь (0,01 М  $MgCl_2$  - 0,01М этиленгликольтетраацетат (ЭГТА)). Об активности комплемента в истощенной сыворотке судили по опсонической активности в отношении зимозана (Sigma, США), стандартного стимулятора альтернативного каскада комплемента [4]. Зимозан в концентрации 0,4 мг/мл инкубировали (37°C, 30 мин) в равных объемах с цельной и истощенной кандидами сывороткой. Опсонический эффект оценивали по люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов человека [5]. К 1 мл нейтрофилов ( $5 \cdot 10^5$ /мл), содержащему  $5 \cdot 10^{-5}$  М люминола ("Chemapol", Чехия), добавляли 0,1 мл опсонизированного зимозана; в контроле вместо стимулятора использовали раствор Хенкса. Измерение ХЛ проводили на жидкостно-стинцилляционном счетчике «Бета-2». Каждый опыт ставили в трех повторах, учитывая средний результат (имп/мин) на пике хемилюминесценции.

При изучении влияния нормального иммуноглобулина человека на адгезию кандид использовали коммерческий препарат иммуноглобулина человека («ИМБИО», Н.Новгород) в разведении 1:10. Определение влияния иммуноглобулина на адгезию в системе с буккальными клетками проводили аналогично экспериментам с цельной сывороткой.

Истошающая концентрация кандид для коммерческого препарата иммуноглобулина человека была подобрана в серии предварительных опытов. В работе использовали 0,5 мл иммуноглобулина в разведении 1:10 и кандиды в концентрации  $10^9$  клеток.

Для удаления нековалентно-связанных компонентов кандиды ( $10^7$  кл/мл) после инкубации с исследуемыми субстратами, трижды отмывали десятикратным объемом ЗФР, смешивали в равных объемах (0,5 мл) с 0,1% водным раствором додецилсульфата натрия (ДДС) [6,7] при постоянном перемешивании (комнатная температура, 10 мин) на термомиксере, затем отмывали и ресуспендировали в ЗФР. Контролем служили интактные кандиды, обработанные ДДС. Для удаления

несвязанных компонентов с поверхности эпителиоцитов ( $10^6$  кл/мл) использовали аналогичный режим обработки.

### Результаты и обсуждение

Проведено изучение пула нормальной сыворотки от 10-15 взрослых доноров. В целом, полученные данные подтвердили то, что у практически здоровых людей имеются антикандидозные антитела, которые улавливаются иммуноферментной реакцией. Специфичность результатов была доказана опытами с сывороткой, истощенной в течение 30 минут при  $37^\circ\text{C}$ , и в условиях, исключающих активацию комплемента ( $4^\circ\text{C}$ , 30 мин). После обработки в каждом из этих режимов показатели со всеми конъюгатами (анти-IgG, IgA, IgM) были на уровне негативного контроля ( $p = 0,135$ ).

Пул свежей сыворотки вызывал снижение адгезии кандид в 2,7- 4,5 раз ( $3,6 \pm 0,18$ ). В процентном отношении остаточный уровень адгезивной активности составлял  $28,9 \pm 1,6$  %.

Для определения вклада антител в общий антиадгезивный эффект, сыворотку истощали микробной взвесью *S. albicans* в концентрации  $10^9$  кл/мл, 30 мин,  $4^\circ\text{C}$  (режим, исключавший активацию комплемента). После обработки кандид истощенным препаратом наблюдали снижение адгезивного эффекта в 1,6-2,4 раз ( $2,0 \pm 0,1$ ;  $p < 0,05$ ). Пул цельной сыворотки обладал более выраженным антиадгезивным эффектом (снижение адгезии кандид в  $3,6 \pm 0,18$  раз). Это говорит о том, что антитела вносят существенный вклад во взаимоотношения кандид с буккальными клетками, отвечая примерно за 22 % антиадгезивного эффекта.

Около 78% антиадгезивного эффекта приходилось на факторы, не имеющие отношения к антителам. Для изучения природы этих факторов проводили сравнительную обработку кандид при  $37^\circ\text{C}$  и при  $4^\circ\text{C}$  сывороткой, истощенной по антителам (при  $4^\circ\text{C}$ ), отмывали, добавляли буккальные клетки и продолжали инкубацию при  $37^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Параллельно такие же операции проводили с цельной сывороткой.

Антиадгезивный эффект истощенной сыворотки при  $4^\circ\text{C}$  был минимальным –  $12,3 \pm 1,4$  %, против  $55,8 \pm 2,2$  % при  $37^\circ\text{C}$  ( $p = 0,002$ ). Для цельной сыворотки те же показатели были гораздо выше:  $54,6 \pm 2,7$  % ( $4^\circ\text{C}$ ) и  $73,5 \pm 1,4$  % ( $37^\circ\text{C}$ ) ( $p < 0,005$ ).

Это говорило о том, что в сыворотке имеются температурозависимые факторы, которые отрицательно влияют на адгезию кандид к буккальным клеткам. Для определения механизмов их действия, кандиды, преинкубированные при  $37^\circ\text{C}$  с истощенной сывороткой, обрабатывали в режиме, обеспечивающем десорбцию нековалентно связанных компонентов -- раствор 0,1 % додецилсульфата натрия. Данная обработка не устраняла антиадгезивный эффект истощенной сыворотки. Это говорило о том, что в сыворотке содержатся факторы, действие которых на кандиды проявляется, во-первых, только при  $37^\circ\text{C}$  и, во-вторых, не экранировано нековалентно связанными молекулами.

Можно было думать, что такой эффект оказывают факторы системы комплемента, которые (C4b, C3b) в процессе активации подвергаются ковалентному связыванию с объектами. Для изучения активности комплемента в пуле сывороток здоровых доноров использовали стандартный стимулятор – зимозан, который инкубировали 30 мин при  $37^\circ\text{C}$  в равных объемах с цельной и истощенной кандидами сыворотками.

Результаты, свидетельствуют о том, что сыворотка, истощенная кандидами ( $4^\circ\text{C}$ , 30 мин), сохраняла активность комплемента. Об этом говорила ее равноценная ( $p = 0,137$ ) по сравнению с цельным сывороточным пулом опсоническая активность по отношению к зимозану.

При изучении влияния комплемента на адгезивную активность проведены опыты с пулами сыворотки, истощенной кандидами ( $4^\circ\text{C}$ , 30 мин). Для исключения влияния классического или альтернативного каскадов комплемента в инкубационную смесь добавляли 0,01 М ЭДТА или сочетание 0,01 М  $\text{MgCl}_2$  – ЭГТА. Установлено, что комплемент не влиял на адгезивную активность кандид. Это позволило предположить, что температурозависимые факторы сыворотки, которые по нашим данным структурно модифицируют кандидозные адгезины, не имеют отношения к системе комплемента. Можно было думать, что речь идет о других факторах, которые влияют на поверхностные компоненты кандид. В этом отношении они похожи на продукты секрета ротовой полости.

Таким образом, нормальная сыворотка крови обладает двумя группами факторов, тормозящих взаимодействие кандид с буккальными клетками. К первой из них относятся антитела, с которыми связано около 20% антиадгезивного эффекта (по отношению к *C.albicans* 601). Другая часть представлена температурозависимыми факторами, которые не связаны с компонентами системы комплемента. Предположительно речь идет о факторах ферментной природы, способных вызывать структурные изменения в поверхностных адгезинах кандид.

Литература:

1. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев. - Триада - X., - 2003 г.- 472 с.
2. Francois L. Mayer, Duncan Wilson, and Bernhard Hube. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms Virulence. - 2013 Feb 15;4(2):119-28 [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
3. Xiurong Ding, Zhizhong Liu, Jianrong Su, and Donghui Yan. Human serum inhibits adhesion and biofilm formation in *Candida albicans*. BMC Microbiol. - 2014 Mar 28; [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
4. Jacob, H. S. Complement-induced granulocyte aggregation/ H.S.Jacob, P.R. Craddock, D.E. Hammerschmidt / N. Engl. J. Med.-1980.- Vol.302, №14.- P.769-794.
5. Лебедева, Ю.В. Реактивность нейтрофилов в системах с пептидогликанами различных видов стафилококка / Ю.В. Лебедева, Д.Г. Астафьев, А.Н. Маянский / Журн. микробиол. - 1989. - № 6.- С.57-61.
6. Kozel, T. R. Activation and binding of C3 by *Candida albicans* / T. R. Kozel, R. R. Brown, G. S. Pfrommer // Infect. Immun. -1987. - Vol. 55. -P.1890-1894.
7. Kozel, T. R. Distinct characteristics of initiation of the classical and alternative complement pathways by *Candida albicans* / T. R. Kozel., L. C. Weinhold, D. M. Lupan / Infect. Immun. -1996. -Vol. 64. -P. 3360-3368.

## ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЛЕПТОСПИРОЗОМ

**Петрова О.А., Стоянова Н.А., Любимова Н.Е.**

*ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург*

### **Введение**

Лептоспирозы - зооантропонозная инфекция, протекающая в виде острого лихорадочного заболевания, характеризующаяся признаками капилляротоксикоза, выраженной интоксикацией, развитием геморрагического синдрома. Лептоспироз относится к категории наиболее распространенных и тяжело протекающих зоонозов [5, 9]. Возбудителями являются бактерии рода лептоспир (*Leptospira*), входящие в семейство спирохет (*Spirochaetaceae*). В настоящее время идентифицировано более 250 серовариантов патогенных лептоспир [2, 15].

В ряде случаев лептоспироз у человека протекает в легкой форме, сопровождаясь неспецифическими симптомами (лихорадка, боль в мышцах и головная боль), однако у 10-15% больных развивается тяжелая форма, которая часто быстро прогрессирует и может привести к летальному исходу. Разнообразие клинических проявлений лептоспирозов и отсутствие патогномичных симптомов болезни приводят к поздней диагностике, нерациональному лечению, что является одной из причин высокой летальности при этой инфекции, достигающей на некоторых территориях Российской Федерации 20% [2, 4].

Патогенез лептоспирозов на данный момент мало изучен. Лептоспиры обладают множеством механизмов, которые позволяют им «ускользнуть» от иммунной системы хозяина и вызывать ин-

фекцию [3]. Toll-подобные рецепторы (TLR) являются основными «датчиками» вторжения патогенных микроорганизмов [7]. Установлено, что липополисахарид лептоспир взаимодействует с TLR2, а не с TLR4 (в отличие от большинства грамотрицательных бактерий). Неспособность комплекса TLR2/TLR4 на поверхности клеток моноцитарно-макрофагального ряда человека распознавать липополисахарид лептоспир рассматривается как одна из возможных предпосылок высокой восприимчивости человека к лептоспирозной инфекции и более тяжёлого её течения [3, 10, 18].

Изменения в иммунной системе являются важным звеном в патогенезе лептоспирозов, особую роль при этом отводят цитокинам. Предполагается, что тяжесть и исход лептоспирозной инфекции зависит от вида продуцируемых цитокинов и от их концентрации. Широко обсуждается наличие связи между высокими уровнями TNF- $\alpha$  и риском развития серьёзных кровотечений и летальных исходов. Соотношение IL-10/TNF- $\alpha$  рассматривают как ранний биомаркер тяжести течения болезни. Однако работ по изучению роли цитокинов в иммунопатогенезе лептоспирозов немного и часто их результаты являются противоречивыми [15, 16, 17].

### **Цель работы**

Изучить содержание некоторых про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных лептоспирозом в динамике инфекционного процесса для углубления знаний об иммунопатогенезе данного заболевания.

### **Материалы и методы**

Нами было обследовано 50 пациентов больных лептоспирозом (с подтверждённым диагнозом - у всех больных обнаружены специфические антитела к лептоспирам с помощью реакции микроагглютинации проводимой по стандартной методике) [6]. От данных пациентов было получено 86 сывороток, из них 24 сыворотки для оценки динамики продукции цитокинов по трём точкам (1-7 день болезни, 8-14 и 15-21 день болезни). У 34 больных (68,6%) возбудителем являлась *L. icterohaemorrhagiae*, у 13 (25,6%) - *L. canicola*, у 3 пациентов (5,8%) - *L. grippotyphosa*. У большинства пациентов лептоспироз протекал в тяжёлой форме. В опытную группу вошли лица от 21 до 83 лет (18% женщин, 82% мужчин), средний возраст составил  $44,0 \pm 14,1$  года. Контрольную группу составили 14 практически здоровых людей (группа сопоставима с исследуемой группой по возрасту и полу). Все сыворотки хранили при температуре  $-80^\circ\text{C}$  и размораживали однократно для проведения исследования. Во всех сыворотках крови определяли уровень 9 цитокинов.

Для анализа на мультиплексном анализаторе “MagPix” (“Millipore”, США), основанном на технологии xMAP компании Luminex (США) с использованием магнитных частиц “Milliplex Mag”, была выбрана панель из 9 аналитов. В исследуемую панель вошли следующие цитокины: TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-8, IL-4, IL-6, IL-10, IL-1Ra, IL-12(p70), IFN- $\gamma$ . Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ MS Excel, Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Для описания полученных результатов использовали стандартные методы непараметрической статистики, так как распределение наших данных не соответствовало законам распределения Гаусса (тест Shapiro-Wilk,  $p \leq 0,002$  для всех исследуемых аналитов).

### **Результаты и обсуждение**

В ходе нашего исследования выявлены достоверно повышенные уровни IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) в группе больных лептоспирозом по сравнению с контрольной группой, что подтверждают литературные данные [4, 14], причём сведения о высоком содержании MCP-1 выявлены впервые. Повышенное содержание провоспалительных цитокинов является необходимым для контроля инфекции, однако, их избыток вызывает повреждение тканей, что является, в частности одной из причин развития диссеминированного внутрисосудистого свёртывания при лептоспирозе.

В ходе исследования мы наблюдали, что высокие значения MCP-1 встречались в основном у лиц с иктерогеморрагическим лептоспирозом при тяжёлом течении заболевания.

Повышение уровня хемокина MCP-1 связано с распознаванием цитотоксических белков лептоспир рецептором TLR2 на поверхности эпителиальных клеток. В нашем исследовании максимальные значения данного хемокина наблюдались у пациентов с лептоспирозом вызванным

*L. icterohaemorrhagiae* при тяжёлом течении болезни, что может свидетельствовать о большом количестве цитотоксических белков у данного сероварианта возбудителя.

Наблюдая за динамикой цитокинов при лептоспирозе, мы пришли к выводу, что уровень большинства провоспалительных цитокинов увеличивается к 3 неделе болезни при снижении концентрации IL-10 и IL-1Ra (противовоспалительных цитокинов), что совпадает с развитием поздних осложнений болезни и свидетельствует о незавершённости процесса воспаления.

В результате исследования нами не установлены гендерные различия в уровне цитокинов, а также не найдено корреляции между возрастом пациента и продукции цитокинов при лептоспирозе.

Проведён корреляционный анализ полученных результатов содержания цитокинов в сыворотке крови, выявлены корреляционные связи между TNF- $\alpha$  и MCP-1 ( $r=0,51$ ;  $p=0,02$ ), TNF- $\alpha$  и IL-1Ra ( $r=0,49$ ;  $p=0,03$ ), такие же по направленности, но более сильные связи были обнаружены и в группе контроля ( $r=0,69$  для обоих случаев;  $p=0,04$  и  $p=0,01$ , соответственно). Так же в основной группе была выявлена корреляционная связь между IL-12(p70) и IFN- $\gamma$  ( $r=0,55$ ;  $p=0,01$ ) нехарактерная для группы контроля.

#### **Выводы**

Получены новые данные о содержании цитокинов у больных лептоспирозом и у практически здоровых лиц. Нашим исследованием подтверждены достоверно повышенные уровни IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- $\alpha$  у больных лептоспирозом по сравнению с практически здоровыми донорами.

Увеличение уровня провоспалительных цитокинов к 3 неделе болезни на фоне низких концентраций противовоспалительных цитокинов играет важную роль в развитии поздних осложнений при лептоспирозе.

Необходимо проводить новые, обширные исследования о взаимодействии цитокинов и механизмах иммунопатогенеза лептоспирозов при различной тяжести течения заболевания и при различных серовариантах возбудителя, а также в динамике заболевания.

#### **Литература:**

1. Ананьина Ю.В. Лептоспирозы в Российской Федерации: современные особенности эпидемического проявления природных и техногенных очагов. Ветеринарная патология. 2004, № 4: 54–57.
2. Ананьина Ю.В. Лептоспирозы людей и животных: тенденции распространения и проблемы профилактики. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, №2(51): 13-16.
3. Ваганова А.Н. Наружная мембрана патогенных представителей рода *Leptospira*. Инфекция и иммунитет. 2011, Т. 1, № 1: 29–42
4. Городин В.Н. Патогенетическое обоснование и оптимизация интенсивной терапии тяжелых форм лептоспироза. Автореф. дисс. ...доктора мед. наук. Ростов-на-Дону. 2007: 42 с.
5. Лебедев В.В., Авдеева М.Г., Шубич М.Г. Иктерогеморрагический лептоспироз. Краснодар. 2001: 208 с.
6. Методические указания 3.1.1128-02. Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний лептоспирозами. Минздрав России. Москва. 2002: 44 с.
7. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. М., Мир. 2000: 592 с.
8. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции. Цитокины и воспаление. 2004, №2.
9. Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Ваганова А.Н. Лептоспирозы. пособие для врачей. Санкт-Петербург. 2010: 116 с.
10. Chassin C., Picardeau M., Goujon J.M. et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. J. Immunol. 2009, Vol.183, № 4: 2669–2677.
11. Chirathaworn C., Kongpan S. Immune responses to *Leptospira* infection: roles as biomarkers for disease severity. The Brazilian Journal of infection diseases. 2014, 18 (1): 77–81
12. De Fost M., Hartskeerl RA, Groenendijk MR, et al. Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with *Leptospira interrogans*. Clin Diagn Lab Immunol. 2003, 10: 332-335.

13. De Fost M., Chierakul W., Limpiboon R, et al. Release of granzymes and chemokines in Thai patients with leptospirosis. Clin Microbiol Infect. 2007, 13: 433–436.
14. Fialho RN, Martins L., Pinheiro JP, et al. Role of human leukocyte antigen, killer-cell immunoglobulin-like receptors, and cytokine gene polymorphisms in leptospirosis. Hum Immunol. 2009, 70: 915–920.
15. Kyriakidis I., Samara P., Papa A., et al. Serum TNF-alpha, sTNFR1, IL-6, IL-8 and IL-10 levels in Weil's syndrome. Cytokine. 2011, 54: 117–120.
16. Tajiki H., Salomao R. Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. Clin Infect Dis. 1996, 23:1177–1178.
17. Tajiki H., Salomao R. The ratio of plasma levels of IL-10/TNF-alpha and its relationship to disease severity and survival in patients with leptospirosis. Braz J Infect Dis. 1997, 1:138–141.
18. Wang H., Wu Y., Ojcius DM, et al. Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through Toll-like receptor2-and 4-mediated JNK and NF-kappaB signaling pathways. PLoS One. 2012, 7: e42266.

## ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ БРУЦЕЛЛЕЗОМ

**Саркисян Н.С., Ковалевич Н.И., Галяс В.А., Пономаренко Д.Г.**  
*ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора,  
Ставрополь*

**Введение.** В патогенезе бактериальных инфекций важнейшая роль отводится токсико – аллергическим процессам, которые на фоне изменения иммунологической реактивности организма могут инициировать нарушение функции системы гемостаза, повреждение эндотелиоцитов сосудистого русла, способствуя более тяжелому течению инфекционного процесса, формированию осложнений [1, 2, 3].

В доступной литературе имеются единичные сведения о реакции системы гемостаза при бруцеллезе, касающиеся в основном хронической формы болезни [4, 5, 6, 7], при этом данные об изменении гемоциркуляции, характеристик свертывающей - антисвертывающей системы при остром бруцеллезе имеют фрагментарный характер [8].

Многообразие клинических проявлений бруцеллеза свидетельствует о болезни как о системной патологии [4, 9]. В патогенезе бруцеллеза большое значение имеет интенсивность эндотоксикоза и системное воспаление, при этом в патологический процесс вовлекаются практически все органы и системы: костно-суставная, сердечно-сосудистая, мочеполовая, нервная, эндокринная [9]. При бруцеллезе описаны случаи тромбоцитопенической пурпуры, узловатой эритемы, тромбоцитарной микроангиопатии, которые сопровождаются соответствующими морфологическими изменениями [4].

При проведении интенсивной терапии острого бруцеллеза основное внимание уделяется этиотропному лечению и детоксикации, при этом коррекции нарушений гемостаза не уделялось должного внимания, что крайне непредусмотрительно, особенно в условиях побочного влияния интенсивной антибактериальной терапии. Это, по нашему мнению, обусловлено отсутствием сведений о реагировании гемостатической системы организма при остром бруцеллезе или их низкой информативностью.

**Цель исследования** - изучить особенности изменения показателей системы гемостаза у больных острым бруцеллезом.

**Материалы и методы.** В связи с поставленной целью был исследован биоматериал от 40 больных острым бруцеллезом. Пациенты поступили с клиническими проявлениями бруцеллеза в МБУЗ «Городская клиническая больница № 2» г. Ставрополя - отделение по диагностике, лечению и экспертной профпатологии бруцеллеза. Больными было подписано информационное согласие для проведения исследований. Диагноз устанавливался на основании регламентирован-

ных клинико-лабораторных, инструментальных и специальных методов исследования. Форма бруцеллезной инфекции определялась в соответствии с общеизвестными критериями и классификацией Г.П. Руднева (1966) [9].

Преаналитический этап лабораторных исследований проводили в соответствии с существующими приказами и рекомендациями МЗ РФ по контролю качества лабораторных исследований. Материалом для исследования служила венозная кровь, взятая из кубитальной вены до приема пищи. Забор венозной крови осуществляли с применением специальных одноразовых вакуумных систем «Vacutainer» с цитратом натрия 3,2 % (0,109 M) для исследования системы гемостаза, что гарантировало правильное соотношение антикоагулянта и исследуемого образца. Интервал времени между взятием образца крови из вены, транспортировкой и подготовкой к исследованию системы гемостаза не превышал 4 часов. Для получения цитратной плазмы, богатой тромбоцитами, образцы центрифугировали в течение 5 минут при 1500 g. Исследуемые показатели анализировали на автоматическом анализаторе гемостаза STA Compact (Roche Diagnostics, Stago), позволяющем, выполнять клоттинговые, хромогенные и иммунохимические тесты с использованием коммерческих наборов (Diagnostica Stago).

Оценивали показатели внешнего и внутреннего пути свертывания: протромбиновый индекс (ПТИ), протромбиновое время (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), международное нормализованное отношение (МНО), фибриноген, тромбиновое время (ТВ). Расчет протромбинового отношения по Квику был произведен по общепринятой формуле. Ортофенантролиновым тестом было проведено исследование растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), (Россия, г. Барнаул, «Технология Стандарт»). В качестве контроля для сравнения результатов исследования были взяты референсные интервалы анализируемых показателей (Табл. 1.)

Таблица 1.

Показатели гемостазиограммы у больных острым бруцеллезом

Показатели гемостазиограммы	Показатели гемостазиограммы у больных острым бруцеллезом (n=40)	Референсные интервалы
ПТИ, %	89,95 ± 0,91	95-105
Протромбиновое отношение по Квику, %	91,28±2,05	70-120
Протромбиновое время, сек.	14,06±0,16	12,7- 14,6
МНО, у.е.	1,18 ± 0,01.	1,0-1,1
Фибриноген, г/л	5,30 ± 0,51	2-4
РФМК, мг/100 мл	5,55± 0,78	3,38-4,5
Тромбиновое время, сек.	15,58±0,09	16-21
АЧТВ, сек.	33,06±0,81	25-40

Обеззараживание исследуемого материала осуществляли в соответствии СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)».

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий Стьюдента, при уровне достоверности  $P \geq 0,95$ .

**Результаты и обсуждение.** В ходе исследования уровня фибриногена у больных острым бруцеллезом при поступлении в отделение выявлено повышение данного показателя  $5,30 \pm 0,51$  г/л, относительно референсных значений, что указывает на повышенную вязкость крови, но ее свертывание *in vitro* не ускоряется [3], следовательно, возрастает риск развития тромбозов и ише-

мии органов и тканей. Повышение концентрации фибриногена - белка острой фазы воспаления характерно для острофазной воспалительной реакции [6].

У больных острым бруцеллезом выявлено снижение ПТИ в среднем до  $89,95 \pm 0,91\%$ , повышение МНО до  $1,18 \pm 0,01$ . Установленные изменения мы связываем с дефицитом факторов внешнего пути активации свертывания или наличием их ингибиторов.

Анализ полученных результатов выявил у больных острым бруцеллезом укорочение тромбинового времени –  $15,58 \pm 0,09$  сек., что указывает на нарушение этапа превращения фибриногена в фибрин, зависящего в основном от количества фибриногена и ингибиторов фибринообразования. Анализируемые показатели такие как, АЧТВ, ПВ и протромбиновое отношение по Квику оставались в пределах нормы.

Определение РФМК, составило в среднем  $5,55 \pm 0,78$  мг/мл, что превышает референсный интервал, указывая на активацию свертывания крови. Данные паракоагуляционного теста указывают на наличие тромбинемии.

**Заключение.** Результаты проведенного исследования свидетельствуют о формировании выраженных нарушений в системе гемостаза у больных острым бруцеллезом, которые проявляются снижением свертывающей и повышением фибринолитической активности крови.

Таким образом, установлена вероятность зависимости основных клинических симптомов от состояния коагуляционного звена гемостаза, что обосновывает более глубокое изучение состояния этой биологической системы. Несмотря на то, что с точки зрения патогенеза инфекционного процесса данную реакцию можно расценить как защитную и направленную против инфицированной клетки-хозяина, выявленные патологические изменения способствуют ослаблению барьерных свойств эндотелия, что может сопровождаться более глубокими нарушениями в системе гемостаза.

Полученные в ходе исследования результаты позволяют рекомендовать включение в схему обследования больных острым бруцеллезом гемостазиологические исследования. Наличие у обследованных пациентов выявленных нарушений в системе гемостаза, при проведении динамических наблюдений позволит выделить некоторые диагностические маркеры, определяющие тяжесть течения и прогноз развития бруцеллеза.

#### Литература:

1. Баркаган З. С. Гематология и трансфузиология. - 1991. - N 1. - С. 22.
2. Полякова А. М. Роль тромбоцитарного звена гемостаза в генезе гемокоагуляционных нарушений у больных бактериальными инфекциями: Автореф. дис. докт. мед.наук. - М., 2000. - С. 38.
3. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство. - Т. 1. Под ред. В.В. Долгова, В. В. Меньшикова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 928 с.
4. Токаева А. З. Состояние системы гемостаза у больных бруцеллезом: автореф. дис... канд. мед. наук / А. З. Токаева. - Алматы, 2004. - 30 с.
5. Решетников А. А. Подходы к лечению хронического неактивного бруцеллеза на основе оценки состояния агрегации тромбоцитов и реологических свойств крови / А. А. Решетников, А. А. Шульдяков, Е. В. Андронов, Е. П. Ляпина // Фундаментальные исследования.- 2011. - № 10 - С. 370-374.
6. Шульдяков А. А. Хронический бруцеллез: функциональные особенности периферической сосудистой и нервной систем / А. А. Шульдяков, Ю. Н. Линькова, Г. А. Коршунова, Е. П. Ляпина, А. А. Решетников // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И. И. Мечникова. - 2007. - № 3. - С. 139-143.
7. Janeczko J. Blood clotting system in chronic brucellosis. Przegl Epidemiol. 1975; 29 (2):195-9.
8. Turunc T, Demiroglu Y. Z., Kizilkilic E, Aliskan H, Boga C, Arslan H. J. A case of disseminated intravascular coagulation caused by Brucella melitensis. Thromb. Thrombolysis. 2008. - 26 (1). - P. 71-3.
9. Руднев Г. П. Клиника особо опасных инфекций. Изд. Медицина, М., 1966. - 296 с.

## ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ИММУННОМ СТАТУСЕ У БОЛЬНЫХ БРУЦЕЛЛЕЗОМ С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ ЛИМФОЦИТ-ЗАВИСИМОЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ

Саркисян Н.С., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Костюченко М.В.  
*ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь*

**Введение.** Основу патогенеза некоторых инфекционных болезней составляет иммуноаллергическая перестройка, обуславливающая формирование клонов специфически сенсibilизированных лимфоцитов и антител [1, 2].

Одной из таких инфекций является бруцеллез - зоонозная инфекционно-аллергическая болезнь, протекающая с преимущественным поражением опорно-двигательного аппарата, сердечно-сосудистой, нервной систем, склонная к рецидивам, обострениям и хронизации процесса [1, 3].

Патогенетические и клинические особенности бруцеллезной инфекции взаимообусловлены рядом факторов. В острой стадии бруцеллеза наряду с инфекционно-токсическими процессами начинают проявляться инфекционно-аллергические реакции. Аллергическая перестройка организма в этот период является, по-видимому, обязательным условием острого течения болезни. По мере нарастания сенсibilизации болезнь переходит в подострую и хроническую стадии [1, 4].

Несмотря на длительную историю изучения бруцеллеза, вопросы обусловленности и связи уровня сенсibilизации организма антигенами бруцелл с патофизиологическими изменениями в иммунном статусе у больных бруцеллезом остаются не до конца изученными. Вероятно, основной причиной, по которой данный иммунологический аспект патофизиологии бруцеллеза в достаточной мере не изучен, является дефицит объективных клинико-лабораторных подходов к количественной оценке степени гиперчувствительности к возбудителю бруцеллеза у больных.

**Цель исследований** - изучить особенности патофизиологических изменений в иммунном статусе у больных бруцеллезом с различной степенью лимфоцит-зависимой специфической сенсibilизации.

**Материалы и методы.** Объектом исследования послужил клинический материал от 127 человек с лабораторно подтвержденным диагнозом – «Острый бруцеллез», поступивших в отделение по диагностике, лечению и экспертной профпатологии бруцеллеза ГБУЗ СК «Городская клиническая больница № 2», г. Ставрополя. Контрольную группу составили 35 человек, не имеющих в анамнезе симптомов аллергии, не переболевших бруцеллезом и не вакцинированных против этой инфекции. Отбор и рандомизацию больных бруцеллезом по группам производили в соответствии с индивидуальными регистрационными картами больных (истории болезни), с учетом классификации клинических форм бруцеллеза по Г.П. Рудневу [5]. Все больные острым бруцеллезом имели среднюю степень тяжести течения болезни, в фазе компенсации. Больных хроническим бруцеллезом исследовали в период их планового обследования. Все обследуемые дали информированное согласие на участие в настоящих исследованиях.

Наличие и степень клеточно-опосредованной сенсibilизации изучали в реакции бласт-трансформации лимфоцитов (РБТЛ), (Фримель Г., 1987) со специфическим антигеном. Учет РБТЛ осуществляли в соответствии с разработанным нами способом, который заключался в детекции бласт-трансформированных клеток и лимфобластов с помощью моноклональных антител к рецептору гемопоэтических клеток – CD 34 (Beckman Coulter, США). Количество бласт-трансформированных лимфоцитов учитывали в проточно-цитометрическом анализе образца [6].

Методом проточной цитометрии изучали клеточное звено иммунитета с использованием моноклональных антител Beckman Coulter (США). Определяли факторы естественной резистентности (фагоцитарную и функциональную активность нейтрофилов крови). В сыворотке крови исследовали уровень общих иммуноглобулинов А, М, G методом радиальной иммунной диффузии с моноспецифическими сыворотками (НПО «Микроген»), активность комплемента определяли по 50 % гемолизу эритроцитов барана, концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) выявляли с помощью фотоколориметрии в реакции с ПЭГ-6000. Обеззараживание

исследуемого материала от больных бруцеллезом людей осуществляли в соответствии с СП 1.3.3118 – 13 "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)" [7]. Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием программы Statistica 6.0. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий Стьюдента, при уровне достоверности  $P \geq 0,95$ .

**Результаты и обсуждение.** В результате оценки степени специфической клеточно-опосредованной (лимфоцит-зависимой) сенсibilизации больные острым бруцеллезом были рандомизированы на 3 группы. Обследуемые с низкой степенью специфической сенсibilизации – от 2 до 8 %, составили группу №1 ( $n = 57$ ), 2 группу сформировали больные бруцеллезом со средней (умеренной) степенью специфической клеточно-опосредованной сенсibilизацией – 9 - 15% ( $n = 43$ ), 3 группу составили 27 больных с высокой степенью специфической сенсibilизации – более 15 %.

У больных со средней степенью клеточно-опосредованной специфической сенсibilизации выявлено повышение относительного количества Т-лимфоцитов –  $75,32 \pm 1,31$  %, ( $p \leq 0,05$ ), Т-хелперов –  $36,34 \pm 0,50$  %, ( $p \leq 0,001$ ), натуральных киллеров  $16,92 \pm 1,20$  %, ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с данными первой группы –  $60,87 \pm 1,25$  %,  $30,1 \pm 0,38$  %,  $8,19 \pm 0,21$  %, соответственно. У больных 2 группы установлено повышение фагоцитарной активности нейтрофилов –  $78,0 \pm 0,42$  %, ( $p \leq 0,001$ ) и их функциональной активности –  $12,46 \pm 0,14$  %, ( $p \leq 0,05$ ), в сравнении со значениями группы № 1 –  $55,5 \pm 0,22$  %,  $4,02 \pm 1,3$  %, соответственно. Отмечали снижение относительного содержания CD19+ лимфоцитов –  $7,79 \pm 0,91$  %, ( $p \leq 0,05$ ), иммунорегуляторного индекса –  $1,16 \pm 0,04$  у.е., ( $p \leq 0,001$ ), уровня IgM –  $1,24 \pm 0,08$ %, ( $p \leq 0,001$ ), (в группе № 1,  $19,17 \pm 1,32$  %;  $1,56 \pm 0,05$  у.е.,  $2,45 \pm 0,14$  мг/мл). Выявлено повышение уровня IgA –  $3,71 \pm 0,29$  мг/мл, ( $p \leq 0,001$ ), IgG –  $13,87 \pm 0,87$  мг/мл ( $p \leq 0,05$ ), циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) –  $35,62 \pm 0,27$  ЕД, ( $p \leq 0,001$ ) и комплементарной активности сыворотки крови –  $48,33 \pm 1,77$  ЕД, ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с данными первой группы –  $2,02 \pm 0,24$  мг/мл,  $7,24 \pm 0,92$  мг/мл,  $12,3 \pm 1,02$  ЕД и  $29,23 \pm 1,25$  ЕД.

При оценке основных показателей иммунного статуса больных бруцеллезом с высокой степенью лимфоцит-опосредованной специфической сенсibilизацией выявленная тенденция в целом имела сходный характер относительно обследованных 2 группы. Однако у больных 3 группы имелись некоторые особенности, которые выражались в повышении относительного содержания, CD3+ лимфоцитов –  $81,4 \pm 1,67$  %, ( $p \leq 0,05$ ), Т – хелперов –  $45,54 \pm 0,69$  %, ( $p \leq 0,001$ ), по сравнению с контролем –  $60,87 \pm 1,25$  %,  $30,1 \pm 0,38$  %, соответственно. У больных с высоким уровнем клеточно-опосредованной специфической сенсibilизации отмечали снижение уровня IgM –  $1,06 \pm 0,09$  мг/мл, ( $p \leq 0,001$ ), повышение концентрации ЦИК –  $41,74 \pm 0,22$  Ед и комплементарной активности сыворотки крови –  $53,61 \pm 1,71$  ЕД, ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с данными первой группы  $12,3 \pm 1,02$  ЕД и  $29,23 \pm 1,25$  ЕД.

Таким образом, у больных бруцеллезом выявлена определенная зависимость степени интенсивности клеточно-опосредованной сенсibilизации и изменений в иммунном статусе. При этом изменения в иммунном статусе, имеющие негативную (патологическую) тенденцию, установлены у обследуемых с низкой степенью лимфоцит-зависимой сенсibilизации. Так, у больных первой группы наблюдали снижение уровня Т-лимфоцитов, субпопуляций Т-хелперов и Т-цитотоксических. На фоне изменений показателей клеточного иммунитета обнаружено снижение уровня общего IgG, фагоцитарной активности нейтрофилов крови.

У больных бруцеллезом со средней степенью клеточно-опосредованной сенсibilизации выявлены компенсаторные изменения показателей иммунного статуса в рамках референтных пределов. Так, в сравнении с данными первой группы у обследуемых данной группы наблюдали повышенные уровни Т-лимфоцитов, Т-цитотоксических, естественных киллеров, фагоцитарной и функциональной активности нейтрофилов, концентрации ЦИК и комплементарной активности. На фоне резкого повышения уровня IgA, в среднем до  $3,71 \pm 0,29$  мг/мл, наблюдали снижение CD19+ клеток.

У больных бруцеллезом с высокой степенью клеточно-опосредованной сенсibilизации изменения показателей иммунного статуса были в целом сходны с данными у больных 2 группы.

При этом, у этих пациентов выявлено выраженное повышение уровня CD3+ и CD3+ CD4+- лимфоцитов, концентрации общего IgA, ЦИК и комплементарной активности сыворотки крови.

Полученные знания об интенсивности клеточно-опосредованной специфической сенсбилизации у больных бруцеллезом, как этиологическом факторе обуславливающим формирование патофизиологических изменений в иммунном статусе, раскрывают ее патогенетическую роль при инфекции.

Литература:

1. Вершилова, П. А. Патогенез и иммунология бруцеллеза / П. А. Вершилова, М. И. Чернышова, Э. Н. Князева. - М.: Медицина, 1974. - 272 с.
2. Базанов, Г. А. Аллергия и аллергические заболевания / Г. А. Базанов, А. А. Михайленко. - М.: Изд. МИА, 2009. – 304 с.
3. Санникова, И. В. Эволюция эпидемиологии и клиники бруцеллеза в Ставропольском крае / И. В. Санникова, О. Г. Голубь [и др.] // Сб. VI Российского съезда врачей инфекционистов. - СПб, 2003. - С. 308.
4. Курманова, Г. М. Оценка иммунного статуса и дифференцированная иммунокоррекция при бруцеллезе: методические рекомендации / Г. М. Курманова, А. К. Дуйсенова, К. Б. Курманова, Н. Х. Спиричева. - Алматы, 2002. - 30 с.
5. Руднев Г.П. Клиника особо опасных инфекций. Изд. Медицина, М., 1966. - 296 с.
6. Пономаренко, Д. Г. Применение технологии антигенной стимуляции клеток для диагностики бруцеллеза / Д. Г. Пономаренко, Е. Л. Ракитина, О. В. Логвиненко, Н. С. Саркисян, М. В. Костюченко, Н. И. Ковалевич // Italian Science Review. - 2014. - Vol. 1 (10). P. - 178-181.
7. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 // Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. – М., 2013.

## **ЭКСПРЕССИЯ РЕПРЕССОРА ТРАНСКРИПЦИИ VCL-6 В ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ**

**Талаева М.В., Воронина Е.В., Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е.**  
*ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород*

Ядерный фактор транскрипции Vcl-6 играет ключевую роль в развитии В-клеток зародышевых центров и фолликулярных Т-хелперов. Его экспрессия наблюдается при пролиферации этих В-клеток и необходима для соматических гипермутаций в антигенраспознающем домене и рекомбинаций в иммуноглобулиновом локусе. В результате, Vcl-6 защищает В-клетку от апоптоза во время перестраивания ДНК при переключении изотипов Ig и созревании аффинитета антител. Vcl-6 в В-клетках зародышевых центров подавляет активность огромного количества генов. Его основной мишенью является ВLIMP-1 – регулятор дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки. Сам белок ВLIMP-1 подавляет пролиферацию и блокирует передачу сигнала через иммуноглобулиновый рецептор, индуцирующую соматические гипермутации, переключение изотипов атител и другие процессы, связанные с созреванием В-клеток. Белки Vcl-6 и ВLIMP-1 подавляют экспрессию друг друга, образуя регуляторный механизм с отрицательной обратной связью. Таким образом, экспрессия Vcl-6 у В-лимфоцитов необходима для промежуточного этапа созревания – формирования В-клеток зародышевых центров и В-клеток памяти, поддержания их пролиферации и выживания на этапе активной перестройки ДНК, тогда как экспрессия ВLIMP-1 необходима для терминальной дифференцировки плазмоцитов, функция которых – мощная продукция антител. Так же было показано, что экспрессия Vcl-6 критически необходима для созревания Т-фолликулярных хелперов – особой субпопуляции Т-лимфоцитов, необходимых

для развития Т-зависимого гуморального ответа, причем Vcl-6 был признан мастер-регулятором данной субпопуляции [1,2,3].

Гораздо меньше известно о функции Vcl-6 в других типах клеток. Недавно этот фактор был обнаружен в дендритных клетках (ДК) миелоидного происхождения [4], в которых, по косвенным данным, он играет важную физиологическую роль [5]. Так, различия экспрессии Vcl-6 в субпопуляциях ДК демонстрируют высокую степень консерватизма: из 700 генов, дифференциально изменяющих экспрессию в субпопуляциях ДК, лишь 84 гена меняют свою экспрессию сходным образом у человека и мыши. В состав этих 84 генов входят лишь 7 ядерных факторов, два из которых – Vcl-6 и его антагонист BLIMP-1. Также роль Vcl-6 подтверждают эксперименты с нокаутом соотв. гена, который приводит к дефекту развития отдельных субпопуляций ДК [5]. На основании аналогий с В-клетками и результатов экспериментов разные авторы видят роль Vcl-6 в обеспечении выживаемости ДК [4], развитии незрелых ДК из предшественников и поддержании их пролиферации [6] или дифференцировке отдельных субпопуляций ДК (Watchmaker P.V. et al., 2014). Тем не менее, проведение аналогий между ДК и В-лимфоцитами не может быть полностью корректными, так как физиология этих клеток сильно отличается друг от друга, и роль Vcl-6 в ДК требует дальнейшего изучения.

#### **Материалы и методы**

Для получения незрелых ДК (нДК) из проб стерильной гепаринизированной крови выделяли моноциты последовательным разделением на Nystopaque-1077 (Sigma, США) и адгезией на пластике 24-луночных планшет (Costar, США). Моноциты культивировали в среде RPMI-1640 с 10 % эмбриональной сыворотки, 20 нг/мл ИЛ-4 и 100 нг/мл ГМ-КСФ (R&D, США) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки инкубировали 7 суток при +37° С и 5 % CO<sub>2</sub>, повторно добавляя ГМ-КСФ и ИЛ-4 на третьи сутки культивирования. Через 7 суток среду в лунках заменяли на новую и добавляли стимуляторы созревания. Для получения зрелых ДК в культуры нДК добавляли коктейль цитокинов, состоящий из 25 нг/мл ИЛ-1β, 25 нг/мл ИЛ-6, 50 нг/мл ФНО-α и 1 мкг/мл простагландина E<sub>2</sub> на 48 ч. Также для стимуляции созревания использовали вакцины гепатита В (ВПГВ) и туберкулеза (БЦЖ) в концентрации 0,2 дозы/мл. Клетки, культивированные с ВПГВ, отделяли от вакцины центрифугированием над слоем 85% перколла (Sigma, США). Полученные ДК использовали для выделения РНК или проведения внеклеточного и внутриклеточного окрашивания для цитометрии.

РНК экстрагировали из проб, содержащих 10<sup>5</sup> ДК с помощью набора NucleoSpinRNA XS (Macherey-Nagel, Германия). Количество транскриптов гена *BCL6* оценивали в относительном количественном ПЦР в реальном времени на приборе Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, США). Для этого использовали наборы TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents kit и TaqMan gene expression assay reagents для гена *BCL6* (Applied Biosystems, США). нДК использовались как калибратор. Выравнивание графиков осуществлялось по нормировочному красителю. Значение Ct определяли, как максимум второй производной функции накопления ДНК. При обработке результатов использовали нормализацию по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства – β2-микроглобулина.

Для цитометрического анализа ДК окрашивали антителами к CD83, CD86 (eBioscience, США) и HLA-DR («Сорбент», Россия), конъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), фикоэритрином (PE). Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FacsCalibur (BD Biosciences, США). Полученные из моноцитов ДК гейтировали в соответствии с профилями прямого и бокового светорассеивания. Для определения экспрессии белка Vcl-6 после окрашивания поверхностных маркеров ДК фиксировали и их мембраны пермеабилizировали с помощью набора реагентов Fixation/Permeabilization Kit согласно рекомендациям производителя для окрашивания ядерных белков. После этого клетки окрашивали антителами к Vcl-6, конъюгированными с аллофикоцианином (APC) (eBioscience, США) и анализировали на лазерном проточном цитофлуориметре.

Результаты цитометрического анализа обрабатывали с помощью программного обеспечения CellQuest. Результаты ПЦР обрабатывали с помощью программного обеспечения прибора Stratagene Mx3005P. Статистический анализ проводили с использованием t-теста Стьюдента. Данные представлены как M±m.

## Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что полученные из моноцитов человеческие ДК, после стимуляции коктейлем цитокинов (ДК-ЦТК) или вакциной БЦЖ (ДК-БЦЖ), приобретали типичный фенотип и функциональные свойства зрелых ДК. При стимуляции ВППВ клетки приобретали фенотип полузрелых ДК, ограниченную способность стимулировать Т-лимфоциты к цитокинопродукции, но повышенную экспрессию костимулирующей молекулы ICOSL и хемокинового рецептора CXCR5 [7,8].

При исследовании ядерных факторов транскрипции в моноцитарных ДК была обнаружена экспрессия гена *BCL6*. Поскольку экспрессия этого гена в моноцитарных ДК человека ранее не была описана, мы провели работу для характеристики экспрессии гена и белка этого репрессора транскрипции в ДК, обработанных различными стимуляторами созревания. Данные по экспрессии гена *BCL6* приведены на рисунке 1. Показано, что уровень экспрессии гена *BCL6* в моноцитарных ДК незначительно варьирует в отдельных культурах ДК, созревших под действием разных стимуляторов. Однако усреднение значений, полученных в независимых экспериментах, нивелирует эти различия, и показатели количества мРНК *BCL6* в нДК и ДК, стимулированных коктейлем цитокинов или вакцинами, не различаются (Рис. 1.).

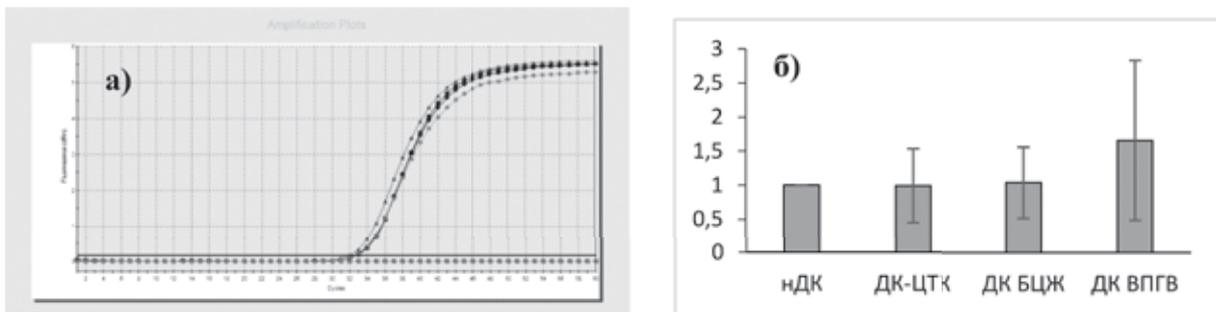


Рис. 1. Экспрессия гена *BCL6* в моноцитарных ДК. а): пример графика накопления ДНК в пробах нДК, ДК-ЦТК, ДК-БЦЖ и ДК-ВППВ. б): средние значения относительных показателей экспрессии *BCL6* в 4 независимых экспериментах.

Для исследования экспрессии белка *Bcl-6* мы использовали внутриядерное окрашивание в сочетании с поверхностным окрашиванием маркеров ДК. Многоцветный цитометрический анализ показал, что наличие *Bcl-6* в ДК не связано с уровнем экспрессии молекул HLA-DR и CD86 на этих клетках. Так же соотношение количества *Bcl-6*<sup>+</sup> и *Bcl-6*<sup>-</sup> клеток среди CD83<sup>+</sup> ДК существенно не отличалось от соотношения *Bcl-6*<sup>+</sup> и *Bcl-6*<sup>-</sup> клеток среди CD83<sup>-</sup> ДК (Рис. 2.).

Несмотря на однотипный характер экспрессии гена *BCL6* в различных исследованных типах ДК, мы выявили дифференциальную экспрессию белка *Bcl-6* в зависимости от условий созревания ДК. Показано, что белок *Bcl-6* стабильно синтезируется существенной долей нДК, тогда как его синтез в полностью зрелых ДК-ЦТК существенно ограничен, и доля *Bcl-6*<sup>+</sup> ДК-ЦТК не превышает 5%, несмотря на активный синтез мРНК (Рис. 3.). По-видимому, это связано с механизмами убиквитинирования белка *Bcl-6* и строгим ограничением срока жизни его РНК в зрелых ДК. Роль этих механизмов регуляции описана для *Bcl-6* в В-лимфоцитах [9]. Экспрессия *Bcl-6* в ДК, созревших под действием вакцин БЦЖ и ВППВ, была крайне нестабильна: высокие значения экспрессии наблюдались в одном из 4 экспериментов для ДК-БЦЖ и в одном из 4 экспериментов для ДК-ВППВ, тогда как в остальных экспериментах *Bcl-6* экспрессировали не более 5% ДК.

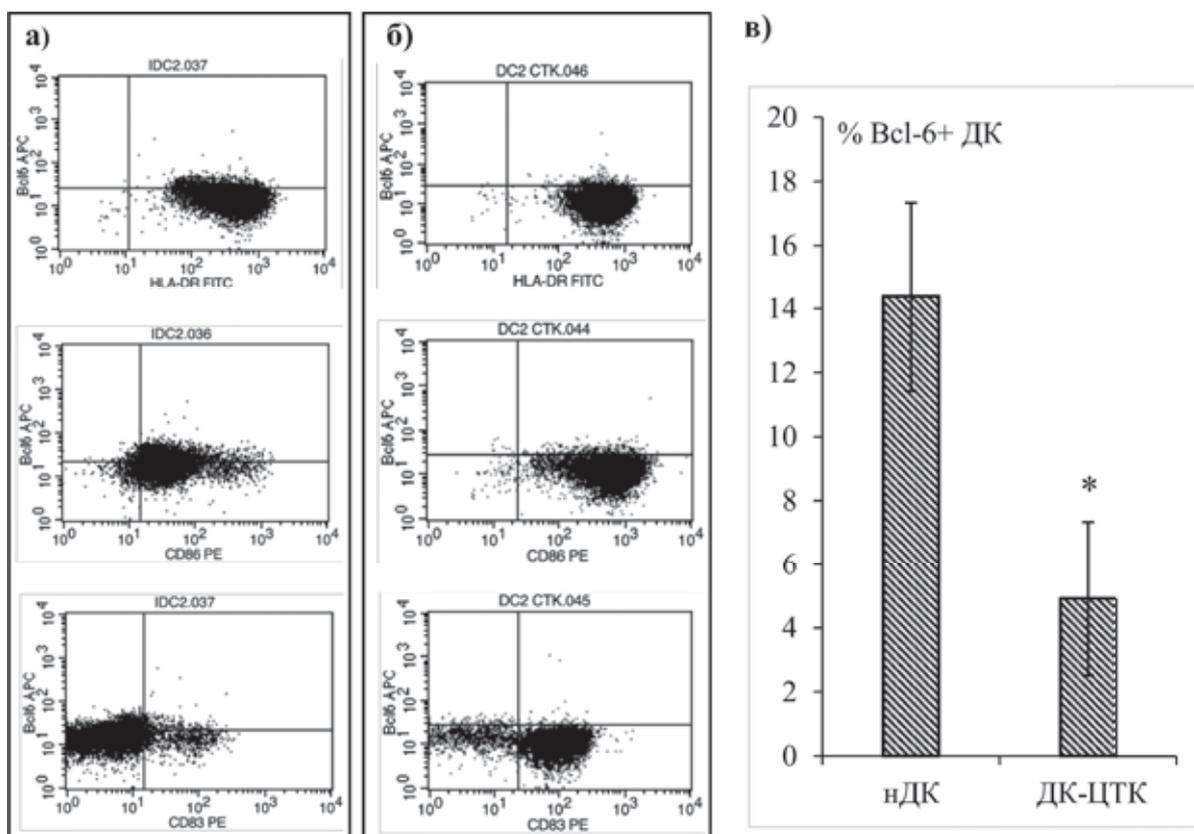


Рис. 2. Экспрессия белка Bcl-6: в нДК (а) и ДК-ЦТК (б) в зависимости от маркеров ДК (репрезентативный эксперимент). в): процент ДК, несущих Bcl-6 и созревающих под действием различных стимуляторов.

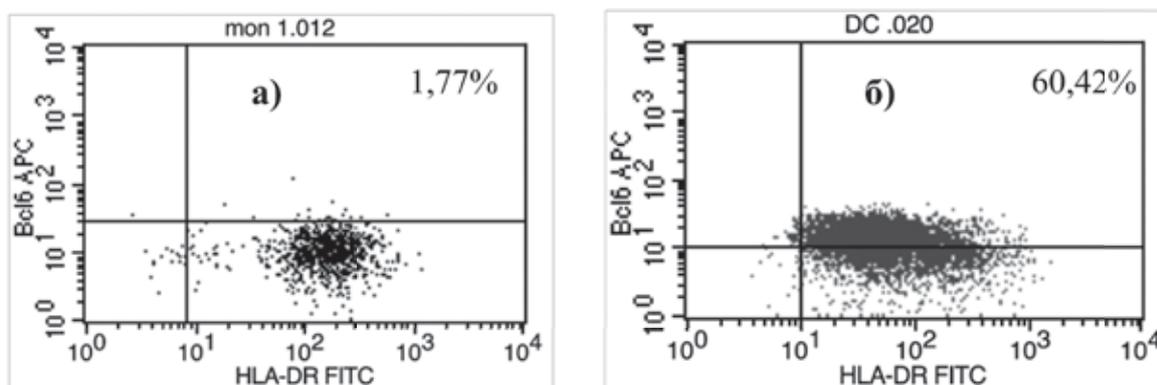


Рис. 3. Экспрессия белка Bcl-6 в моноцитах (а) и созревающих ДК (б), культивированных трие суток (репрезентативный эксперимент). Процент Bcl-6<sup>+</sup> ДК указан в соотв. квадранте графиков.

Падение экспрессии белка Bcl-6 при терминальном созревании ДК наводит на мысль о том, что у нДК экспрессия носит остаточный характер, а выраженная экспрессия и, соответственно, значимая функция наблюдается на ранних этапах развития ДК. Для подтверждения этой гипотезы мы сократили время созревания ДК из моноцитов с семи до трех суток. Контролем в этой модели послужили моноциты, к которым не были добавлены цитокины ГМ-КСФ и ИЛ-4. На третьи сутки экспрессия Bcl-6 в культуре моноцитов не была обнаружена, напротив в культуре ДК она резко возросла и составила более 60% от всех HLA-DR<sup>+</sup> клеток. Из рисунка 3 видно, что подавляющее количество Bcl-6<sup>+</sup> клеток имеет средний и низкий уровень экспрессии HLA-DR.

Таким образом, показано, что максимальная экспрессия белка Bcl-6 наблюдается на промежуточном этапе созревания моноцитов в нДК, в ослабленном виде сохраняется у нДК и резко снижается при терминальном созревании ДК. Известно, что незрелые ДК, рассеянные по различным тканям организма, собирают антигены, тогда как терминальное созревание ДК ведет к принципиальному изменению их функций. Зрелые ДК прекращают сбор антигенов, усиливают продукцию белков для представления собранных антигенов и костимуляции Т-лимфоцитов и мигрируют в лимфоидные органы. Выявленная динамика экспрессии Bcl-6 позволяет предположить, что важнейшую роль этот фактор играет в ходе созревания ДК, а также при функционировании клеток на стадии нДК, при этом высокий уровень продукции Bcl-6 может ограничивать преждевременную дифференцировку зрелых ДК.

#### **Вывод**

В ходе работы обнаружена экспрессия гена и белка Bcl-6 в моноцитарных дендритных клетках человека. Экспрессия Bcl-6 значительно увеличивается при созревании ДК из моноцитов на третьи сутки, затем количество белка уменьшается. При терминальной дифференцировке зрелых ДК наблюдается резкое снижение Bcl-6, при практически таком же высоком уровне синтеза мРНК.

Работа поддержана РФФИ 16-34-00041 мол\_а.

#### Литература:

1. Johnston, R.J. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. / R.J. Johnston, A.C. Poholek, D. DiToro, I. Yusuf, D. Eto, B. Barnett, A.L. Dent, J. Craft, S. Crotty // *Science*. – 2009. – Vol. 325. – P. 1006–1010.
2. Nurieva, R.I. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. / R.I. Nurieva, Y. Chung, G.J. Martinez, X.O. Yang, S. Tanaka, T.D. Matskevitch, Y.H. Wang, C. Dong // *Science*. – 2009. – Vol. 325 – P. 1001–1005.
3. Yu, D. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. / D. Yu, S. Rao, L.M. Tsai, S.K. Lee, Y. He, E.L. Sutcliffe, M. Srivastava, M. Linterman, L. Zheng, N. Simpson, et al. // *Immunity*. – 2009. – Vol. 31. – P. 457–468.
4. Ohtsuka, H. Bcl6 is required for the development of mouse CD4+ and CD8alpha+ dendritic cells / H. Ohtsuka, A. Sakamoto, J. Pan, S. Inage, S. Horigome, et al. // *J. Immunol.* - 2011. - Vol. 186. - P.255-263.
5. Watchmaker, P.B. Transcriptional and functional profiling of human intestinal dendritic cells reveals conserved specialization and a role for Bcl-6 and Blimp-1 in terminal subset differentiation / P.B. Watchmaker, K. Lahl, M. Lee, D. Baumjohann, J. Morton, S.J. Kim, R. Zeng, A. Dent, K.M. Ansel, B. Diamond, H. Hadeiba, E.C. Butcher // *Nat. Immunol.* - 2014. - Vol. 15(1). - P.98-108.
6. Zhang, T. Dynamic Expression of BCL6 in Murine Conventional Dendritic Cells during In Vivo Development and Activation / T. Zhang, D. Liu, S. Calabro, S.C. Eisenbarth, G. Cattoretti, A.M. Haberman // *PLoS One* - 2014. - Vol. 9(6). - e101208. doi:10.1371
7. Плеханова, М.В. Действие вакцин против туберкулеза и гепатита В на фенотипические и функциональные свойства дендритных клеток новорожденных *in vitro*/ М.В. Плеханова, В.Ю. Талаев, О.Н. Бабайкина, И.Е. Заиченко, Е.И. Ефимов // *Иммунология*. – 2012 – Т. 33. – № 6. – С. 311-318.
8. Талаев, В.Ю. Действие вакцин на экспрессию хемокиновых рецепторов дендритными клетками новорожденных и взрослых *in vitro*/ В.Ю. Талаев, М.В. Плеханова, И.Е. Заиченко, О.Н. Бабайкина // *Иммунология*. – 2013. – Т. 34. – № 6. – С. 318-323.
9. Bunting, K.L. New effector functions and regulatory mechanisms of BCL6 in normal and malignant lymphocytes/ K.L. Bunting, A.M. Melnick // *Curr Opin Immunol.* – 2013 – Vol. 25(3). – P.339-346.

## ВОСПРИИМЧИВОСТЬ К АПОПТОЗУ DR6+ НАИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ И ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ

Филатова Е.Н.<sup>1</sup>, Анисенкова Е.В.<sup>1</sup>, Преснякова Н.Б.<sup>1</sup>, Сычева Т.Д.<sup>2</sup>,  
Кулова Е.А.<sup>2</sup>, Уткин О.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, Нижний Новгород

Введение. Острый инфекционный мононуклеоз (ОИМ) – вирусное заболевание, характеризующееся лихорадкой, лимфаденопатией, гепатолиенальным синдромом и изменениями гемограммы. Этиологическими агентами ОИМ являются представители семейства *Herpesviridae*: вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус и вирус герпеса человека 6 типа. Носителями вирусов являются более 90% мирового населения, однако острая форма заболевания проявляется лишь у 10% инфицированных лиц. В мире наиболее часто заболевание проявляется в период от 15 до 24 лет (в Приволжском федеральном округе – у детей до 14 лет) [1, 2].

Среди иммунокомпетентных клеток CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты участвуют в реализации противовирусного иммунного ответа и активны в течение как литической, так и латентной стадий ОИМ [3,4]. CD4+ Т-лимфоциты проявляют наибольшую активность во время литической стадии ОИМ [5,6]. При ОИМ наблюдается резкое возрастание содержания вирусспецифических CD8+ Т-лимфоцитов в периферической крови. Количество CD4+ Т-лимфоцитов сохраняется на постоянном уровне. Это приводит к значительному снижению соотношения CD4+/CD8+ Т-клеток у пациентов с ОИМ [7]. Следует отметить, что при других бактериальных и вирусных инфекциях подобные изменения обнаружены не были [8,9].

Представители семейства *Herpesviridae* являются лимфотропными вирусами и способны вызывать нарушения иммунной системы за счет регуляции пролиферации и изменения чувствительности иммунокомпетентных клеток к апоптозу [2]. У пациентов с иммуносупрессией заболевание протекает ускоренно и может приводить к летальному исходу [10,11]. Пополнение пула эффекторных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов происходит за счет активации и пролиферации наивных Т-клеток [12]. Восприимчивость наивных Т-лимфоцитов к апоптозу влияет на реализацию иммунного ответа при ОИМ.

В регуляции пролиферации и апоптоза Т-лимфоцитов участвуют члены белкового семейства «рецепторов смерти». По крайней мере, два представителя этого семейства, рецепторы CD95 и DR3, играют роль в регуляции апоптоза наивных Т-лимфоцитов при ОИМ [13]. Сведения об экспрессии «рецептора смерти» DR6 в наивных Т-лимфоцитах противоречивы. Ряд авторов не детектировали экспрессию DR6 в наивных Т-клетках периферической крови [14]. Другие исследователи свидетельствовали о высокой экспрессии DR6 на мембране наивных Т-лимфоцитов и его ключевой роли в качестве регулятора активации, дифференцировки и апоптоза Т-клеток [15]. Вопрос о вкладе DR6 в регуляцию апоптоза наивных Т-лимфоцитов при ОИМ остается открытым.

Цель исследования – изучить характер экспрессии DR6 на мембране наивных CD4+ (нТх) и наивных CD8+ (нЦТЛ) Т-лимфоцитов при апоптозе.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие здоровые дети и дети с диагнозом ОИМ в возрасте от 9 до 16 лет. Забор материала проводился с информированного согласия родителей или опекунов.

Материалом для исследования явились образцы периферической крови. Выделение нТх и нЦТЛ проводили методом негативной магнитной иммуносепарации с применением коммерческих наборов серии EasySep («Stemcell Technologies», Великобритания) согласно инструкции производителя. Чистоту выделения наивных Т-клеток оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Чистота выделения нТх и нЦТЛ составила более 98%.

Исследовали свежеизолированные нТх и нЦТЛ, а также клетки после 20 часов отдельного культивирования (концентрация  $1 \times 10^6$  клеток/мл, среда RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («PAA Laboratories», Австрия) и 2 mM L-глутамин («ПанЭко», Россия), 370C, 5% CO<sub>2</sub>). Использовали проточный цитофлуориметр BD FACS Canto II («Becton, Dickinson and Company», США). Сбор данных проводили с помощью программы FACSDiva («BD Biosciences», США). В каждом образце анализировали 30 000 клеток. Для оценки уровня апоптоза применяли двойное окрашивание аннексином V-PE (AV) и 7-аминоактиномицином-D (7AAD) с использованием коммерческого набора «PE Annexin V Apoptosis Detection Kit» («BD Biosciences», США). На основании окраски по AV и 7AAD выделяли гейты живых лимфоцитов (AV-7AAD-), лимфоцитов в ранней (AV+7AAD-) и поздней (AV+7AAD+) стадиях апоптоза. Определяли процент живых клеток, клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза от общего числа клеток в гейте лимфоцитов. Гейты живых клеток и клеток в ранней стадии апоптоза в дальнейшем анализировали отдельно. Экспрессию DR6 на мембране лимфоцитов анализировали с помощью флуоресцентно меченых антител против DR6, меченых APC («Novus Biological», США). Подсчитывали процент живых и находящихся в ранней стадии апоптоза DR6- и DR6+ Т-лимфоцитов от общего количества клеток в гейте лимфоцитов. Плотность экспрессии DR6 на мембране лимфоцитов оценивали исходя из средней интенсивности флуоресценции несущих рецепторы клеток.

Алгоритм статистического анализа был написан на языке R (версия 3.1.) в оболочке «RStudio 0.98.1098» [16,17]. При написании алгоритма использовали пакеты «stats», «flowCore», «lawstat» [18–22]. Иллюстрации создавали с применением пакета «ggplot2» [23]. Для сравнения выборок, имеющих нормальное распределение, применяли t-критерий Стьюдента для независимых выборок либо парный t-критерий Стьюдента. В случае ненормального распределения данных применяли критерий Манна-Уитни для независимых выборок либо парный критерий Уилкоксона. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Результаты приводили с указанием 95%-ного доверительного интервала (ДИ) разницы в абсолютных величинах.

Результаты и обсуждение. Нами показано, что белок DR6 экспрессируется на мембране наивных Т-лимфоцитов у здоровых детей и детей с ОИМ. Во всех случаях плотность экспрессии DR6 на мембране апоптотирующих наивных Т-клеток была выше, чем в живых ( $p < 0.05$ ).

У здоровых детей в свежеизолированных нТх процент живых клеток был выше, чем в нЦТЛ (ДИ=10.76-19.79%,  $p < 0.001$ ), а процент клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза был ниже (ДИ=2.34-8.86%,  $p = 0.005$  и ДИ=5.34-12.23%,  $p = 0.016$ , соответственно) (Рис. 1.).

Повышенное содержание живых нТх по сравнению с нЦТЛ достигалось за счет увеличения процента живых DR6- клеток (ДИ=7.80-25.30%,  $p = 0.004$ ). Процент живых DR6+ среди нТх и нЦТЛ не отличался. Процент нТх снижался в ранней стадии апоптоза за счет уменьшения количества DR6- и DR6+ клеток (ДИ=0.18-4.78%,  $p = 0.034$  и ДИ=1.15-3.87%,  $p = 0.004$ , соответственно) (Рис. 2.). При этом плотность экспрессии DR6 на мембране живых нТх и клеток в ранней стадии апоптоза также снижалась (ДИ=5.74-47.53,  $p = 0.016$  и ДИ=3.94-70.22,  $p = 0.031$ ) (Рис. 3.).

У детей с ОИМ не выявлено различий в суммарном проценте живых и апоптотирующих клеток, живых и апоптотирующих DR6- и DR6+ клеток, а также плотности экспрессии рецептора на их мембране среди свежеизолированных нТх по сравнению с нЦТЛ.

У здоровых и больных детей в популяции свежеизолированных нТх не выявлено различий суммарного процента живых клеток, а также клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза. Также не изменялся процент живых DR6- нТх. Процент живых DR6+ нТх, а также плотность экспрессии DR6 на их мембране снижались у детей с ОИМ (ДИ=1.73-6.12%,  $p = 0.009$  и ДИ=2.70-40.57,  $p = 0.008$ , соответственно). При ОИМ возрастал процент DR6- нТх в ранней стадии апоптоза (ДИ=1.72-9.94%,  $p = 0.008$ ), а процент DR6+ клеток и плотность экспрессии DR6 на их мембране не изменялись (Рис. 2, 3.).

В свежеизолированных нЦТЛ процент живых клеток и клеток в ранней стадии апоптоза у здоровых и больных детей не различались. Процент нЦТЛ в поздней стадии апоптоза при ОИМ снижался (ДИ=1.70-11.03%,  $p = 0.011$ ) (Рис. 1.). При ОИМ в живых нЦТЛ процент DR6- клеток возрастал (ДИ=3.32-26.67%,  $p = 0.014$ ) наряду с уменьшением процента DR6+ клеток (ДИ=3.53-

9.91%,  $p=0.001$ ). Аналогичные изменения наблюдались в нЦТЛ на ранней стадии апоптоза. При ОИМ повышался процент DR6- клеток (ДИ=0.09-5.88%,  $p=0.024$ ), а процент DR6+ клеток снижался (1.16-5.79%,  $p=0.014$ ). У больных детей также снижалась плотность экспрессии DR6 на мембране живых нЦТЛ и клеток в ранней стадии апоптоза (ДИ=11.01-64.64,  $p=0.003$  и ДИ=8.56-78.73,  $p=0.007$ ) (Рис. 2, 3.).

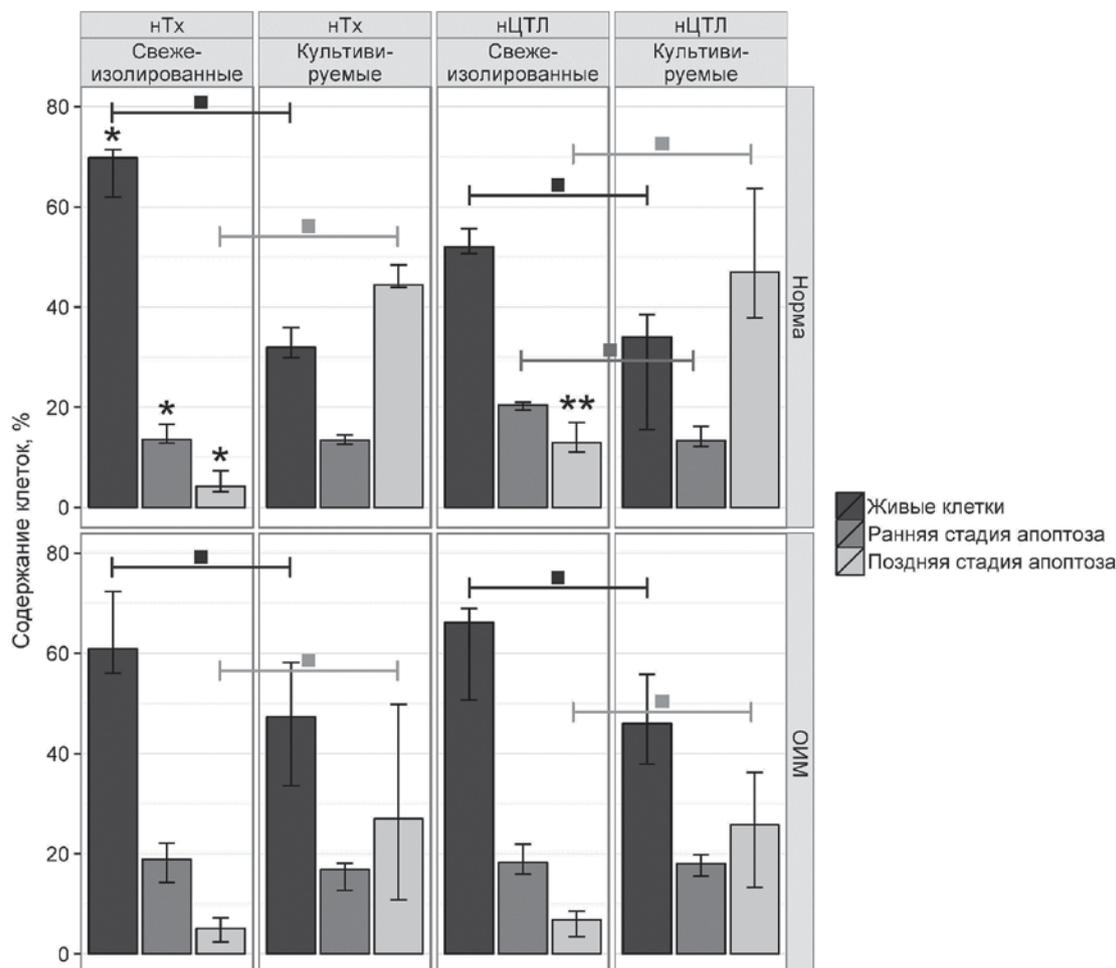


Рис. 1. Содержание живых наивных Т-лимфоцитов, наивных Т-лимфоцитов в ранней и поздней стадиях апоптоза у здоровых детей и детей с ОИМ. \* - статистически значимые различия между свежеизолированными нТх и нЦТЛ ( $p<0.005$ ). \*\* - статистически значимые различия между свежеизолированными наивными Т-лимфоцитами здоровых детей и детей с ОИМ ( $p<0.005$ ). —■— - статистически значимые различия между свежеизолированными и культивируемыми наивными Т-лимфоцитами ( $p<0.005$ ). Данные приведены с указанием медианы, 25 и 75 перцентиля.

Культивирование нТх здоровых детей приводило к снижению процента живых клеток (ДИ=24.60-42.32%,  $p<0.001$ ) и возрастанию процента клеток в поздней стадии апоптоза (ДИ=30.70-45.53%,  $p<0.001$ ) по сравнению со свежеизолированными нТх. Процент клеток в ранней стадии апоптоза не изменялся (Рис. 1.). При культивировании снижение процента живых клеток происходило за счет уменьшения содержания живых DR6- нТх (ДИ=16.27-37.35%,  $p=0.001$ ). Процент живых DR6+ клеток не изменялся. Также возрастал процент только DR6+ клеток в ранней стадии апоптоза (ДИ=0.26-8.31%,  $p=0.022$ ). Плотность экспрессии DR6 на мембране живых нТх и нТх в ранней стадии апоптоза повышалась (ДИ=0.34-99.24,  $p=0.031$  и ДИ=4.18-277.01,  $p=0.031$ , соответственно) (Рис. 2, 3.).

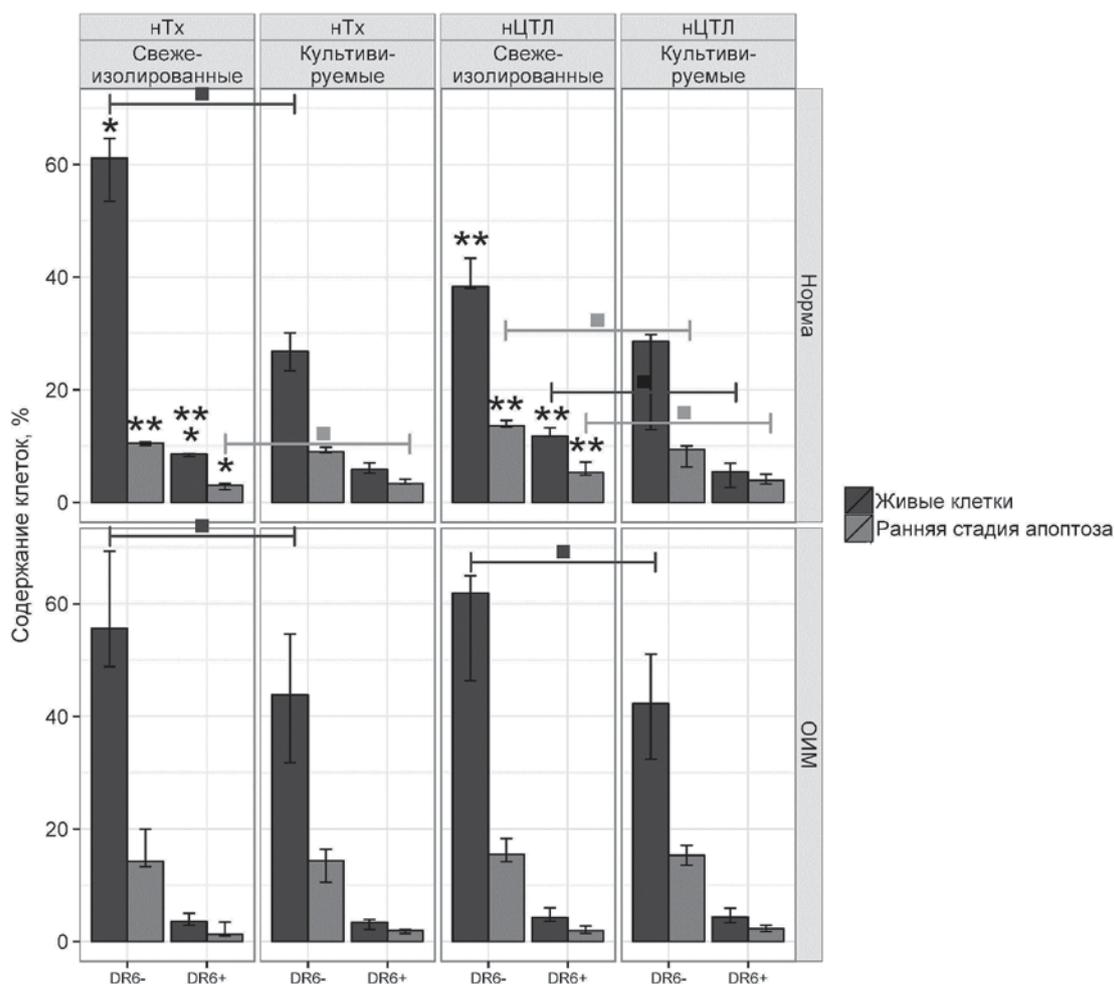


Рис. 2. Экспрессия рецептора DR6 живыми и апоптотирующими наивными Т-лимфоцитами у здоровых детей и детей с ОИМ.

\* - статистически значимые различия между свежеизолированными нТх и нЦТЛ ( $p < 0.005$ ).

\*\* - статистически значимые различия между свежеизолированными наивными Т-лимфоцитами здоровых детей и детей с ОИМ ( $p < 0.005$ ).

— — - статистически значимые различия между свежеизолированными и культивированными наивными Т-лимфоцитами ( $p < 0.005$ ).

Данные приведены с указанием медианы, 25 и 75 перцентиля.

У здоровых и больных детей культивирование приводило к снижению процента живых нТх (ДИ=0.66-36.82%,  $p=0.044$ ) и возрастанию процента нТх в поздней стадии апоптоза (ДИ=6.05-46.17%,  $p=0.016$ ). Процент нТх в ранней стадии апоптоза не изменялся (Рис. 1.). В норме и при ОИМ культивирование сопровождалось снижением процента живых DR6- нТх (ДИ=0.47-35.58%,  $p=0.045$ ) по сравнению со свежеизолированными клетками. Процент живых DR6+ нТх и процент раннеапоптотических DR6- и DR6+ клеток не изменялись (Рис. 2.). Также при культивировании не изменялась плотность экспрессии рецептора на мембране живых нТх и клеток в ранней стадии апоптоза.

Культивирование нЦТЛ у здоровых детей приводило к снижению суммарного процента живых клеток (ДИ=0.30-39.11%,  $p=0,048$ ) и клеток в ранней стадии апоптоза (ДИ=2.84-11.90%,  $p=0,007$ ) по сравнению со свежеизолированными нЦТЛ. При культивировании возрастал процент нЦТЛ в поздней стадии апоптоза (ДИ=14.63-33.60%,  $p=0.005$ ) (Рис. 1.). Процент живых клеток уменьшался за счет снижения процента живых DR6+ нЦТЛ (ДИ=3.18-13.72%,  $p=0.008$ ). Плотность экспрессии DR6 при этом не изменялась также как процент живых DR6- клеток.

Снижение процента нЦТЛ в ранней стадии апоптоза происходило за счет уменьшения содержания DR6- и DR6+ клеток (ДИ=2.28-7.79,  $p=0.004$  и ДИ=0.11-4.24,  $p=0.042$ , соответственно). При этом наблюдалось повышение плотности экспрессии DR6 на мембране нЦТЛ в ранней стадии апоптоза (ДИ=0.90-193.72,  $p=0.047$ ) по сравнению с аналогичным показателем в свежеизолированных клетках (Рис. 2, 3.).

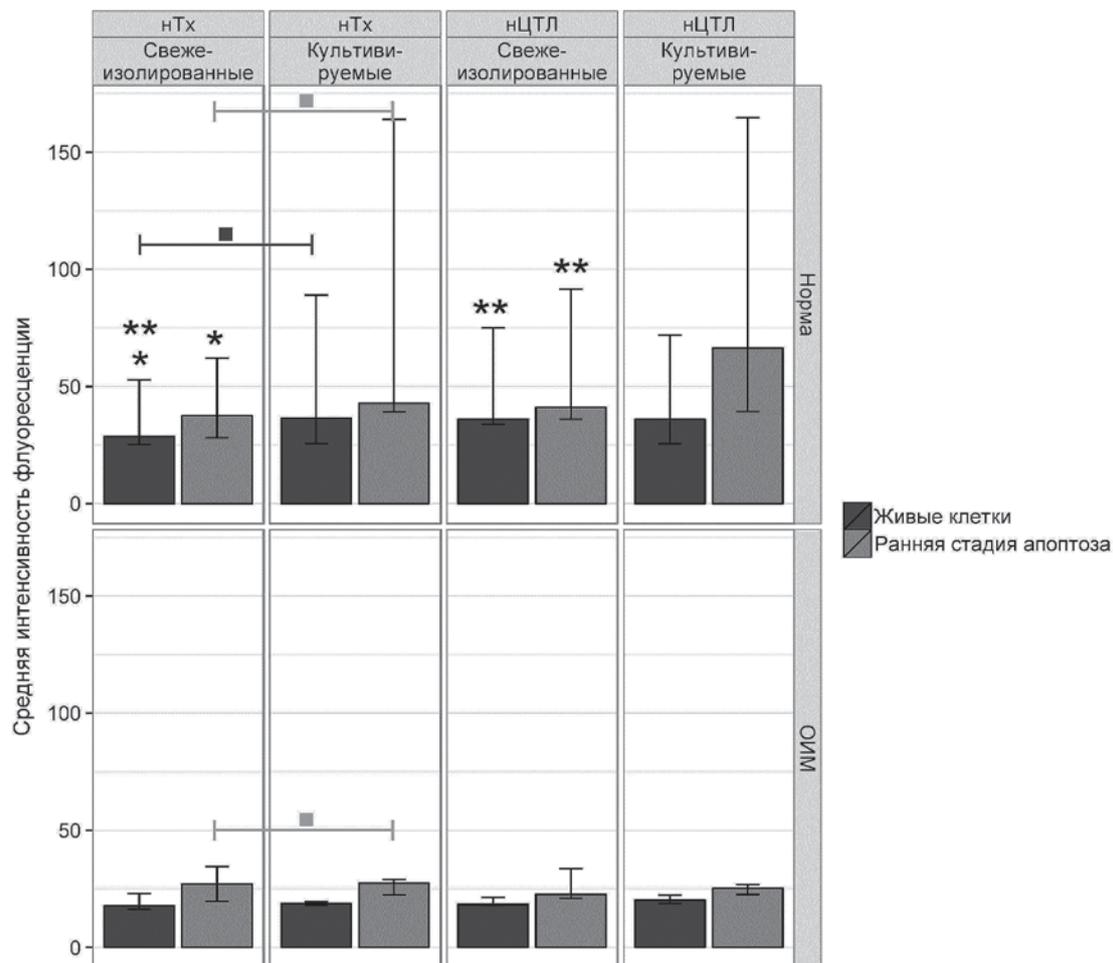


Рис. 3. Плотность экспрессии рецептора DR6 на поверхности наивных Т-лимфоцитов у здоровых детей и детей с ОИМ.

\* - статистически значимые различия между свежеизолированными нТх и нЦТЛ ( $p<0.005$ ).

\*\* - статистически значимые различия между свежеизолированными наивными Т-лимфоцитами здоровых детей и детей с ОИМ ( $p<0.005$ ).

—■— - статистически значимые различия между свежеизолированными и культивированными наивными Т-лимфоцитами ( $p<0.005$ ).

Данные приведены с указанием медианы, 25 и 75 перцентиля.

У детей с ОИМ культивирование нЦТЛ приводило к снижению процента живых клеток (ДИ=4.43-25.91%,  $p=0.005$ ) и возрастанию процента клеток в поздней стадии апоптоза (ДИ=7.33-31.88%,  $p=0.005$ ) по сравнению со свежеизолированными клетками. В отличие от нормы, при ОИМ не наблюдали изменения процента нЦТЛ в ранней стадии апоптоза (Рис. 1.). Процент живых нЦТЛ у детей с ОИМ снижался при культивировании за счет уменьшения процента живых DR6- клеток (ДИ=3.30-25.16%,  $p=0.016$ ). Процент живых DR6+ нЦТЛ не изменялся (Рис. 2.). Не выявлено изменений процента DR6- и DR6+ нЦТЛ в ранней стадии апоптоза, а также плотности экспрессии DR6 на мембране живых и апоптотирующих клеток в ранней стадии.

Таким образом, нами изучена экспрессия рецептора DR6 на мембране живых и апоптотирующих наивных Т-лимфоцитов. Показано, что вне зависимости от субпопуляционной принадлежности изолированных наивных Т-клеток плотность экспрессии DR6 повышается на мембране лимфоцитов в ранней стадии апоптоза по сравнению с живыми Т-клетками. Данный факт дает основание рассматривать DR6 в качестве маркера апоптоза нТх и нЦТЛ.

Во время культивирования наивных Т-лимфоцитов мы не проводили специфическую активацию рецептора DR6. При этом мы фиксировали усиление апоптоза наивных Т-клеток после культивирования в течение суток. У здоровых детей апоптоз нТх сопровождался гибелью живых DR6- клеток на фоне отсутствия различий в содержании DR6+ нТх. В нЦТЛ, наоборот, апоптозу подвергались только живые DR6+ клетки. Таким образом, восприимчивость наивных Т-лимфоцитов, экспрессирующих DR6, к апоптозу зависит от субпопуляционной принадлежности клеток. В норме DR6+ нТх устойчивы к индукции апоптоза в отличие от DR6+ нЦТЛ.

В норме свежеизолированные нЦТЛ характеризовались более высоким уровнем апоптоза по сравнению с нТх. При этом апоптотирующие DR6+ нЦТЛ обладали повышенной плотностью экспрессии рецептора по сравнению с DR6+ нТх, устойчивыми к апоптозу. На примере клеточной линии HeLa показано, что усиление экспрессии мембранного DR6 может приводить к апоптозу клеток. Данный процесс не требовал связывания рецептора с его лигандом [24]. Таким образом, изменение плотности экспрессии DR6 может являться одним из механизмов, регулирующих чувствительность наивных DR6+ Т-лимфоцитов к апоптозу.

Также как и у здоровых детей, у детей с ОИМ DR6+ нТх были резистентными к апоптозу. Однако их DR6+ нЦТЛ утрачивали восприимчивость к апоптозу. Уровень апоптоза свежеизолированных нЦТЛ при ОИМ был ниже, чем у здоровых детей на фоне снижения в 2 раза плотности экспрессии мембранного DR6 при данном заболевании. Мы полагаем, что изменение чувствительности DR6+ нЦТЛ к апоптозу вследствие снижения плотности экспрессии мембранного DR6 может являться одним из защитных механизмов, направленных на сохранение пула нЦТЛ при ОИМ.

#### Литература:

1. Электронный эпидемиологический атлас Приволжского федерального округа [Электронный ресурс] . - URL: <http://epid-atlas.nniem.ru/> (дата обращения 25.01.2016).
2. Womack J. et al. Common questions about infectious mononucleosis / J. Womack, M. Jimenez // *Am. Fam. Physician* – 2015. – V. 91. – № 6. – P. 372–376.
3. Balfour H.H. et al. Infectious mononucleosis / H. H. Balfour, S. K. Dunmire, K. A. Hogquist // *Clin. Transl. Immunol.* – 2015. – V. 4. – № 2. – e33.
4. Hislop A.D. et al. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus / A. D. Hislop, G. S. Taylor, D. Sauce, A. B. Rickinson // *Annu. Rev. Immunol.* – 2007. – V. 25. – P. 587–617.
5. Long H.M. et al. MHC II tetramers visualize human CD4+ T cell responses to Epstein-Barr virus infection and demonstrate atypical kinetics of the nuclear antigen EBNA1 response / H. M. Long, O. L. Chagoury, A. M. Leese, G. B. Ryan, E. James, L. T. Morton, R. J. M. Abbott, S. Sabbah, W. Kwok, A. B. Rickinson // *J. Exp. Med.* – 2013. – V. 210. – № 5. – P. 933–949.
6. Scherrenburg J. et al. Detailed analysis of Epstein-Barr virus-specific CD4+ and CD8+ T cell responses during infectious mononucleosis / J. Scherrenburg, E.R.W.A.N. Piriou, N. M. Nanlohy, D. van Baarle // *Clin. Exp. Immunol.* – 2008. – V. 153. – № 2. – P. 231–239.
7. Sulik A. et al. Epstein-Barr virus effect on frequency of functionally distinct T cell subsets in children with infectious mononucleosis / A. Sulik, E. Oldak, A. Kroten, A. Lipska, P. Radziwon // *Adv. Med. Sci.* – 2014. – V. 59. – № 2. – P. 227–231.
8. Janols H. et al. Lymphocyte and monocyte flow cytometry immunophenotyping as a diagnostic tool in uncharacteristic inflammatory disorders / H. Janols, A. Bredberg, I. Thuvesson, S. Janciauskiene, O. Grip, M. Wullt // *BMC Infect. Dis.* – 2010. – V. 10. – № 1. – P. 1–9.

9. Heuvel D. van den et al. Cytomegalovirus- and Epstein-Barr Virus-Induced T-Cell Expansions in Young Children Do Not Impair Naive T-cell Populations or Vaccination Responses: The Generation R Study / D. van den Heuvel, M. A. E. Jansen, W. A. Dik, H. Bouallouch-Charif, D. Zhao, K. A. M. van Kester, M. A. W. Smits-Te Nijenhuis, M. J. Koliijn-Couwenberg, V. W. V. Jaddoe, R. Arens, J. J. M. van Dongen, H. A. Moll, M. C. van Zelm // *J. Infect. Dis.* – 2015. – V. 213. – № 2. – P. 233–242.
10. Palendira U. et al. Molecular Pathogenesis of EBV Susceptibility in XLP as Revealed by Analysis of Female Carriers with Heterozygous Expression of SAP / U. Palendira, C. Low, A. Chan, A. D. Hislop, E. Ho, T. G. Phan, E. Deenick, M. C. Cook, D. S. Riminton, S. Choo, R. Loh, F. Alvaro, C. Booth, H. B. Gaspar, A. Moretta, R. Khanna, A. B. Rickinson, S. G. Tangye // *PLoS Biol.* – 2011. – V. 9. – № 11. – e1001187.
11. Mao J.-Q. et al. Clinical and laboratory characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection in children / J.-Q. Mao, S.-L. Yang, H. Song, F.-Y. Zhao, X.-J. Xu, M.-E. Gu, Y.-M. Tang // *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi Chin. J. Contemp. Pediatr.* – 2014. – V. 16. – № 11. – P. 1081–1085.
12. Kimura M.Y. et al. IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8 T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death / M. Y. Kimura, L. A. Pobeziysky, T. Guinter, J. Thomas, A. Adams, J.-H. Park, X. Tai, A. Singer // *Nat. Immunol.* – 2013. – V. 14. – № 2. – P. 143–151.
13. Филатова Е.Н. и др.. Оценка уровня апоптоза наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у детей с острым инфекционным мононуклеозом при активации рецепторов CD95 и DR3 / Е. Н. Филатова, О. В. Уткин, Е. В. Анисенкова, Н. Б. Преснякова, Т. Д. Сычева, В. В. Краснов, Н. Е. Сенягина, Е. А. Кулова, Е. И. Ефимов // *Современные Технологии В Медицине* – 2015. – Т. 7. – № 3. – С. 109–118.
14. Кнма М. et al. T-cell activation triggers death receptor-6 expression in a NF-κB and NF-AT dependent manner / М. Кнма, А. Broučkovб, М. Кос, L. Anděra // *Mol. Immunol.* – 2011. – V. 48. – № 12-13. – P. 1439–1447.
15. Liu J. et al. Enhanced CD4<sup>+</sup> T cell proliferation and Th2 cytokine production in DR6-deficient mice / J. Liu, S. Na, A. Glasebrook, N. Fox, P. J. Solenberg, Q. Zhang, H. Y. Song, D. D. Yang // *Immunity* – 2001. – V. 15. – № 1. – P. 23–34.
16. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing / R Development Core Team. – Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2009. – 409p.
17. RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R / RStudio Team. – Boston, MA: RStudio, Inc., 2015.
18. Gastwirth J.L. et al. lawstat: An R package for biostatistics, public policy, and law. Version 2.4.1.– 2013.
19. Hothorn T. et al. Simultaneous inference in general parametric models / T. Hothorn, F. Bretz, P. Westfall // *Biom. J. Biom. Z.* – 2008. – V. 50. – № 3. – P. 346–363.
20. Le Meur N. et al. flowCore: Basic structures for flow cytometry data. R package version 3.1.1.– 2014.
21. Pinheiro J. et al. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. Version 3.1-117. / J. Pinheiro, D. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar, R Core Team. – 2014.
22. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing / R Core Team – Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. – 2014.
23. Wickham H. ggplot2: elegant graphics for data analysis / H. Wickham. – New York, NY: Springer New York, 2009.
24. Pan G. et al. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor / G. Pan, J.H. Bauer, V. Haridas, Sh. Wang, D. Liu, G. Yu, C. Vincenz, B.B. Aggarwal, J. Ni, V.M. Dixit // *FEBS Letters.* – 1998. – V.431. – №3. – P. 351-356.

## РАЗДЕЛ 4. БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ И БИОЗАЩИТА, ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕЗИНФЕКЦИОННЫХ И СТЕРИЛИЗАЦИОННЫХ МЕРОПРИЯТИЙ

### ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ РАБОЧИХ ПОВЕРХНОСТЕЙ ХИРУРГИЧЕСКОГО МЕХАТРОННОГО КОМПЛЕКСА «РОБОТ»

Баязитова Л.Т.<sup>1</sup>, Миронов М.М.<sup>2</sup>, Тюпкина О.Ф.<sup>1</sup>, Чазова Т.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии  
и микробиологии» Роспотребнадзора, Казань

<sup>2</sup> Казанский национальный технологический университет, Казань

Оказание высокотехнологичной медицинской помощи в России предполагает применение уникальных методов лечения с использованием роботизированной техники. Качеству медицинских инструментов предъявляют высокие требования. Предпочтение отдают биологически безопасным материалам с большой механической прочностью и устойчивостью к коррозии [1]. Важным требованием является наличие антимикробных свойств материала [2,3].

**Цель работы:** оценка степени воздействия поверхностей рабочих частей мехатронного комплекса «Робот» - комплектующих из нержавеющей стали и титанового сплава с тонкопленочным покрытием из нитридов титана и гафния на микрофлору.

**Материалы и методы.** Исследование проведено с использованием металлических подложек-имитаторов с покрытием. Покрытия наносились на поверхность коррозионностойких металлических образцов размером 20X20 мм и толщиной 2-4 мм со шлифованной поверхностью и заданной шероховатостью. Изучение антимикробного действия покрытий проводилось по методике, в основе которой лежит воздействие вытяжки исследуемого материала на рост бактериальных тест-культур. Для испытаний были приготовлены вытяжки образцов на стерильном изотоническом растворе NaCl (50 мл). Вытяжки термостатировали при 37°C в течение 24 часов (вытяжка № 1).

Ход эксперимента: в 5 мл вытяжки вносили суточную культуральную взвесь (0,1 мл) и добавляли 1,0 мл МПБ. Инкубировали при 37 град. С. Определение концентрации микроорганизмов (КОЕ/мл) проводилось через 4, 24, 48 часов путем посева на твердую питательную среду с применением серии десятикратных разведений. Эталонном инертности служило покровное стекло. Исследование антимикробных свойств металлов проведено с использованием клинических изолятов и референс-штаммов микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ATCC № 29213; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

**Результаты.** Установлено, что наиболее чувствительными к действию испытуемых образцов оказались изоляты *Staphylococcus aureus*. Через 24 часа инкубации зарегистрировано подавление роста исследуемых культур по сравнению с контролем: плотность контаминации тест-штамма в контроле -lg 4,3±0,5 КОЕ/мл; в опытных сериях -lg 3,7±0,35 КОЕ/мл. Влияние на культуры *Escherichia coli* оказалось менее выраженным: плотность обсемененности тест-культуры через 24 часа инкубации -lg 3,8±0,5 КОЕ/мл в опытной серии, lg 4,0±0,4 КОЕ/мл - контроле. В отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa* достоверной разницы в плотности обсемененности в опыте и контроле не выявлено.

Литература:

1. Masse A, Bruno A, Bosetti M, et al . Prevention of pin track infection in external fixation with silver coated pins: clinical and microbiological results. J Biomed Mater Res; 2000, 53(5): P. 600–604.
2. Mahendra Rai, Alka Yadav, Aniket Gade. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology. 2009, Advances 27 P. 76–83.
3. J.H. Hsieh, C.C. Chang, C. Li, S.J. Liu, Y.K. Chang Effects of Ag contents on antibacterial behaviors of TaON–Ag nanocomposite thin films. Surface, Coatings Technology. 2010 ( 205) P. 337–340.

## НОВЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ СВЧ-ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ МЕДИЦИНСКИХ ОТХОДОВ

Веркина Л.М., Писанов Р.В., Иванов С.А., Головин С.Н.

ФКУЗ Ростовский - на - Дону противочумный институт Роспотребнадзора,  
Ростов-на-Дону

В настоящее время метод обеззараживания медицинских отходов с помощью аппаратов, генерирующих сверхвысокочастотное (СВЧ) излучение, является, наряду с паровой стерилизацией, наиболее универсальным, экономически выгодным, низкоэнергозатратным, экологически безопасным и эффективным. СВЧ-излучение с несущей частотой 2,45 ГГц вызывает в системе жидкая среда-бактериальная клетка ряд процессов: переход электронов в атомах или молекулах с более высокой энергетической орбиты на более низкую, молекулярный резонанс воды с возникновением вращательных движений молекул и их тепловым ускорением, что в свою очередь вызывает образование кавитационных полостей, механически повреждающих клетки, электромеханический резонанс, вызывающий деформацию ОН-связей и образование радикалов, запускающих каскад процессов перекисного окисления липидов клеточной мембраны, многократную деполяризацию молекул, и, как одно из следствий, - разрывы нитевой структуры ДНК. Совокупность этих факторов и приводит к гибели бактерий. Все это позволило использовать энергию волн СВЧ для обеззараживания медицинских отходов различных классов в специальных установках, одной из которых является используемая нами УОМО-01/150-«О-ЦНТ», эффективность применения которой доказана рядом работ [1,2], в том числе и нами, в отношении ПБА I-II группы патогенности [3].

В соответствии с МР [4], регламентирующими порядок работы на СВЧ установках контроль эффективности обеззараживания отходов проводят термохимическим и бактериологическим методами. Бактериологический метод является достоверным прямым методом контроля и осуществляется непосредственно после окончания работы установки путём контрольного высева смывов из подвергшихся обеззараживанию отходов.

Однако, необходимость соблюдения сроков культивирования искомым микроорганизмов, особенно при работе с медленно растущими культурами (возбудитель туберкулеза, лепры, бруцеллеза, туляремии и др.), возможная недостаточность посевной дозы (менее 10<sup>2</sup> КОЕ/мл), риск перехода возбудителей в некультивируемые формы, делают этот метод в ряде случаев затруднительным, и даже неэффективным. Наиболее показательным методом, гарантирующим достижение 100% нежизнеспособности возбудителя, будет являться учет изменений его генетического аппарата – ДНК. Исходя из этого, нами был апробирован способ учета массы ДНК возбудителя методом электрофореза, который гарантирует точность и быстроту исследования. Для унификации использовали тестовую суспензию ДНК *Vibrio cholerae* 5879, т.к. выделенная из данного штамма ДНК имеет большую массу.

Выделение ДНК проводили в соответствии с МУ 1.3.1794-03, с авторскими дополнениями, предложенными Писановым Р.В. и Ивановым С.А., что позволило получить высокомолекулярную ДНК *V. cholerae* 5879 в 30% растворе сахарозы в ТЕ-буфере.

Данная суспензия разливалась в стеклянные ампулы по 0,5 мл, которые запаивались в пламени газовой горелки. Количество ампул следует из расчета: 3 ампулы на 1 бак + 1 контрольная. Важно, чтобы контроль проводился именно из запаянной ампулы для приведения теста к общим исходным условиям и во избежание возможных погрешностей (загрязнённые ампулы, перегрев и т.д.). Ампулы располагают в баке между отходами в случайном порядке и проводят цикл обеззараживания при режиме 1200 Вт/60 мин в соответствии с инструкцией.

По окончании цикла ампулы извлекают, вскрывают, отбирают 10 мкл взвеси, переносят на силиконовую подложку, где смешивают с 1 мкл бромистого этидия, подкрашенного бромфеноловым синим. Затем вносят в лунки геля параллельно, в одну из лунок вносится *DNA ladder*. Проводят электрофорез в 1% агарозном геле с трис-боратным буфером (250 В/10 мин). Затем производится учет под ультрафиолетовым излучением.

При учёте теста сравнивают показатели пар нуклеотидов ДНК в контрольной лунке (взвесь *V. cholerae* 5879 не обеззараженной в СВЧ-установке) с образцами ДНК тест-культур из ампул. Как правило, контрольный образец содержит ДНК размером ~ 40 000 пар нуклеотидов, в то время как в тест культурах от 2000 до 500 пар и ниже. Разница в степени фрагментации свидетельствует о высокой эффективности применения данного метода обеззараживания.

Таким образом, в ходе проведенных исследований была показана эффективность и надежность применения метода контроля качества СВЧ-обеззараживания медицинских отходов по степени деградации ДНК тестовой суспензии и возможность применения данного метода в структурных подразделениях, работающих с ПБА I-II групп для обоснования биологической безопасности медицинских отходов при использовании метода СВЧ-обеззараживания.

Литература:

1. Мельникова А.А., Михеева И.В., Чекалина К.И. О внедрении передовых методик сбора и утилизации одноразовых шприцев // Журн. Стерилизация и госпитальные инфекции - 2006, NQ 1. - С.50-54.
2. Использование электромагнитного излучения сверхвысокой частоты для обеззараживания инфицированных медицинских отходов: Методические рекомендации.- М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. – 12 с.
3. Веркина Л.М., Титова С.В., Березняк Е.А. и др. Обеззараживание отходов класса В сверхвысокочастотным излучением в микробиологической лаборатории //Инфекционные болезни. Матер. V Ежегодн. Всеросс. Конгр. по инфекц. бол. (Москва, 25-27 марта 2013г).-2013.-С.87-88.
4. Использование электромагнитного излучения сверхвысокой частоты для обеззараживания инфицированных медицинских отходов: Методические рекомендации.- М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. – 12 с.

## **ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ОПАСНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЪЕКТА**

**Говорунов И.Г., Ерёмченко Е.Н., Тюрин Е.А.**

*ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»  
Роспотребнадзора, Оболенск*

Обеспечение режима безопасности на опасных биологических объектах является важным элементом обеспечения биологической безопасности в целом. Решение этой задачи предполагает создание информационной системы мониторинга и прогнозирования чрезвычайных ситуаций (СМП ЧС), необходимой для обеспечения эффективной обработки персоналом растущих объёмов разнородной информации, заблаговременного предупреждения о вероятном появлении новых, особенно сложных и многофакторных, угроз и оперативного принятия управленческих решений в особых ситуациях. Создание такой системы предполагает внедрение современных технологий с возможностью включения в ее архитектуру новых информационных элементов независимо от их формата.

Целью настоящей работы было дальнейшее развитие СМП ЧС.

В работе использовались:

- а) космические снимки района расположения опасного биологического объекта, сделанные в различные сезоны и в разных спектральных диапазонах;
- б) оборудование и технология для изготовления сферических панорамных фотоснимков;
- в) тепловизор Flig E60 для снимков в тепловом ИК-диапазоне и бесконтактной термометрии персонала;
- г) программный комплекс, позволяющий обеспечить обработку, хранение данных, их визуализацию и анализ методами визуальной и модельной аналитик.

В ГНЦ ПМБ с 2011 года ведётся работа по созданию прототипа СМП ЧС, способной обеспечить высокое качество принятия оперативных решений в ситуации ЧС, связанных, в том числе, с возможным появлением новых рисков и угроз. Первым прототипом этой системы была «Панель угроз и рисков» [1]. Методической основой для создания такой системы явились принципы неогеографии и ситуационной осведомлённости [2,3]. При этом ключевыми факторами, позволяющими минимизировать aberrации восприятия, возникающие вследствие противоречивости и несогласованности информационных компонент системы [4], становятся наличие единого пространственно-временного контекста для всех масштабных уровней и ярусов управленческой системы, и переход к представлению такого контекста с помощью документально точных, не опосредованных картографическими и иными условностями изображений.

Анализ и опытная эксплуатация прототипа «Панель угроз и рисков» показали, что важным фактором возникновения aberrаций восприятия обстановки является отсутствие единого, унифицированного восприятия объекта. Наличие разнородных и зачастую противоречащих друг другу источников информации об объекте и его инфраструктуре лишь осложняет ситуацию. Особенно остро эта проблема стоит у недавно работающего на объекте персонала и лиц, привлекаемых для решения задач предупреждения ЧС и ликвидации их последствий, сторонних экспертов, и т.д. Для решения проблемы быстрого и эффективного ознакомления с биологически опасным объектом в рамках информационного обеспечения СМП ЧС было решено разработать специальное интерактивное приложение.

Приложение «Учебный 3D курс: инфраструктура ГНЦ ПМБ» предназначено для решения нескольких задач. Задача ознакомительного обучения персонала с инфраструктурой является первоочередной. Приложение призвано сформировать у пользователя, максимально полный визуальный образ объекта на базе принципов ситуационной осведомлённости и неогеографии (Рис. 1) и обеспечить отождествление информации об объектах с их реальными изображениями, полученными в разных ракурсах, разные сезоны и в двух разных областях электромагнитного спектра. Предполагается, что приложение будет использоваться в учебных целях и для проведения учебно-тренировочных занятий в виртуальной 3D-среде, учений ЧС с отработкой сложных и потенциально опасных сценариев развития обстановки при ЧС, и т. д.



Рисунок 1 - Интерфейс программы «Учебный 3D-курс: Инфраструктура ГНЦ ПМБ» в режиме отображения контекста с помощью зимних космических снимков высокого разрешения.

Приложение реализовано в виде гетерогенной среды, включающей в себя космические снимки, полносферические панорамные изображения, полученные в разных точках на территории объекта, и изображения в тепловом ИК-диапазоне. Пользователь может совершить внешний и внутренний осмотр объекта и его элементов, произвольно меняя уровень просмотра и его ракурс. При выборе объекта или территории при помощи курсора на экран выводится информация об объекте. Пользователь видит только изображения, представляющие объект с разных ракурсов, а также якорные области — точки перехода между разными ракурсами. Посредством якорных точек или областей пользователь может, переводя на них курсор, либо получать информацию об объекте, либо совершать виртуальное «путешествие», переходя от одного ракурса к другому. При наведении курсора на различные объекты появляются всплывающие окна, содержащие текстовую информацию об объекте и иную информацию — например, гипертекстовые ссылки (Рис. 2).

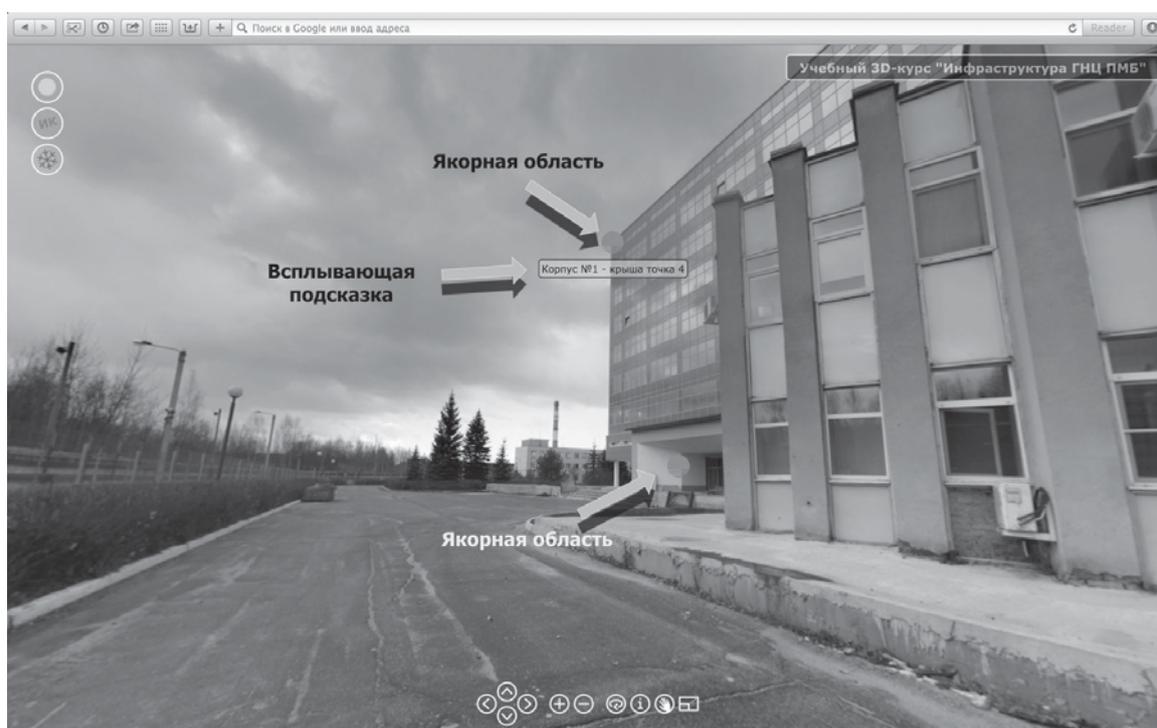


Рисунок 2 - Элемент панорамного изображения с якорными областями для перехода к просмотрам с новых ракурсов и всплывающая при наведении курсора текстовая подсказка.

Экранный интерфейс программы минимизирован в целях обеспечения максимально полного восприятия обстановки путем не опосредованных картографическими условностями изображений. Он состоит из двух модулей — навигационного модуля и модуля переключения режимов.

Навигационный модуль расположен в нижней части экрана и включает в свой состав стандартные кнопки управления масштабированием, смены ракурса, вывода вспомогательной информации и переключения между оконным и полноэкранным режимами. Вся навигация может осуществляться также и с помощью манипулятора (например, мыши или тачпада) и нажатия кнопок «Shift» и «Control».

Модуль переключения режимов позволяет пользователю переключаться между тремя режимами представления обстановки, важными для целей восприятия обстановки — в оптическом диапазоне с «летними» изображениями (Рис. 3), в инфракрасном диапазоне, а также в оптическом диапазоне с использованием зимнего цветного космического снимка, прошедшего специальную обработку для обеспечения естественного для земного наблюдателя представления цветовой информации. Благодаря возможности переключения между «летним» и «зимним» представлениями

пользователь программы может увидеть объект в разные сезоны, а также получить представление о состоянии инфраструктуры объекта, и его характерных сезонных изменениях.



Рисунок 3 - Экранный модуль переключения режимов отображения контекста.

Особенностью приложения является включение в него изображений в инфракрасном диапазоне (ближнем, отражательном ИК-диапазоне для космических снимков и тепловом ИК-диапазоне — для остальных изображений), поскольку в особых ситуациях персоналу может потребоваться использовать тепловизионную аппаратуру, особенно во внутренних помещениях объекта. В модель включены изображения отдельных внутренних помещений объекта, полученные в тепловом ИК-диапазоне. Сделанные с помощью тепловизора изображения, интегрированные в уже имеющуюся 3D-модель зданий и сооружений объекта [5], позволяют оператору выработать навыки ориентации в пространстве через получение представлений о внешнем виде объекта в неестественном для человека тепловом канале, о характере теплового излучения различных инфраструктурных элементов в нормальном режиме эксплуатации здания, и т.д.

В настоящее время в СМП ЧС внедряется информационный модуль о персонале, работающем в опасных условиях. Сотрудники, работающие с опасными биологическими материалами, в обязательном порядке до и после работы проходят медосмотр, включая термометрирование. В целях объективизации этой процедуры, минимизации влияния человеческого фактора и надлежащего документирования используется тепловизор Flir E60, фотографирующий работника в ИК и видимой области спектра, что позволяет не только бесконтактно регистрировать температуру тела, но и одновременно идентифицировать работника. Оборудование позволяет формировать отчет о проведенных измерениях в виде файла PDF, содержащего следующую информацию: ФИО работника, дата и время и условия проведения измерения, цветное фото работника в видимом и инфракрасном спектре (Рис. 4).

Кроме того, первая версия системы СМП ЧС была дополнена её вариантом с интерфейсом, адаптированным к работе с широкоформатными экранными устройствами типа TouchTable, использующими сенсорный механизм управления (Рис. 5).



Рисунок 4 - Бесконтактное измерение температуры тела работника с помощью тепловизора Flir E60. Слева направо: экран прибора с изображением в ИК-диапазоне; снимок в видимой области спектра; пример выходного протокола измерения.



Рисунок 5 - Вариант системы, адаптированный к использованию на широкоформатных устройствах типа «Тачтэйбл».

Таким образом, новая версия системы СМП ЧС в ГНЦ ПМБ дополнена приложением «Учебный 3D курс: инфраструктура ГНЦ ПМБ» и системой мониторинга здоровья персонала, работающего с биологически опасными объектами, а также вариантом геоинтерфейса, адаптированным для работы на широкоформатном тачтэйбле с сенсорным управлением. Первый модуль существенно расширяет визуализацию инфраструктуры и оперативной обстановки на опасном объекте, включая информацию о персонале. В перспективе предусматривается подключение к системе модулей мониторинга тепло- и энергоснабжения, локальной метеостанции и веб-камер, расположенных на территории объекта и внутри труднодоступных помещений для контроля работы инженерных систем. Завершение этих работ позволит создать комплексный современный инструмент для мониторинга обстановки на опасном биологическом объекте.

Одной из важных задач, решение которой стало необходимым после неожиданного решения компании Google Earth о полном и срочном блокировании сервисов Google Earth, стал переход на 288

использование непроприетарных программных продуктов с открытым исходным кодом, использование которых в минимальной степени будет зависеть от зарубежных поставщиков. Так, уже прекращена поддержка сервиса Google Earth API, который на протяжении 10 лет был фактически единственным средством обеспечения на практике режима Ситуационной Осведомлённости. В настоящее время ведётся критический анализ имеющихся на рынке геоинтерфейсов с открытым исходным кодом с целью выработки оптимальной стратегии поэтапного снижения зависимости от зарубежных поставщиков и составления поэтапного плана ликвидации зависимости от сервисов Google.

Полученный в ходе выполнения этой работы опыт может быть тиражирован на другие опасные биологические объекты: научно-исследовательские учреждения и производственные предприятия, захоронения животных (скотомогильники), отдельные участки территорий природных очагов возбудителей инфекционных заболеваний

Литература:

1. Тюрин Е.А. Разработка алгоритма оценки биологических угроз методами неогеографии / Тюрин Е.А., Говорунов И.Г., Шишкина О.Б., Ерёмченко Е.Н. // Жизнь без опасностей. - 2012. - №9. - С. 74-81.
2. Ерёмченко Е.Н. Неогеография: особенности и возможности / Ерёмченко Е.Н. // Материалы конференции «Неогеография XXI-2008». - 2008. - С. 22-25.
3. Ерёмченко Е.Н. Неогеография и Situational Awareness / Ерёмченко Е.Н. // Материалы конференции «Неогеография XXI-2009». - 2009. - С. 21-24.
4. Ерёмченко Е.Н. Противоречивость и несогласованность пространственно-временных данных: возможность решения проблемы в геоинформационной среде / Ерёмченко Е.Н., Тикунов В.С., Сун Ч.Г. // Геодезия и картография. - 2013. - №4. - С. 41-47.
5. Вирясов С.Н. Пространственное моделирование биологически опасных объектов / Вирясов С.Н., Говорунов И.Г., Ерёмченко Е.Н., Тюрин Е.А. // Инфекционные болезни. - 2012. - Т. 10. - С. 100-101.

## КРИТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРИМЕНЕНИЯ ХЛОРГЕКСИДИНА КАК КОЖНОГО АНТИСЕПТИКА

**Квашнина Д.В.**

*ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород*

**Введение.** Достижению высоких результатов в решении проблемы профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, имеющей государственное значение, способствует стандартизация всех компонентов системы эпидемиологической безопасности. Элементом данной структуры является эпидемиологическая безопасность медицинских технологий, определяющаяся стерильностью применяемых медицинских изделий и материалов, асептичностью выполнения операций, манипуляций и процедур и др.[1,2] Согласно требованиям регламентирующих документов, для обработки рук медицинского персонала необходимо применять кожный антисептик.[3,4] Средства на основе хлоргексидина биглюконата нашли свою востребованность в практическом здравоохранении. Однако, в свете все чаще появляющихся сообщений о выявлении резистентности микроорганизмов к этому бигуаниду, вопрос безопасности и эффективности данной группы препаратов остается актуальным [5-11]

**Цель исследования.** Критически оценить применение хлоргексидина (ХГ) как антисептика с точки зрения эпидемиологической безопасности медицинской деятельности.

**Материалы и методы.** Исследование носило комплексный характер и включало:

1) маркетинговые (фармакоэкономические) исследования госпитального сегмента регионального рынка АС (антисептических средств) - за 4 года, по данным специализированного запроса и расширенным годовым отчётам по профилактической и противоэпидемической работе 120 медицинских организаций (МО); 2) аналитические исследования дезинфицирующих и антисептических средств по данным Национального справочно-аналитического портала о дезсредствах, зарегистрированных на территории РФ - [www.dezreestr.ru](http://www.dezreestr.ru); 3) анализ данных регионального мониторинга устойчивости возбудителей внутрибольничных инфекций к дезинфектантам и АС, база данных Центра мониторинга устойчивости НИИ профилактической медицины НижГМА (95 штаммов микроорганизмов); 4) микробиологические методы оценки эффективности АС по стандартным методикам (Руководство Р 4.2.2643-10) и проведение лабораторного эксперимента по разработке новой методики оценки чувствительности микроорганизмов к АС.

**Результаты.** Согласно исследованиям рынка дезинфицирующих и антисептических средств, наибольшая доля антисептиков относится к группе комбинированных препаратов спиртов и ЧАС, антисептики на основе гуанидинов и гексидинов занимают четвертое и пятое место соответственно (<http://www.dezreestr.ru>). Маркетинговые исследования госпитального сегмента рынка АС в Нижегородском регионе, также свидетельствуют о лидировании по объемам закупок композиционных препаратов «изопропиловый спирт+ЧАС» (6-8 торговых наименований), доля в структуре закупаемых антисептиков – 54,29%, второе место занимают антисептики с хлоргексидином в качестве действующего вещества- 15,71% (Рис.1).

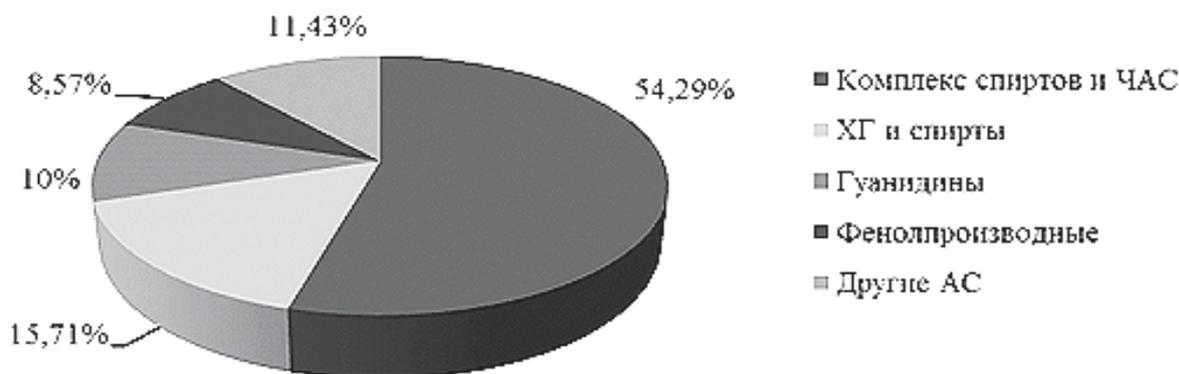


Рисунок 1. Распределение по составу композиционных антисептиков, применяемых в Нижегородской области (по объему закупок).

Таким образом, хлоргексидин, наряду со спиртами, - одно из наиболее востребованных химических соединений в составе АС. Подобные результаты не случайны, так как согласно проведенному в исследовании анализу, целый ряд зарубежных и отечественных национальных клинических рекомендаций, руководств по практической деятельности и других документов определяют применение хлоргексидина как предпочтительное [12-21].

Основными недостатками существующих рекомендаций являются: применение растворов хлоргексидина без указания растворителя и/или концентрации действующего вещества; применение с одной и той же целью разных препаратов хлоргексидина (например, для гигиены рук рекомендуется использовать спиртосодержащие средства в концентрациях хлоргексидина от 0,5 до 4%)

Подобные несоответствия определяют неверную тактику поведения медицинского персонала при выборе АС, и как следствие неэффективное применение биоцида, проявляющееся не только в отсутствии требуемого результата, но и в приобретении резистентности микроорганизмов к ХГ. При использовании заниженной концентрации раствора ХГ снижается проницаемость цитоплазматических мембран микроорганизмов, происходит утечка ионов калия, фосфат-ионов

и протонов, торможение дыхательных процессов и транспорта веществ, изменяется содержание, метаболизм, осмотическая активность ферментов. Изменение целостности мембран отражает бактериостатический эффект хлоргексидина и является обратимым [22].

По результатам выборочных исследований устойчивости микроорганизмов к ХГ (в рамках регионального мониторинга), в 47,4% случаев (95%ДИ 37,2 – 57,6) клинические штаммы микроорганизмов проявляли устойчивость (Таблица).

Таблица  
Результаты выборочных исследований устойчивости микроорганизмов к ХГ

Микроорганизмы	Количество исследованных штаммов	Количество устойчивых штаммов	% (от числа исследованных микроорганизмов данного вида)	95%ДИ
<i>S.aureus</i>	20	9	45,0	22,8 – 67,2
<i>S.epidermidis</i>	20	7	35,0	13,7 – 56,3
<i>S.saprophyticus</i>	5	2	40,0	
<i>E.agglomerans</i>	15	1	6,7	0 – 19,6
<i>E.aerogenes</i>	5	1	20,0	
<i>K.pneumoniae</i>	5	5	100	
<i>P.mirabilis</i>	5	5	100	
<i>P.aeruginosa</i>	5	5	100	
<i>A.baumani</i>	15	10	66,7	42,4 – 97,3
<b>Всего</b>	<b>95</b>	<b>45</b>	<b>47,4</b>	<b>37,2 - 57,6</b>

Устойчивость отмечалась у всех видов протестированных микроорганизмов, но распространенность была разной. Все протестированные штаммы *K.pneumoniae*, *P.mirabilis*, *P.aeruginosa* были устойчивы к ХГ, это были единичные штаммы, что не позволяет пока сделать обоснованные выводы. Среди стафилококков устойчивость к ХГ была распространена на уровне 45,0% (95%ДИ 22,8 – 67,2) у *S.aureus* и 35,0% (95%ДИ 13,7 – 56,3) у *S.epidermidis* (Рис 2).

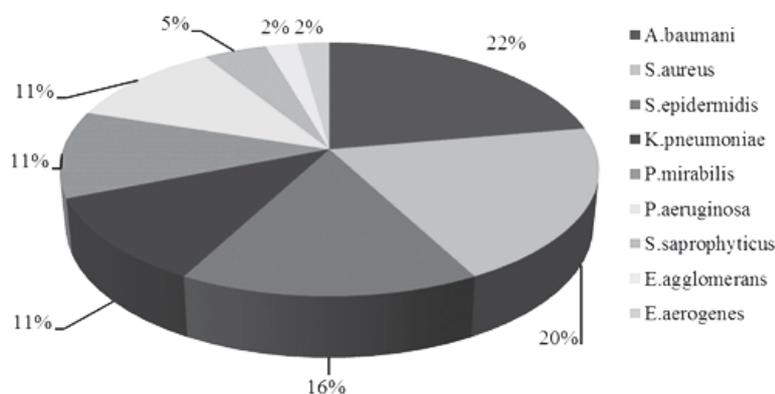


Рис.2. Структура микроорганизмов, устойчивых к ХГ при проведении выборочных исследований резистентности

## Выводы.

Среди применяемых в медицинских организациях антисептиков средства на основе хлоргексидина занимают одно из лидирующих позиций и по ассортименту, и по объему закупок на региональном рынке.

Нормативно-методическая база по применению хлоргексидина нуждается в корректировке и стандартизации.

На основе выборочных исследований в рамках регионального мониторинга выявлена распространённая устойчивость к хлоргексидину среди клинических штаммов разных видов микроорганизмов на уровне 47,4% (95%ДИ 37,2 – 57,2), что требует более углубленного изучения и накопления фактических данных.

Проблема возрастающей резистентности микроорганизмов к антисептическим средствам в целом, и к ХГ, в частности, является актуальной для здравоохранения, и определяет необходимость включения в мониторинг устойчивости к антимикробным препаратам тестирование на применяемые в медицинской организации антисептики на регулярной основе.

## Литература:

1. Критерии эпидемиологической безопасности медицинской помощи / Н.И. Брико, Е.Б. Брусина, Л.П. Зуева, Г.Е. Ефимов, О.В. Ковалишена, В.Л. Стасенко, И.В. Фельдблюм, В.В. Шкарин // Медицинский альманах. - 2014. - Т.34, № 4. - С. 8-13.

2. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи и информационный материал по ее положениям / В.И. Покровский, В.Г. Акимкин, Н.И. Брико, Е.Б. Брусина, Л.П. Зуева, О.В. Ковалишена, В.Л. Стасенко, А.В. Тутельян, И.В. Фельдблюм. - Н.Новгород: Ремедиум Поволжье, 2012. – 84 с.

3. СанПиН 2.1.3.2630-10. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы "Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность". - Введ. 2010-05-07. - М. : Издательство стандартов, 2010. - 180 с.

4. Любимова, А.В. Гигиена рук медицинского персонала: федеральные клинические рекомендации / А.В. Любимова, Л.П. Зуева, А.А. Голубкова., И.Г. Техова. – М., 2014. – 31 с.

5. Extremely high prevalence of antiseptic resistant Quaternary Ammonium Compound E gene among clinical isolates of multiple drug resistant *Acinetobacter baumannii* in Malaysia / Babaei M, Sulong A, Hamat R, Nordin S, Neela V. // Annals of clinical microbiology and antimicrobials - 2015. - Т.14. - С.11

6. Suwantarat N. et al. High prevalence of reduced chlorhexidine susceptibility in organisms causing central line-associated bloodstream infections // Infect Control Hosp Epidemiol. - 2014. - Vol. 35, № 9. - P. 1183–1186.

7. Taha M. et al. Biofilm-forming skin microflora bacteria are resistant to the bactericidal action of disinfectants used during blood donation // Transfusion. - 2014. - Vol. 54, № 11. – P. 2974-2982

8. Schlett C.D. et al. Prevalence of chlorhexidine-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* following prolonged exposure // Antimicrob. Agents Chemother. 2014. - Vol. 58, № 8. - P. 4404–4410.

9. Prag G. et al. Decreased susceptibility to chlorhexidine and prevalence of disinfectant resistance genes among clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* // APMIS. - 2014. - Vol. 122, № 10. - P. 961–967.

10. Johnson J.G. et al. Frequency of disinfectant resistance genes in pediatric strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // Infect Control Hosp Epidemiol. - 2013. - Vol. 34, № 12. - P. 1326–1327.

11. Nakipoğlu Y. et al. The prevalence of antiseptic resistance genes (*qacA/B* and *smr*) and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* strains // Mikrobiyol Bul. - 2012. Vol. 46, № 2. - P. 180–189.

12. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. / O'Grady NP, Alexander M, Burns LA, Dellinger EP, Garland J, Heard SO, Lipsett PA, Masur H, Mermel LA, Pearson ML, et al. // Am J Infect Control. – 2011. - №39. – S.1–34.

13. National Health and Medical Research Council (NHMRC) Australian guidelines for the prevention and control of infection in healthcare. [Электронный ресурс]. - Australian Government. – 2010. – Режим доступа : <http://www.nhmrc.gov.au>

14. Surgical Care and Outcomes Assessment Program (SCOAP) (2010) SCOAP Community speaks up: chlorhexidine use. [Электронный ресурс]. Режим доступа : <http://scoap.wordpress.com/2010/03/17/chlorhexidine> Accessed 3 Feb 2012.
15. National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) (2011) Review proposal consultation of clinical guideline CG74 Surgical Site Infection. [Электронный ресурс]. Режим доступа <http://guidance.nice.org.uk/CG74/ReviewProposal> Accessed 3 Feb 2012.
16. Loveday H.P. epic3: National Evidence-Based Guidelines for Preventing Healthcare-Associated Infections in NHS Hospitals in England // Journal of Hospital Infection. - 2014. - № 86,S1. - P. 1–70.
17. Клиническая хирургия. Национальное руководство. В 3-х т. Т.2 (+ CD-ROM) / под редакцией В.С. Савельева, А.И. Кириенко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 846 с.
18. Биккулова, Д. Ш. Профилактика катетер-ассоциированных инфекций кровотока и уход за центральным венозным катетером (ЦВК) : федеральные клинические рекомендации / Д.Ш. Биккулова, Д.В. Заболотский, О.Н. Ершова, В.В. Калабухов, Н.И. Брико. – М., 2014. – 20 с.
19. Профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в акушерских отделениях / стационарах. Руководство / Н.В. Вертапетова, А.В. Карпушкина, Н.И. Брико [и др.]. – М.: Института здоровья семьи, 2012. – 184 с.
20. Интенсивная терапия. Национальное руководство. В 2-х т. / Б.Р. Гельфанд., А.И. Салтанов А.И. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009
21. Руководство ВОЗ по гигиене рук в здравоохранении. Всемирная организация здравоохранения, 2013 [Электронный ресурс]. Режим доступа [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70126/21/WHO\\_IER\\_PSP\\_2009.07\\_rus.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70126/21/WHO_IER_PSP_2009.07_rus.pdf)
22. Зверьков, А.В. Хлоргексидин: прошлое, настоящее и будущее одного из основных анти-септиков / А.В. Зверьков, А.П. Зузова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – Т.15, №4. - С.279-285.

## **К ВОПРОСУ ОБ УРОВНЕ МИКОГЕННОЙ КОНТАМИНАЦИИ БОЛЬНИЧНЫХ ЗДАНИЙ И ПОДХОДАХ К ЕЕ НОРМИРОВАНИЮ НА ПРИМЕРЕ ОДНОГО ИЗ МНОГОПРОФИЛЬНЫХ МЕДИЦИНСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ НИЖНЕГО НОВГОРОДА**

**Кряжев Д.В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского»,  
<sup>2</sup>ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород

Состояние здоровья человека характеризуется зависимостью от многих факторов различной природы, которые агрессивно могут воздействовать в период ухудшения здоровья – нарушения функций органов и систем [1]. Состояние здоровья на 20-25% определяется качеством среды и на 50% - условиями и образом жизни [2]. Согласно литературным данным городской житель конца прошлого века основную часть времени (от 75 до 95%) находился внутри зданий [3]. Вероятно, этот показатель будет составлять не менее 80-90% и в 21 веке [4]. Поэтому большое значение придается высокому качеству внутренней среды построек. В то же время около 30% населения, проживающего как в новых, так и в отреставрированных домах, испытывает аллергический насморк, ощущения слабости, сонливости, першения в горле, головокружения. В 5% случаев наблюдающиеся аллергические реакции и болезненные состояния непосредственно связаны с определенной микробиологической средой помещения, а в 53% случаев – с неэффективными вентиляционными системами, в которых также могут скапливаться микроорганизмы, чаще всего – микромицеты [5]. В последнее время значительное внимание уделяется «синдрому нездоровых зданий» (sick building syndrome) – комплексу неспецифических аллергических сим-

птомов, наблюдаемых у людей, работающих и проживающих в зданиях с нарушениями вентиляции, гидроизоляции, температурного и санитарно-гигиенического режима [6]. В Швеции среди служащих офисов более 30% мужчин и более 50% женщин постоянно отмечают у себя хотя бы один из симптомов синдрома нездоровых зданий. Известны факты, свидетельствующие о роли микроскопических грибов в развитии этого явления [7].

Присутствие микромицетов и их метаболитов в окружающей среде оказывает токсическое действие, развивает микозы, и аллергических реакций [8]. Многочисленные исследования свидетельствуют об увеличении интенсивности микогенной сенсibilизации [9]. Различная концентрация спор микроскопических грибов оказывает влияние на развитие аллергических заболеваний у пациентов, имеющих повышенную чувствительность к грибным аллергенам. В сыром жилье, пораженном микроскопическими грибами, люди наиболее подвержены респираторным заболеваниям, у жильцов ряда других зараженных микромицетами домов зафиксированы частые явления астмы, нейродермита, раздражения слизистой оболочки рта и носа. В качестве возможных механизмов поражения рассматриваются аллергические, раздражающие, токсические эффекты с участием спор, летучих метаболитов или микотоксинов микроскопических грибов [10]. Лечебно-профилактические учреждения, как правило, находятся в населенных пунктах, большинство крупных больниц расположены в городах, поэтому больничные здания испытывают все влияния большого города, в том числе постоянный микробный прессинг. Сосредоточение в лечебных учреждениях больных групп высокого риска развития нозокомиальных инфекционных заболеваний, в том числе инвазивных микозов с непредсказуемым, часто летальным, исходом диктует необходимость введения не только пределов микогенной загрязненности помещений, но и строгого контроля выполнения установленных требований. В то же время, следует учесть, что не только в России, но и в других странах, несмотря на интенсивные поиски, не установлены единые уровни допустимой микробной загрязненности помещений. Для больных с предрасположенностью к атопии пороговая концентрация спор микроскопических грибов в воздухе составляет всего 10 КОЕ/м<sup>3</sup>. Нахождение этих же пациентов в помещении, где численность грибов родов *Alternaria* и *Cladosporium* нарастает выше 80–100 и 2800–3000 КОЕ/м<sup>3</sup> воздуха, соответственно, может привести к развитию приступов бронхиальной астмы [11, 12]. Для здоровых людей этот показатель может быть на много порядков выше и составлять 106–109 КОЕ/м<sup>3</sup>. В региональном отчете Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) за 1990г. пороговой концентрацией спор в воздухе жилых помещений было предложено считать 500 КОЕ/м<sup>3</sup> воздуха, превышение которой может привести к развитию приступов бронхиальной астмы у лиц с предрасположенностью к атопии [13].

В настоящее время отечественными и зарубежными микологами делаются попытки установления не только цифровой градации оценки микробной контаминации, но и поиски балльной системы, учитывающей все факторы особенностей эксплуатации помещений. Для решения этих вопросов необходимо знание видового состава, биологии грибов, непосредственно окружающих человека.

Целью нашей работы являлось исследование состава микобиоты воздуха помещений в одном из многопрофильных медицинских учреждений Нижнего Новгорода с последующей оценкой полученных данных в соответствии с наиболее распространенными классификациями уровней микогенной контаминации различных помещений.

**Материалы и методы.** Посев воздуха осуществляли с помощью импакторного пробоотборника ПУ-1Б на пластинки агара Чапека-Докса в стерильные чашки Петри, в режиме 100 л/мин или 250 л/мин в зависимости от класса чистоты помещения. Чашки Петри инкубировали в термостате при температуре 28°C. В лабораторных условиях подсчитывали количество жизнеспособных спор микромицетов в пробах и вычисляли содержание колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1000 л воздуха (1м<sup>3</sup>), – показатель микогенной контаминации воздуха, применяемый в санитарной микробиологии. Видовую идентификацию микромицетов проводили по морфологическим признакам с использованием стандартных определителей. Также использовали микроскоп БИОЛАМ Р-15 и микроскоп стереоскопический МБС-9.

Для интерпретации наших данных по содержанию спор микромицетов в воздухе использо-

вали Европейскую классификацию (проект ECA COST 613 19930) [14], классификацию уровней микогенной контаминации воздуха для жилых помещений в США (по данным Американского Национального Аллергологического Бюро) [15] и отечественный СанПиН 2.1.3.1375-03 «Гигиенические требования к размещению, устройству, оборудованию и эксплуатации больниц, родильных домов и других лечебных стационаров».

Данные количественной оценки уровня контаминации воздуха плесневыми грибами в одном из многопрофильных медицинских учреждений Нижнего Новгорода представлена в таблице 1.

**Результаты и обсуждение.** В результате микологического обследования нами были выделены в чистую культуру пять наиболее часто встречаемых культур микромицетов, идентифицированные нами как: *Aspergillus niger*, *Alternaria longipes*, *Fusarium gibbosum*, *Cladosporium elatum*, *Penicillium simplicissimum*. Следует отметить, что большинство выделенных нами видов относятся к наиболее важным источникам аллергенов – различные виды *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium* [16]. Видимые очаги роста микроскопических грибов во всех обследованных нами помещениях, в том числе «чистых» и «условно-чистых» [17] отсутствовали. Однако, несмотря на это в воздухе помещений урологического отделения не наблюдалось превышения пороговой концентрации спор микромицетов установленной ВОЗ только в перевязочных кабинетах; во всех остальных наблюдалось превышение норматива от 1,02 до 1,9 раз.

В палате трансплантологического отделения наблюдалось превышение пороговой концентрации в 1,2 раза и в кладовой чистого белья в 3,6 раз.

В перевязочном кабинете отделения рентгенохирургии превышение пороговой концентрации отсутствовало, однако, такое имело место в процедурном кабинете (в 1,4 раз) и в палате (в 1,9 раз).

В процедурном кабинете гинекологического отделения превышение пороговой концентрации также отсутствовало, однако оно отмечалось в палате (в 1,5 раза) и примыкающем коридоре (в 1,8 раз).

Вышеприведенные результаты показывают, что менее половины обследованных нами помещений соответствуют условно-допустимому значению концентрации спор, установленному ВОЗ, – в большинстве обследованных нами помещений наблюдается превышение условно-допустимого значения концентрации спор в 500 КОЕ/м<sup>3</sup> до 3,6 раз. Однако согласно ныне действующему СанПиН 2.1.3.2630-10 санитарно-микробиологические показатели в данных помещениях (согласно классу их чистоты) нормированию не подлежат, что с учетом полученных нами данных по микогенной контаминации больничных помещений, на наш взгляд, является ошибочным.

Учитывая вышеизложенные данные, а также, опираясь на наш многолетний опыт исследования микрофлоры воздуха различных помещений, считаем некорректным подход к уровню микробной контаминации, предлагаемый СанПиН 2.1.3.2630-10, не нормирующий количество КОЕ микромицетов в большинстве больничных помещений. Считаем, что такой подход затрудняет объективную оценку контаминации микроорганизмами больничных помещений. Поэтому в дальнейшем для более корректной интерпретации полученных данных мы решили обратиться к Европейской и Американской классификациям уровней контаминации воздуха микромицетами (см. табл.1). Как видно из таблицы нормативы данных классификаций в большинстве случаев не совпадают: американская классификация допускает более высокий уровень контаминации помещений микроскопическими грибами. Учитывая литературные данные [18] о пороговой концентрации КОЕ микромицетов для больных с предрасположенностью к атопии, более предпочтительной для оценки уровня микогенной контаминации больничных помещений является Европейская классификация.

Таблица 1

Уровень микогенной контаминации воздуха помещений одного из многопрофильных медицинских учреждений города Нижний Новгород

Содержание КОЕ/м <sup>3</sup>		Уровень концентрации спор в воздухе		
Место взятия проб	КОЕ/м <sup>3</sup>	СанПиН 2.1.3.2630-10	Американская классификация (по данным Американского Национального Аллергологического Бюро)	Европейская классификация (проект ЕСА COST 613 19930)
<b>Урологическое отделение</b>		не нормируется	низкий	средний
изолятор	892			
палата урологического отделения	780	не нормируется	низкий	средний
перевязочный кабинет	314	не нормируется	низкий	средний
процедурный кабинет	530	не нормируется	низкий	средний
кладовая чистого белья	686	не нормируется	низкий	средний
примыкающий коридор	856	не нормируется	низкий	средний
лестница	950	не нормируется	средний	средний
процедурный кабинет	804	не нормируется	низкий	средний
перевязочный кабинет	200	не нормируется	низкий	средний
кабинет дистанционной литопсии	510	не нормируется	низкий	средний
вестибюль	910	не нормируется	средний	средний
Консультативный кабинет	398	не нормируется	низкий	средний
Приемное отделение	886	не нормируется	низкий	средний
<b>Трансплантологическое отделение</b>		не нормируется	низкий	средний
перевязочный кабинет	292			
процедурный кабинет	278	не нормируется	низкий	средний
зал водоподготовки	138	не нормируется	низкий	низкий
примыкающий коридор	488	не нормируется	низкий	средний
палата трансплантологического отделения	614	не нормируется	низкий	средний
кладовая белья, комната сестры-хозяйки	1022	не нормируется	средний	высокий
<b>Отделение рентгенохирургии</b>		не нормируется	средний	средний
процедурный кабинет	928			
перевязочный кабинет	226	не нормируется	низкий	средний

палата отделения рентгенохирургии	700	не нормируется	низкий	средний
Гинекологическое отделение		не нормируется	низкий	средний
палата гинекологического отделения	886			
процедурный кабинет	160	не нормируется	низкий	низкий
примыкающий коридор	730	не нормируется	низкий	средний

Имеющиеся в литературе данные о концентрации микромицетов в помещениях различного назначения, регулярный контакт с которыми может привести к развитию заболеваний, противоречивы и единого мнения на этот счет пока не существует. Выработка общих, единых для всех людей нормативов оценки уровня контаминации воздуха плесневыми грибами больничных помещений представляется нам крайне затруднительной, поскольку механизмы патогенного воздействия грибов на человека различны. Необходимо также принимать во внимание индивидуальную чувствительность пациентов. По-видимому, более реально будет разрабатывать нормативы микогенной контаминации для групп людей, объединенных одной болезнью.

#### **Выводы**

1. В воздухе большинства обследованных нами помещений одного из многопрофильных медицинских учреждений г. Нижнего Новгорода, в том числе относящихся к категориям «чистых» и «условно-чистых» в больших количествах содержатся микроскопические грибы, относящиеся к ярко выраженным аллергенопродуцентам.

2. СанПиН 2.1.3.1375-03 «Гигиенические требования к размещению, устройству, оборудованию и эксплуатации больниц, родильных домов и других лечебных стационаров» не подходит для объективной оценки уровня микогенной контаминации больничных помещений, более предпочтительной в этом случае является Европейская классификация уровней микогенной контаминации воздуха различных помещений (проект ECA COST 613 19930).

3. При разработке отечественных нормативов, ранжирующих уровень концентрации спор микромицетов в воздухе больничных помещений наиболее оптимальным подходом будет разработка нормативов не для тех или иных помещений, а для групп людей с различным уровнем состояния здоровья или объединенных одной болезнью.

#### **Литература:**

1. Яцинюк Б.Б., Гемалова Н.А., Бебякина Е.Б., Киреева И.В. Грибковая контаминация в отделении реанимации // Современная микология в России. Том 3. Материалы 3-го съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии. С.199.
2. Ярыгин В.Н. Принципы оценки действия среды жизни на здоровье людей. // Бизнес и здоровье: Международная конференция. Асклепейон, 1994. №1. С. 68-70.
3. Казначеев В.Н., Прохоров Б.Б., Вишаренко В.С. Экология человека и экология города: комплексный подход // Сб. науч. работ «Экология человека в больших городах / Ред. О.А. Скарлато. Л.: АН СССР Зоол. Ин-т, 1988. С.12-17.
4. Шандала М.Г. Санитарно – гигиенические проблемы урбанизации / Экологические аспекты городских систем. Минск: Наука и техника, 1984. С.59-69.
5. Indoor air quality: Organic pollutants // WHO meeting, Berlin. 1989. №4. 70 p.
6. Старцев С.А. «Синдром больного здания» // Проблемы мед. микологии. 2002. Т.4, №2. С.74-79.
7. Miller J.D., Laflamme A.M., Sobol Y. et al. Fungi and fungal products in some Canadian houses // International Biodeterioration. 1988. V.24. P. 103-120.
8. Reponen T. Aerodynamic diameters and respiratory deposition estimates of viable fungal par-

ticles in mold problem dwellings // Aerosol Science and Technology, 1995. Т. 22, №1, p 11-23.

9. Патологическая физиология / Под. ред. А. Д. Адо и Л. М. Ишимовой М.: Медицина, 1980. – 400 с.

10. Nevabainen A., Hyvarinen A., Reponen T. et al. Exposure to fungi and respiratory symptoms in moldy buildings // Human and Exp. Toxicol. 1994. V.13, №11, P.810.

11. Bagni N., Davies R.R., Mallea M., et al. Sporenkonzentrationen in Stadten der Europaischen Gemeinschaft (EG) // Acta Allergol. -1977.- Vol.32.- P.118-138.

12. Rapijko P., Stanlaewicz W., Szczygielski K., Jurkiewicz D. Threshold pollen count necessary to evoke allergic symptoms // Otolaryngol. Pol.- 2007.- Vol.61, №4.- P.591-594.

13. WHO. Indoor air quality: biological contaminants// Report on a WHO meeting. Copenhagen: WHO Regional publications. -1990. -№31.- P.1-67.

14. Антропова А.Б., Мокеева В.Л., Биланенко Е.Н. и др. Аэромикота жилых помещений г. Москвы // Микология и фитопатология.- 2003.- Т.37, Вып.6.- С.1-11.

15. Петрова-Никитина А.Д., Мокеева В.Л., Желтикова Т.М. и др. Микобиота домашней пыли г. Москвы // Микология и фитопатология. -2000. - Т.34, вып.3.- С.25-33.

16. Маянский А.Н. Патогенетическая микробиология: руководство/ А.Н. Маянский. – Н. Новгород: Издательство Нижегородской государственной медицинской академии, 2006. – 520с.

17. Биоповреждение больничных зданий и их влияние на здоровье человека. / П.ред. А.П. Щербо и В.Б. Антонова. С-Пб. 2008. 232 с.

18. Lacey J. Occupational and environmental factors in allergy / In: Allergy' 74.Ganderton M.A., Frankland A.W. eds. - London: «Pitman», 1975. - P.303-319.

## **СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ**

**Посоюзных О.В., Катаева Л.В.**

*ФБУН Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной  
патологии Роспотребнадзора, Тюмень*

С появлением и распространением устойчивых микроорганизмов к дезинфицирующим средствам (ДС) происходит снижение эффективности дезинфекционных мероприятий. Для предупреждения этого явления предложено установить контроль над циркуляцией устойчивых к дезинфектантам штаммов микроорганизмов и проводить мониторинг в медицинских организациях. Ожидается, что введение этой меры должно повысить эффективность противомикробных мероприятий и затормозить селекцию и распространение устойчивых к дезсредствам популяций бактерий в окружающих человека экологических средах [1,2,3].

Для определения чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам предложено несколько методов, в том числе и по определению зоны ингибирования роста бактериальной культуры при использовании диско-диффузионного метода [4,5]. Но авторы этих методов не предлагают стандартные таблицы зон ингибирования различных групп микроорганизмов для оценки их чувствительности к исследуемым дезинфицирующим средствам.

Поэтому целью данного исследования явилась разработка способа количественной оценки бактерицидной активности дезинфицирующих средств.

Для предлагаемой методики использовались следующие расходные материалы: испытуемые культуры, стандартные ДС, стерильные бумажные диски, питательные среды - среда Миллера-Хинтона, Эндо для грамотрицательных бактерий, желточно-солевой агар для стафилококков, скошенный 1,5% МПА, 0,9% раствор хлорида натрия, дозатор пипеточный, стерильные наконечники для дозатора, стерильная лабораторная посуда. Для определения мутности

суспензии микроорганизмов применялись денсильметр или стандарт мутности по МакФарланду.

Исследования бактерицидной активности ДС проводились с типичными по своим морфологическим, культуральным, тинкториальным, биохимическим свойствам штаммами: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* выделенных с помощью стандартных бактериологических методик.

Чувствительность микроорганизмов определяли к 6 зарегистрированным для применения в России дезинфицирующим средствам различных химических групп. Растворы дезинфицирующих средств в экспериментах использовались в концентрациях, согласно инструкциям по их применению. Были исследованы дезинфицирующие средства следующих химических групп:

- кислородсодержащие: «Пероксимед», в качестве действующего вещества содержит водорода пероксид в количестве 30%; кроме того, в его состав входят ингибиторы коррозии и компоненты, придающие моющие свойства;

- альдегидсодержащие: «Лизоформин-3000», действующее вещество: 9,5% глутаровый альдегид и 7,5% глиоксаля; «Лизафин», действующее вещество: 30% алкилдиметилбензиламмоний хлорида, 0,5% глутарового альдегида, 5% глиоксаля; 8% спирт денатурированный, синтанол;

- соединения на основе катионных поверхностно-активных веществ (КПАВ): «Соната», действующее вещество: 15% ЧАС; «Соната-Дез», действующее вещество: 25% ЧАС;

- четвертично-аммониевые соединения: «Аламинол», в качестве действующих веществ в состав средства входят 5% алкилдиметилбензиламмоний хлорида (ЧАС) и 8% глиоксаля, а также поверхностно-активное вещество, краситель и вода.

Количество исследуемых проб рабочих растворов ДС представлено в таблице 1.

Таблица 1

Количество исследованных проб рабочих растворов дезинфицирующих средств

Название химических групп ДС	Представитель группы	Количество проб, шт.
Кислородсодержащие	«Пероксимед»	110
Альдегидсодержащие	«Лизоформин-3000»	110
	«Лизафин»	107
КПАВ	«Соната»	110
	«Соната-Дез»	110
ЧАС	«Аламинол»	110
Итого		657

Сроки и условия хранения готовых рабочих растворов должны строго соответствовать требованиям инструкции по применению для каждого конкретного вида ДС. При проведении каждого исследования необходимо проводить контроль контаминации и концентрации рабочего раствора ДС.

Для приготовления рабочей суспензии исследуемого штамма бактерий использовали чистую суточную агаровую культуру. Микробную массу брали бактериологической петлей с плотной питательной среды и помещали в стеклянную пробирку, содержащую 4,5 мл стерильного 0,9% раствора хлорида натрия, тщательно гомогенизируя. Исходную бактериальную суспензию оставляли на 15 минут для осаждения не гомогенизированных конгломератов и частиц. Полученную надосадочную жидкость переносили в стерильную пробирку, постепенно добавляя по каплям стерильный 0,9% раствор хлорида натрия. Плотность инокулюма точно доводили до концентрации  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. Практически, наиболее приемлемым методом оценки концентрации бактериальной суспензии является измерение оптической плотности. Значение оптической плотности бактериальной суспензии 0,1 (концентрация  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл), измеряемой на денсильметре, соответствует стандарту мутности 0,5 по МакФарланду.

При каждой постановке реакции осуществлялся бактериологический контроль фактического количества живых клеток бактерий в приготовленной суспензии, а также контроль чистоты роста культуры, поскольку в суспензии могут присутствовать мертвые микроорганизмы, которые, как и живые, будут давать изменение ее оптической плотности. С учетом этого, при необходимости, могут быть внесены коррективы, позволяющие обеспечить требуемые уровни концентрации бактериальной суспензии жизнеспособными клетками.

Приготовленную бактериальную суспензию исследуемой культуры высевали на плотную питательную среду - агар Миллера-Хинтона. Стерильный ватный тампон погружали в пробирку с бактериальной суспензией, тщательно смачивали, отжимали о стенки пробирки. Ватным тампоном наносили бактериальную взвесь на чашки Петри со средой Миллера-Хинтона (глубина агарового слоя в чашке должна быть 4,0 мм) плотными штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°. Засевали одну чашку - для постановки дисков, вторую для контроля контаминации исследуемого штамма.

Затем пропитанные дезинфицирующим раствором стерильные диски наносили на газон. Для этого стерильный бумажный диск помещали в стерильную чашку Петри, исследуемый ДС в количестве 10 нл дозатором наносили на диск и по прошествии 1 минуты (время, необходимое для пропитывания диска дезраствором) диск переносили стерильным пинцетом на чашку Петри с засеянной культурой. Чашки помещали в термостат и инкубировали при 37°C в течение 16-24 часов.

Параллельно ставили контроль количества выросших колоний при совместном культивировании испытуемого штамма бактерий и дезинфицирующего средства с учетом времени экспозиции, указанного в инструкции по применению. По истечении времени экспозиции содержимое из пробирки удаляли и вносили 1,0 мл раствора нейтрализатора и перемешивали встряхиванием; затем 0,1 мл смеси высевали на твердую питательную среду Эндо или ЖСА в зависимости от вида исследуемого штамма. Чашки помещали в термостат и инкубировали при 37°C в течение 16-24 часов.

Учет результатов воздействия ДС на микроорганизм производили по истечении времени инкубации, регистрировали диаметр зоны задержки роста (в мм) (просветления) вокруг диска, и количество колоний. Результаты исследования отражены в таблицах 2, 3.

Таблица 2

Среднее значение диаметра зоны задержки (мм) роста микроорганизмов

Виды дезинфектантов	S. aureus		Escherichia coli		Pseudomonas aeruginosa		Итого
	Количество исследований	Зона задержки	Количество исследований	Зона задержки	Количество исследований	Зона задержки	
Пероксид	110	38,5	110	27,6	110	30,1	32,1
Соната	110	23,0	110	15,6	110	12,7	17,1
Лизафин	107	20,5	107	14,4	107	8,4	14,4
Соната-Дез	110	28,4	110	15,9	110	10,1	18,1
Аламинол	110	31,0	110	15,8	110	8,1	18,3
Лизоформин	110	23,7	110	9,9	110	5,5	13,0
Итого	657	27,5	657	16,5	657	12,5	18,8

На большом количестве штаммов бактерий *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и различных концентраций дезинфицирующих средств проведены параллельные исследования чувствительности указанных штаммов к дезинфицирующим средствам по зоне задержки роста вокруг диска и количеству выросших колоний после воздействия ДС.

Статистический анализ произведен в программе SPSS. Сопоставление средних значений количества проросших колоний и зон задержки роста бактерий вокруг дисков показало, что между этими показателями отмечается обратная зависимость. Наибольшая зона задержки роста бактериальной культуры соответствует меньшему количеству выросших колоний на контрольной чашке.

Среднее количество проросших колоний микроорганизмов при взаимодействии с ДС

Виды дезинфектантов	Staphylococcus aureus		Escherichia coli		Pseudomonas aeruginosa		Итого
	Количество определений	Количество проросших колоний	Количество определений	Количество проросших колоний	Количество определений	Количество проросших колоний	
Пероксимед	110	0,0	110	0,0	110	0,0	0,0
Лизафин	107	0,0	107	1,0	107	1,0	2,0
Лизоформин	110	0,0	110	10,0	110	2,0	12,0
Соната	110	4,0	110	28,0	110	16,0	48,0
Соната-Дез	110	8,0	110	60,0	110	11,0	79,0
Аламинол	110	43,0	110	110,3	110	113,4	266,7
Итого	657	55,0	657	209,3	657	143,4	407,7

Описанный способ количественной оценки бактерицидной активности различных химических групп ДС оформлен в изобретение Патент РФ №2510610 от 10.04.2014 [6].

Таким образом, получены числовые характеристики зон задержки роста бактериальных культур при воздействии дезинфицирующих средств на исследованные группы микроорганизмов (Табл. 4.).

Таблица 4

Количество исследований чувствительности микроорганизмов к дезинфицирующим веществам по зоне задержки роста и количеству проросших колоний

Показатели	Виды бактерий	N	Среднее	Стд. отклонение	Стд. ошибка	95% доверительный интервал для среднего	
						Нижняя граница	Верхняя граница
Зона задержки в мм	Staphylococcus aureus	657	27,51	10,22	0,39	28,15	29,69
	Escherichia coli	657	16,53	8,01	0,31	16,43	17,63
	Pseudomonas aeruginosa	657	12,48	10,19	0,39	12,49	14,02
Количество проросших колоний с ДС	Staphylococcus aureus	657	55,00	24,22	0,95	1,90	5,61
	Escherichia coli	657	209,30	63,76	2,49	14,24	24,01
	Pseudomonas aeruginosa	657	143,40	99,37	3,88	46,48	61,71

Результаты нашего исследования также показали, что испытуемые штаммы бактерий были наиболее чувствительными к Пероксимеду (кислородсодержащее ДС), альдегидсодержащие и катионные поверхностно-активные вещества оказывали неполное бактерицидное действие только в минимальных концентрациях. Четвертично-аммониевые соединения проявляли суббактерицидное действие в минимальных концентрациях и неполное бактерицидное – в максимальных концентрациях.

Использование диско-диффузионного метода позволяет достичь быстрой оценки эффективности ДС, особенно в отношении штаммов, актуальных для медицинских организаций, и способствует дифференцированному выбору дезсредства для правильного проведения противоэпидемических мероприятий.

Литература:

1. Гудкова Е.И., Красильников А.П. Методика определения и показатели чувствительности (устойчивости) бактерий к дезинфектантам // Клиническая лаб. диагностика. – 1994. – № 6. С. 48-50.
2. Леви М.И., Сучков Ю.Г. Ускоренный и упрощенный способ определения антибактериальной активности дезинфекционных средств // Дезинфекционное дело. – 1999. – №3. С. 30-33.
3. Методические рекомендации по ускоренному определению устойчивости бактерий к дезинфекционным средствам. Утверждены руководителем департамента госсанэпиднадзора Минздрава России А.А. Монисовым 10.01.2000 г. за №1100-26-0-117.
4. Афиногенов Г.Е., Краснова М.В., Афиногенова А.Г. Сравнение методов оценки эффективности дезинфектантов и антисептиков // Дезинфекционное дело. – 2008. – №4. С. 40-44.
5. Бондарев В.А., Алтайская Г.Б., Горбунова З.А. Организация работы Липецкого областного центра дезинфекции и стерилизации по определению активности дезинфектантов к различным видам микроорганизмов // Дезинфекционное дело. – 1999. – №2. С. 4-7.
6. Катаева Л.В., Корначев А.С., Посоюзных О.В. «Способ количественной оценки бактерицидной активности дезинфицирующих средств». Патент РФ №2510610 от 10.04.2014.

## ВЛИЯНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МОЮЩИХ СРЕДСТВ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

**Чекан Л.В., Шабалин Ю.А., Тюрин Е.А.**

*ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»  
Роспотребнадзора, Оболенск*

**Аннотация.** Настоящее исследование было проведено в связи с выявленными фактами снижения концентрации перекиси водорода в рабочих растворах, предназначенных для проведения дезинфекции, при использовании ряда современных моющих средств в качестве поверхностно активных веществ (ПАВ). Данные ПАВ содержащие препараты не соответствуют по составу средствам, рекомендованным в санитарных правилах СП 1.3.3118–13. Установлено, что современные моющие средства сложного состава (включающие, в частности, энзимы и химические отбеливатели) вызывают выраженное снижение концентрации перекиси водорода в рабочем растворе. Повышение температуры ускоряет этот процесс. В нашем исследовании это продемонстрировано на примере моющего средства «Пемос». При исследовании препарата «Сульфолон НП 1» отмечено снижение концентрации перекиси водорода, которому также способствует повышение температуры и длительности экспозиции, но в целом снижение выражено в значительно меньшей степени. Исследование моющей жидкости «Детергент 7Х» не обнаружило влияния этого ПАВ содержащего средства на стабильность концентрации растворов перекиси водорода.

**Введение.** Эффективность дезинфицирующих средств определяется не только чувствительностью к ним патогенных биологических агентов, но и стабильностью химической структуры действующих веществ, сохранением их регламентной (утвержденной в нормативных документах) концентрации в рабочих растворах на протяжении всей экспозиции.

Одним из достаточно эффективных и хорошо изученных дезинфицирующих средств является перекись водорода – сильный окислитель, обладающий бактерицидным и спороцидным действием. Относительно безопасные для человека и окружающей среды 3–6 процентные растворы перекиси водорода медицинской широко используются в Российской Федерации для дезинфекции (деконтаминации) лабораторных помещений, рабочих поверхностей, лабораторного и медицинского оборудования, инструментов и расходных материалов [1-8].

Для приготовления рабочих растворов перекиси водорода помимо соответствующего ма-

точного раствора и воды в целях достижения лучшего смачивающего по отношению к твердым поверхностям эффекта используют различные моющие средства – препараты поверхностно активных веществ (ПАВ). Действующие санитарные правила, определяющие требования к безопасности работ с микроорганизмами I–II и III–IV групп патогенности (опасности), в качестве средств химической дезинфекции рекомендуют, в частности, использовать, рабочие растворы перекиси водорода 3% и 6% концентраций с 0,5% моющего средства [1,2]. При этом в качестве моющих средств указаны препараты «Прогресс», «Новость», «Лотос» и «Астра», которые выпускались еще в СССР [1,2].

Рынок моющих средств за последние десятилетия претерпел большие изменения. Прекратилось производство ранее применявшихся средств (или существенно изменился их состав), появилось много новых коммерческих препаратов. Эти факты пока не нашли отражения в официальных нормативных документах.

В доступных литературных источниках нет достаточных данных о сочетаемости различных моющих средств с растворами перекиси водорода [9,10]. В особенности это касается новых препаратов, нашедших широкое применение в последнее время. Выпускаемые на сегодняшний день промышленностью моющие средства, как правило, имеют сложный состав, который может включать следующие компоненты: анионные и неионогенные ПАВ, балласт из солей, соду, силикат натрия, цитраты, фосфаты или цеолиты, химические и оптические отбеливатели, энзимы, а также отдушки и цветные добавки.

Пероксид водорода – неустойчивое соединение (химическая связь между двумя атомами кислорода непрочна). Некоторые компоненты моющих средств могут катализировать разложение пероксида водорода и приводить к снижению его концентрации.

Для проведения эффективной дезинфекции (деконтаминации) нужно учитывать влияние используемого препарата ПАВ, температурных условий и времени, соответствующего регламентам экспозиции, на концентрацию перекиси водорода в рабочем растворе. Наша практика рутинного контроля концентрации рабочих растворов перекиси водорода показала, что при использовании некоторых современных препаратов ПАВ концентрация действующего вещества значительно снижается в течение регламентированного времени обеззараживания объектов.

Указанные обстоятельства продиктовали необходимость проведения настоящего исследования.

**Целью** данной работы явилось определение зависимости концентрации рабочих растворов перекиси водорода от вида современных моющих средств, добавляемых в качестве ПАВ, температуры и времени использования.

**Материалы и методы.** В качестве рабочих растворов перекиси водорода использовали 3%, 4% и 6% концентрации, полученные из маточного раствора перекиси водорода медицинской (концентрация не ниже 37 % по фабричному сертификату) путем разведения водопроводной водой (18° С) в соответствии с требованиями нормативной документации для проведения дезинфекции при работе с микроорганизмами I–II и III–IV групп патогенности (опасности) [1,2]).

Исходную концентрацию перекиси водорода в каждом свежеприготовленном рабочем растворе определяли перманганатометрическим методом (по ГОСТ 177 88) в процентах [11]. Для дополнительного контроля использовали индикаторные полоски «Дезиконт перекись водорода» согласно инструкции изготовителя, сравнивая получаемое окрашивание с прилагаемой цветовой шкалой (0%, 3%, 4% и 6%) [12].

В качестве моющих средств использовали готовые коммерческие препараты:

1. «Пемос» – порошкообразное моющее средство, в состав которого входят: анионные ПАВ (5-15%), неионогенные ПАВ (менее 5%), поликарбоксилаты, кослородосодержащий отбеливатель, оптический отбеливатель, энзимы и отдушка.

2. «Сульфонол НП 1» – смесь изомеров натриевых солей алкилбензолсульфокислот (не менее 80%) и сульфата натрия (не более 15%); хорошо растворимый в воде порошок, основной компонент большинства стиральных порошков для ручной стирки.

3. «Детергент 7X» – жидкий концентрированный раствор на водной основе, состоящий из анионных ПАВ, растворителей и фосфатных комплексов щелочных металлов; специально разработан для безопасной и эффективной очистки лабораторных приборов и посуды с учетом санитарно-гигиенических требований.

Препараты «Пемос», «Сульфенол НП 1» и «Детергент 7Х» добавляли в опытные образцы рабочих растворов перекиси водорода в соотношении 5 г/л, 5 г/л и 5 мл/л соответственно.

Рабочие растворы без дополнительных компонентов служили контрольными образцами, а с добавлением моющих (ПАВ содержащих) средств – опытными.

Свежеприготовленные опытные и контрольные образцы рабочих растворов перекиси водорода отбирали в объеме 100 мл и помещали в термостаты ТС 80, в которых на протяжении всего исследования поддерживались заданные температурные режимы, а именно: 18° С, 24° С, и 30° С. Данные температуры были выбраны для моделирования возможных в разное время года микроклиматических условий в лабораториях, где используются растворы перекиси водорода, на примере нашей организации.

Определяли концентрацию перекиси водорода в контрольных и опытных образцах спустя 2 ч, 4 ч и 18 ч указанными выше методами. Выбранные временные параметры соответствуют регламентам санитарных правил в отношении различных дезинфекционных мероприятий при работе с микроорганизмами I–II и III–IV групп патогенности (опасности) [1,2].

Дополнительно было проведено исследование рабочих растворов перекиси водорода 3% концентрации с добавлением препаратов «Пемос» и «Детергент 7Х» (5 г/л и 5 мл/л соответственно) после экспозиции 30 мин, 1 ч и 2 ч при температуре 50° С, что соответствует установленному в санитарных правилах режиму обеззараживания лабораторного белья.

Для получения статистически достоверных результатов вся серия экспериментов была проведена пять раз. Статистический анализ проводился с помощью программы MS Excel.

**Результаты и их обсуждение.** Полученные результаты представлены в таблицах (Табл. 1, 2.).

Как показали исследования исходные концентрации рабочих растворов перекиси водорода, во всех свежеприготовленных образцах, соответствовали регламентным значениям. Концентрация перекиси водорода в рабочих растворах без добавления моющих средств через 2 ч после приготовления в условиях температур 18° С и 24° С и спустя 4 ч при 18° С оставалась на исходных значениях во всех контрольных образцах (Табл. 1.).

Через 18 ч при 18° С и 24° С концентрация перекиси водорода во всех образцах незначительно снизилась. При температуре 30° С такое снижение отмечалось уже через 4 ч.

Выраженное снижение концентрации перекиси водорода наблюдали при добавлении в рабочие растворы в качестве ПАВ препарата «Пемос». Во всех опытных образцах с повышением температуры концентрация уменьшалась быстрее. Так, при температуре 24° С значительное снижение отмечено через 4 ч, а при 30° С – уже спустя 2 ч. При экспозиции 18 ч во всех опытных рабочих растворах определялось резкое снижение концентрации перекиси водорода. В условиях температуры 50° С при добавлении препарата «Пемос» концентрация рабочего раствора перекиси водорода (при исходной концентрации – 3%) существенно снизилась на протяжении 30 минут (Табл. 2.). Через 1 ч она была ниже 2,5%, а спустя 2 ч – менее 2%.

Снижение концентрации перекиси водорода при добавлении препарата «Пемос» может быть обусловлено тем, что в состав последнего входят энзимы и химический отбеливатель. Для точного установления причины необходимы специальные химические исследования. Вместе с тем уже сейчас очевидно, что «Пемос» и подобные ему по составу препараты не должны использоваться в качестве ПАВ при приготовлении рабочих растворов перекиси водорода.

При исследовании препарата «Сульфенол НП 1» концентрация перекиси водорода в рабочих растворах снижалась не так резко, как при добавлении моющего средства «Пемос». В частности, при температурах 18° С и 24° С и экспозиции 2 ч концентрация практически везде осталась на исходных значениях. Значительное снижение концентрации отмечено во всех образцах при экспозиции 18 ч, а в условиях температуры 30° С – уже спустя 4 ч.

Из полученных данных следует, что моющее средство «Сульфенол НП 1 в качестве ПАВ может использоваться для проведения дезинфекции рабочим раствором перекиси водорода в течение 4 ч при температурах от 18° С до 24° С, с последующим контролем концентрации.

При исследовании в качестве ПАВ моющей жидкости «Детергент 7Х» не выявлено существенных изменений концентрации опытных рабочих растворов перекиси водорода. В целом значения концентрации (с отдельными незначительными отклонениями в рамках статистической погрешности) оказались такими же, что и в контрольных образцах рабочих растворов, в которые не вносились препараты ПАВ. Следовательно, препарат «Детергент 7Х», как современное моющее средство, может быть рекомендован к использованию в качестве ПАВ для рабочих растворов перекиси водорода.

Таблица 1

Влияние используемого препарата ПАВ на концентрации рабочих растворов перекиси водорода в зависимости от температуры и длительности экспозиции

№ п/п	ПАВ	Исходная концентрация рабочего раствора перекиси водорода, %		Концентрация рабочего раствора перекиси водорода после экспозиции, %																		
				2 часа						4 часа						18 часов						
				18 °С		24 °С		30 °С		18 °С		24 °С		30 °С		18 °С		24 °С		30 °С		
				ТП	ПМ	ТП	ПМ	ТП	ПМ	ТП	ПМ	ТП	ПМ	ТП	ПМ	ТП	ПМ	ТП	ПМ	ТП	ПМ	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
2	Без ПАВ	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	2,9±0,05	3	2,9±0,05	3	2,9±0,05	3	2,9±0,05	3
3	Пемос	3	3,0±0,05	3	2,8±0,05	3	2,8±0,05	3	2,5±0,05	3	2,6±0,05	3	2,5±0,05	3	2,1±0,05	3	1,7±0,1	3	1,6±0,1	3	1,1±0,1	
4	Сульфол НП-1	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	2,9±0,05	3	2,9±0,05	3	2,9±0,05	3	2,7±0,05	3	2,8±0,05	3	2,8±0,05	3	2,4±0,05	
5	Детергент 7Х	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	2,9±0,05	3	2,9±0,05	3	2,9±0,05	3	2,9±0,05	
6	Без ПАВ	4	4,0±0,05	4	4,0±0,05	4	4,0±0,05	4	4,0±0,05	4	4,0±0,05	4	4,0±0,05	4	3,9±0,05	4	3,9±0,05	4	3,9±0,05	4	3,8±0,05	
7	Пемос	4	4,0±0,05	4	3,8±0,05	4	3,7±0,05	4	3,5±0,05	4	3,5±0,05	4	3,4±0,05	4	3,0±0,05	4	2,2±0,1	4	1,9±0,1	4	1,4±0,1	
8	Сульфол НП-1	4	4,0±0,05	4	4,0±0,05	4	4,0±0,05	4	3,9±0,05	4	3,9±0,05	4	3,8±0,05	4	3,7±0,05	4	3,6±0,05	4	3,5±0,05	4	3,3±0,05	
9	Детергент 7Х	4	4,0±0,05	4	4,0±0,05	4	4,0±0,05	4	4,0±0,05	4	4,0±0,05	4	3,9±0,05	4	3,9±0,05	4	3,9±0,05	4	3,9±0,05	4	3,8±0,05	
10	Без ПАВ	6	6,0±0,05	6	6,0±0,05	6	6,0±0,05	6	5,9±0,05	6	6,0±0,05	6	5,9±0,05	6	5,9±0,05	6	5,9±0,05	6	5,9±0,05	6	5,8±0,05	
11	Пемос	6	6,0±0,05	6	5,9±0,05	6	5,7±0,05	6	5,6±0,05	6	5,8±0,05	6	5,4±0,05	6	4,7±0,05	6	5,2±0,05	6	4,8±0,05	6	4,1±0,05	
12	Сульфол НП-1	6	6,0±0,05	6	6,0±0,05	6	5,9±0,05	6	5,7±0,05	6	5,8±0,05	6	5,8±0,05	6	5,6±0,05	6	5,5±0,05	6	5,4±0,05	6	4,9±0,05	
13	Детергент 7Х	6	6,0±0,05	6	6,0±0,05	6	6,0±0,05	6	5,9±0,05	6	6,0±0,05	6	5,9±0,05	6	5,9±0,05	6	5,9±0,05	6	5,9±0,05	6	5,8±0,05	

Примечание.

ТП – результат определения концентрации перекиси водорода с использованием тест-полоски индикаторной «Дезиконт-перекись водорода»

ПМ – результат определения концентрации перекиси водорода перманганометрическим методом (по ГОСТ 177-88)

\*(p<0,001)

Влияние различных моющих средств на концентрацию рабочих растворов перекиси водорода в зависимости от длительности экспозиции при температуре 50° С

№ п/п	ПАВ	Исходная концентрация рабочего раствора перекиси водорода, %		Концентрация рабочего раствора перекиси водорода после экспозиции, %					
		ТП	ПМ	30 минут		1 час		2 часа	
				ТП	ПМ	ТП	ПМ	ТП	ПМ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	Без ПАВ	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	2,9±0,05
3	Пемос	3	3,0±0,05	<3	2,6±0,05*	<3	2,4±0,05*	<3	1,8±0,1*
4	Детергент 7Х	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	3,0±0,05	3	2,9±0,05

Примечание.

ТП – результат определения концентрации перекиси водорода с использованием тест-полоски индикаторной «Дезиконт-перекись водорода»

ПМ – результат определения концентрации перекиси водорода перманганометрическим методом (по ГОСТ 177-88)

\*(p<0,001)

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о необходимости корректировки перечня моющих средств, указанных в нормативно методических документах, с включением списка тех современных препаратов ПАВ, которые не нарушают стабильность концентрации рабочих растворов перекиси водорода. При этом целесообразно рекомендовать определенный состав препаратов. В дальнейшем внесенные поправки следует учитывать при проведении тендерных закупок моющих средств

#### **Выводы:**

1. Моющее средство «Пемос» вызывает выраженное снижение концентрации перекиси водорода в рабочем растворе. С повышением температуры окружающей среды этот процесс усиливается. Данный препарат и аналогичные ему по составу моющие средства не должны применяться в качестве ПАВ для рабочих растворов перекиси водорода.

2. Препарат «Сульфонол НП 1» способствует умеренному снижению концентрации перекиси водорода в рабочем растворе. Такие рабочие растворы могут использоваться в течение 4 ч при температурах от 18° С до 24° С.

3. Моющая жидкость «Детергент 7Х» не оказывает влияние на динамику изменения концентрации перекиси водорода в рабочих растворах и может быть рекомендована для добавления в них в качестве оптимального ПАВ.

Материалы подготовлены в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016-2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

#### **Литература:**

1. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» СП 1.3.3118-13 // М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014.–195 с.

2. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»: СП 1.23.2322-08 // М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.–75 с.

3. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность». СанПиН 2.1.3.2630–10 // М.: 2010.–255 с.

4. Методические указания «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» // МУ-287-113 от 30.12.1998 г., 67 с.

5. Эпидемиологические и дезинфектологические обоснования рационального выбора методов, средств и режимов дезинфекции и стерилизации в лечебно-профилактических учреждениях. Рекомендации для медицинских работников / Сост. М.Г. Шандала, В.А. Алёшкин, Е.П. Селькова, Л.Г. Пантелеева, Н.Ф. Соколова, И.М. Абрамова, А.И. Чижов, Т.А. Гренкова. – М.: ООО «Типография Момент», 2006.–39 с.

6. ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности». М.: 1976.–6 с.

7. Панкратова Г.П. Токсичность и безопасность применения дезинфицирующих средств // Глав. мед. сестра.– 2007.–№ 3.–С. 83-87.

8. Панкратова Г.П., Мальцева М.М., Новикова Э.А. К вопросу о безопасности применения дезинфицирующих средств в лечебно-профилактических учреждениях // Санитарно-эпидемиологическая безопасность России: актуальность проблемы, методы и средства для её решения: Тезисы докл. науч.-практич. конф. (18 октября 2006 г.) // 11-я Международная специализированная выставка «Волгаздравэкспо» (Казань, 18-20 октября 2006 г.). Казань, 2006.–С. 50-54.

9. Методические указания МУ 42-51-7-93 «Приготовление растворов пероксида водорода с моющими средствами», утв. Департаментом Госсанэпиднадзора Минздрава РФ 08.02.93.

10. Соколова Л.Ф., Арефьева Л.И., Пархач М.Е. Стабилизация водных растворов пероксида водорода.// Фармация. 1987, №4.– С. 74-76

11. ГОСТ 177-88 «Перекись водорода». - М.: 1988.– 4 с.

12. Инструкция № 154.068.01 ИП по применению индикаторных полосок Дезиконт Перекись Водорода экспресс контроля концентраций рабочих растворов дезинфицирующего средства Перекись Водорода. ТУ 9398-038-11764404-2003. Изготовитель: НПФ "ВИНАР". Утверждена 10 октября 2013 г. Регистрационное удостоверение ФСР 2008/0295

**«СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ  
В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ  
ЗА АКТУАЛЬНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ»**

**МАТЕРИАЛЫ ВСЕРОССИЙСКОЙ  
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ,  
посвященной 95-летию со дня рождения  
академика РАМН И.Н. БЛОХИНОЙ**

**(25 мая 2016г., г. Нижний Новгород)**