



НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ИЗДАЕТСЯ С СЕНТЯБРЯ 1924 г.

ОРГАН МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

№10/2010

Главный редактор
Ю. К. АБАЕВ

Редакционная коллегия:

БАРКОВСКИЙ Е. В.
БРОНОВЕЦ И. Н.
ВАСИЛЕВСКИЙ И. В.
ВОЛОТОВСКИЙ И. Д.
ГЕРАСИМОВИЧ Г. И.
ГРИГОРЬЕВА Г. Ф.
ЖАРКО В. И.
ЗАЛУЦКИЙ И. В.
КЕВРА М. К.
КАРПОВ И. А.
КАЧАН В. И.
КУБАРКО А. И.
ЛОБКО П. И.
МАНАК Н. А.
РИМЖА М. И.
СМЫЧЕК В. Б.
СОРОКА Н. Ф.
ТЕРНОВ В. И.
ТИТОВ Л. П.
УЛАЩИК В. С. (зам. гл. редактора)
УСС А. Л.
ФЕДОТОВА Л. А. (отв. секретарь)
ХОЛОДОВА Е. А.
ЧЕРСТВЫЙ Е. Д.
ШОТТ А. В.

Редакционный совет:

ВАСИЛЬКОВ Н. А. (Гомель)
ДЕЙКАЛО В. П. (Витебск)
ДЕМИДЧИК Ю. Е. (Минск)
ДЕРКАЧ Ю. Н. (Витебск)
ЕПИФАНОВ И. В. (Гродно)
ЛИПНИЦКИЙ И. Э. (Минск)
ЛОСИЦКИЙ И. Г. (Брест)
ЛЫЗИКОВ А. Н. (Гомель)

ПИНЕВИЧ Д. Л. (Минск)
СЕМЕНЕНЯ И. Н. (Минск)
СИКОРСКИЙ А. В. (Минск)
СНЕЖИЦКИЙ В. А. (Гродно)
СТОЛЯРОВ А. Ю. (Минск)
ХОДЖАЕВ В. А. (Минск)
ЧАСНОЙТЬ Р. А. (Минск)
ШРУБОВ В. И. (Могилев)





Дорогие коллеги!

Номер журнала, который вы держите в руках, посвящен проблеме инфекции в современной медицине. С инфекционными заболеваниями илисложнениями сталкивается врач любой специальности.

Выдающиеся открытия микробиологии к середине XX века породили иллюзию полного искоренения инфекционных заболеваний. Однако планам ликвидации инфекций не суждено было сбыться, причем неудачи потерпели оба направления в борьбе с инфекционными болезнями — и профилактика, и лечение. До настоящего времени остается неясным весь спектр инфекционной патологии, ее многочисленные проявления нередко застают врасплох даже опытных клиницистов. В целом медицина конца XX века испытала глубокое разочарование, крах надежд на антибактериальные, противовирусные, антитропозойные и антимикотические препараты как на панацею в борьбе против инфекций. Впрочем, развитие событий по этому сценарию было предсказано еще в конце XIX века И. И. Мечниковым в дискуссиях о «золотой пилюле» Эрлиха. Неудивительно, что сегодня в области инфекционной патологии накопилось много проблем, которые связаны с тремя группами инфекций.

Во-первых, это инфекции, которые достались нам в наследство от предыдущих столетий. Это так называемые возвращающиеся инфекции: туберкулез, малярия, инфекции, передающиеся половым путем, и др. Во многом их появление обусловлено социально-экономическими факторами, изменением экологической обстановки, ростом числа лиц с иммунодефицитом, а также недостаточным количеством доброкачественных вакцин и погрешностями при иммунизации населения. Во-вторых, это новые, точнее, впервые выявленные инфекции, ставшие известными в конце XX века. Их число уже превысило три десятка. Среди них – ВИЧ-инфекция, болезнь Лайма, эрлихиоз, иерсиниоз, легионеллез, вирусные лихорадки Ласса, Эбола, Марбург, энтеротоксигенные и энтерогеморрагические эшерихиозы, Т-клеточный лейкоз, кампилобактериоз, ряд вирусных кишечных болезней, гепатиты E, C, D, F и G, хантавирусный легочный синдром и др. Выявить эти болезни позволили усовершенствованные методы диагностики. Третью группу составляют инфекции, которые условно можно назвать «Х-инфекциями». Это заболевания, которые в настоящее время не все еще известны. Данная группа будет пополняться, в том числе за счет многих болезней, считавшихся ранее неинфекционными. Одна из них – тяжелый острый респираторный синдром (SARS), вызываемый неизвестными ранее штаммами коронавируса.

Сегодня проблема инфекционной патологии выходит далеко за рамки этого раздела медицины. Она актуальна для хирургии, гастроэнтерологии, неврологии, онкологии, гинекологии, урологии и ряда других медицинских специальностей. Инфекционные болезни составляют значительную часть в структуре заболеваемости и смертности населения многих стран мира. Это обуславливает необходимость постоянно совершенствовать методы лечения, разрабатывать новые терапевтические подходы.

Несмотря на значительные достижения, многие проблемы терапии инфекционных болезней остаются нерешенными: до настоящего времени существуют лишь единичные препараты для этиотропной терапии вирусных инфекций, отсутствует методология по преодолению устойчивости микроорганизмов к лекарственным средствам. Рекомендации по применению одновременно 3–5 препаратов для подавления возбудителя свидетельствуют о нашей беспомощности и носят лишь временный характер, поскольку способствуют появлению мультирезистентных микроорганизмов. Многие методы и средства терапии носят эмпирический характер и не получили подтверждения с позиции принципов доказательной медицины. Значительное влияние на мнение исследователей оказывают фирмы – производители препаратов, импортеры, лоббирующие их продвижение на рынке. В этих условиях в наиболее трудном положении оказывается практический врач. Мало помогают и многочисленные варианты стандартов и методических рекомендаций, которые, как правило, носят заказной характер и часто устаревают еще до утверждения.

За последние 10–15 лет в Беларуси достигнуты значительные успехи в борьбе с инфекциями. Эпидемиологическое благополучие является результатом эффективной деятельности врачей практического здравоохранения, сотрудников РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, научно-педагогических кадров медицинских вузов. Однако нельзя забывать, что инфекционные болезни не знают границ и представляют постоянную потенциальную угрозу. Совершенствование борьбы с инфекциями открывает дополнительные ресурсы для улучшения демографической ситуации.

Надеемся, что статьи коллектива РНПЦ эпидемиологии и микробиологии расширят ваше представление об инфекционной патологии. Благодарим авторов, которые не нарушают концепцию журнала: материалы отличаются высоким уровнем научной и клинической доказательности, имеют практическую направленность. Надеемся, что врачи почерпнут для себя сведения, которые в дальнейшем помогут решать задачи, возникающие в ежедневной работе. Любое наше начинание имеет цену и смысл только при вашем живом отклике и участии. Ждем ваших статей и пожеланий (e-mail: zdrav@tut.by).

С уважением

Ю. К. Абаев

Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней	
Самойлович Е. О., Ермолович М. А., Колодкина В. Л.	
Роль вакцинопрофилактики в контроле и ликвидации инфекционных заболеваний	5
Горбунов В. А., Титов Л. П., Ермакова Т. С. Использование антибиотиков основных классов в учреждениях здравоохранения Республики Беларусь в 2007—2009 гг	13
Бореко Е. И., Павлова Н. И. Устойчивость вирусов гриппа к ингибиторам M2 белка и нейраминидазы	18
Амвросьевая Т. В., Богуш З. Ф., Казинец О. Н., Поклонская Н. В., Безручко А. А., Дедюля К. Л., Гринкевич П. И. Вирусное загрязнение эпидемически значимых водных объектов	22
Счесленок Е. П., Фомина Е. Г., Григорович И. И., Школина Т. В., Семижон П. А., Семенов С. Ф., Владыко А. С. Характеристика рекомбинантного антигензначимого NP-белка вируса Ласса	26
Поклонская Н. В., Амвросьевая Т. В., Безручко А. А., Игнатьев Г. М., Гринкевич П. И., Кишкурно Е. П., Клюйко Н. Л., Зайцева Л. В., Ходин Д. В. Генетическое разнообразие норовирусов, вызвавших заболеваемость острыми кишечными инфекциями в Минске в 2009—2010 гг	30
Гудков В. Г., Плотникова К. Ю., Зуева В. Л. Характеристика эпидемического процесса вирусного гепатита А в Беларуси	36
Семижон П. А., Фомина Е. Г., Счесленок Е. П., Школина Т. В., Поклонская Н. В., Дедюля К. Л., Барковский Е. В., Владыко А. С. Особенности экспрессии и природы гетерологичного рекомбинантного нуклеокапсидного полипептида вируса гепатита С	43
Шмелева Н. П., Грибкова Н. В. Влияние арпетола на размножение пандемического вируса гриппа А (H1N1) и сезонных вирусов гриппа А и В в культуре клеток MDCK	46
Счесленок Е. П., Школина Т. В., Клавсуть Г. А., Лешкевич А. Л., Чайка А. В., Винокурова Н. В., Красько А. Г., Фидаров Ф. М., Артеменкова Е. М., Владыко А. С. Сporadicкие случаи заболевания геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в Могилевской области	49
Титов Л. П., Гончаров А. Е., Путырский Л. А., Кошелев С. В., Кошелева М. И., Путырский Ю. Л. Иммунофенотип и функциональные свойства моноцитарных дендритных клеток больных раком молочной железы	52
Еремин В. Ф., Гасич Е. Л., Сосинович С. В., Лапицкая Г. В., Суэтнов О. Н., Еремин С. В., Ильинкова В. С., Карпов И. А. Мутации резистентности ВИЧ у детей, получавших высокоактивную антиретровирусную терапию	56
Янович О. О., Носова Е. С., Титов Л. П., Дорожко М. В., Короткая Г. И., Трус Н. И. Анализ генотипов острова патогенности <i>H. pylori</i> и их связь с течением хронических заболеваний желудка	62
Колодкина В. Л., Денисевич Т. Н., Страх П. Г., Трухан О. В. Выявление <i>Bordetella pertussis</i> и <i>Bordetella parapertussis</i> в мазках из носоглотки методом ПЦР	66
Богданова Н. Л., Петкевич А. С., Рустамова Л. М., Сабынин В. М., Семенов С. Ф., Шутова А. Г., Владыко А. С. Протективные свойства аллотропных препаратов природного генеза и растительных субстанций при геморрагической лихорадке Ласса in vivo	70
Гасич Е. Л., Еремин В. Ф., Пинчук М. Г., Сосинович С. В. Молекулярно-генетическая характеристика вируса гепатита В, выявляемого в Беларуси	74
Орлова С. В., Чапенко С. В., Муровска М., Щерба В. В., Рогачева Т. А., Штыров А. А., Хмара М. Е., Дракина С. А., Орлова О. В. Распространенность β-герпесвирусов в группах больных с различной патологией и их возможная роль в развитии синдрома хронической усталости	78

**Problems of Epidemiology,
Microbiology and Infectious Diseases**

Samoilovich E. O., Yermolovich M. A., Kolodkina V. L. Role of vaccination for infectious diseases control and elimination

Gorbunov V. A., Titov L. P., Yermakova T. S. Administration of antibiotics of main classes in public health institutions of Republic of Belarus in 2007—2009

Boreko E. I., Pavlova N. I. Influenza viruses resistance to protein and neuraminidase M2 inhibitors

**Amvrosieva T. V., Bogush Z. F., Kazinets O. N.,
Poklonskaya N. V., Bezruchko A. A., Dedyulya K. L.,
Grinkevich P. I.** Viral contamination of epidemiically significant water objects

**Scheslenok E. P., Fomina E. G., Hryharovich I. I.,
Shkolina T. V., Semizhon P. A., Semenov S. F., Vladko A. S.** Characteristic of recombinant Lassa virus NP protein

**Poklonskaya N. V., Amvrosieva T. V., Bezruchko A. A.,
Ignatiev G. M., Grinkevich P. I., Kishkurno E. P., Klyuiko N. L.,
Zaitseva L. V., Khodin D. V.** Genetic variety of noroviruses having caused acute intestinal infections

Gudkov V. G., Plotnikova K. Yu., Zueva V. L. Description of epidemic process of viral hepatitis B in Belarus

**Semizhon P. A., Fomina E. G., Scheslenok E. P., Shkolina T. V.,
Poklonskaya N. V., Dzidziulia K. L., Barkovsky E. V.,
Vladko A. S.** Characteristic features expression and nature of heterologous recombinant nucleocapsid polypeptide of hepatitis C virus

Shmelyova N. P., Gribkova N. V. Effect of Arpetol on pandemic influenza A(H1N1) virus and on seasonal influenza A and B viruses reproduction in MDCK cell culture

**Scheslenok E. P., Shkolina T. V., Klavsut G. A.,
Leshkevich A. L., Tchaika A. V., Vinokurova N. V., Krasko A. G.,
Fidarov F. M., Artemenkova E. M., Vladko A. S.** Sporadic cases of hemorrhagic fever with renal syndrome in Mogilyov and Mogilyov region

**Titov L. P., Hancharou A. Y., Putyrski L. A., Koshelev S. V.,
Kosheleva M. I., Putyrska Y. L.** Immunophenotype and function of monocyte-derived dendritic cells obtained from patients with breast cancer

**Eryomin V. F., Gasich E. L., Sosinovich S. V., Lapitskaya G. V.,
Suetnov O. N., Eryomin S. V., Ilyienkova V. S., Karpov I. A.** HIV resistance mutations in children on highly efficient antiretroviral therapy Lapitskaya G. V.,

**Yanovich O. O., Nosova E. S., Titov L. P., Doroshko M. V.,
Korotkaya G. I., Trus N. I.** Analysis of *H. pylori* pathogenicity island genotypes and their association with gastric chronic diseases course

**Kolodkina V. L., Denisevich T. N., Strakh P. G.,
Trukhan O. V.** *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* PCR detection in nasopharyngeal swab specimens

**Bogdanova N. L., Petkovich A. S., Rustamova L. M.,
Sabynin V. M., Semenov S. F., Shutova A. G., Vladko A. S.** Protective properties of allotropic preparations of natural genesis and of herbal substances in Lassa hemorrhagic fever in vivo

Gasich E. L., Eryomin V. F., Pinchuk M. G., Sosinovich S. V. Molecular and genetic characteristics of hepatitis virus B separated in Belarus

**Orlova S. V., Tchapenko S. V., Murowska M., Shcherba V. V.,
Rogacheva T. A., Shtyrov A. A., Khmara M. E., Drakina S. A.,
Orlova O. V.** Spread of β-herpesviruses in patients with various pathologies and their potential role in development of chronic fatigue syndrome

ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ И ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

20 лет — I Белорусский съезд иммунологов (19—21 ноября 1990).

100 лет — первая на территории Беларуси Пастеровская станция в Орше (август 1910).

100 лет — санитарная станция в Могилеве (1910).

100 лет — химико-бактериологическая лаборатория в Могилеве (сентябрь 1910).

90 лет — детская острозаразная больница в Гомеле (1920). В марте 1921 г. реорганизована в губернскую детскую больницу.

85 лет — первая на территории БССР малярийная станция в Мозыре (1925).

75 лет — кафедра микробиологии Витебского медицинского института (Витебского медицинского университета) (1935).

70 лет — санитарно-эпидемиологические станции на территории западных областей БССР (4 областные, 13 межрайонных, 29 районных) (1940).

60 лет — кафедра инфекционных болезней Белорусского института усовершенствования врачей (Белорусской медицинской академии последипломного образования) (1950).

35 лет — Институт микробиологии АН БССР (НАН Беларусь) на базе профильного отдела (1975).

80 лет со дня рождения **Владимира Мироновича Барана** (19.03.1930, г. Минск — 27.10.2003). Инфекционист. Доктор медицинских наук (1984), профессор (1985). Окончил Минский медицинский институт (1953). Ассистент (1959—1972), доцент (1972—1985), профессор (1985—2003) кафедры инфекционных болезней Минского медицинского института. Изучал вирусные гепатиты, внес вклад в разработку методов их экспресс-диагностики, участвовал в создании при Минской клинической инфекционной больнице гепатологического центра.

155 лет со дня рождения **Петра Алексеевича Грацианова** (24.06.1855, г. Н. Новгород, Россия — 1918). Санитарный врач. Окончил Петербургскую медико-хирургическую академию (1880). Первый санитарный врач Минска. Организатор и главный врачебный инспектор инфекционного госпиталя (1891—1903), организатор и руководитель медико-статистического бюро в Минске (1899). Изучал вопросы организации санитарного дела, создания постоянных санитарных учреждений. Разработал методику регистрации инфекционных больных, предложил схемы их стационарного лечения. Анализировал состояние здоровья населения Беларусь, в том числе демографические показатели. Опубликовал монографию «Очерк врачебно-санитарной организации русских городов» (1899), в которой впервые описал санитарное состояние городов; санитарно-гигиенические и санитарно-противоэпидемические мероприятия, которые проводились на территории Российской империи; привел сведения о развитии и организации санитарного дела (постоянные санитарные комиссии, санитарные врачи, медико-статистические бюро, дезинфекционные камеры и т. д.).

*Составители Н. Ф. Змачинская, Н. С. Шумин —
сотрудники Музея истории медицины Беларусь Республиканской научной медицинской библиотеки.*

©“Здравоохранение”, 2010
Свидетельство о государственной регистрации № 562 от 20.07.2009 г.

Подписные индексы:
для организаций — 749122,
для индивидуальных подписчиков — 74912

Дизайн обложки: Сергей Саркисов
Компьютерная верстка: Наталья Гелжец

Подписано в печать с оригинал-макета 29.09.2010.
Формат 60x84 1/8. Офсетная печать.
Физ. печ. л. 10,0+0,5 печ. л. вкл. Усл. печ. л. 9,3.
Уч.-изд. л. 12,8. Тираж 2174 экз. Зак. 2489

Адрес редакции: 220007, Минск, Фабрициуса, 28
Телефоны: 226-21-66, 226-21-48
E-mail: zdrav@tut.by
zdravmag@mailgov.by

Республиканскоe унитарное предприятие
“Издательство “Белорусский Дом печати”
ЛП №02330/0494179 от 03.04.2009.
Пр. Независимости, 79, 220013, Минск.

Редакция не несет ответственности за содержание
рекламных объявлений. При использовании материалов
журнала ссылка на “Здравоохранение” обязательна.



Е. О. САМОЙЛОВИЧ, М. А. ЕРМОЛОВИЧ,
В. Л. КОЛОДКИНА

РОЛЬ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ В КОНТРОЛЕ И ЛИКВИДАЦИИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

В статье обсуждаются основные принципы борьбы с инфекциями с помощью вакцинации. Приводятся определения широко используемых в настоящее время терминов — контроль, элиминация и эрадикация инфекционного заболевания. Представлены результаты вакцинопрофилактики полиомиелита, кори, краснухи и дифтерии в Республике Беларусь в историческом ракурсе. На примере этих заболеваний рассматриваются возможности выполнения программ эрадикации (полиомиелит), элиминации (корь, краснуха) и контроля (дифтерия) инфекций.

Ключевые слова: вакцинопрофилактика, контроль, элиминация, инфекционное заболевание, эрадикация.

Создание высокоактивных антибактериальных препаратов, а также вакцин для профилактики ряда инфекций привело к уверенности в том, что угроза инфекционных заболеваний практически преодолена. Периодические вспышки инфекций в развивающихся странах связывались в первую очередь с проблемами финансирования и распределения ресурсов, которые необходимо решать при международной поддержке.

Однако события последних десятилетий (развитие эпидемии ВИЧ-инфекции, пандемическое распространение новых вариантов вируса гриппа, активизация забытых инфекций и др.) породили серьезные сомнения в быстрой и глобальной победе над инфекционными заболеваниями. В начале XXI века инфекционные заболевания продолжают оставаться одной из ведущих причин преждевременной смерти людей.

Основные успехи, достигнутые в борьбе с инфекционными заболеваниями, относятся в первую очередь к вакциноуправляемым инфекциям, подтверждая тем самым, что именно вакцинопрофилактика является наиболее перспективным и экономичным способом снижения заболеваемости вплоть до возможной ликвидации некоторых инфекций.

Известны четыре основных условия, определяющих возможность ликвидации инфекционного заболевания: 1) типичная клиническая картина заболевания, позволяющая дифференцировать инфекцию, вызываемую данным возбудителем, от других заболеваний; 2) отсутствие персистирующей инфекции без клинических проявлений или носительства возбудителя; 3) отсутствие природного резервуара возбудителя среди животных; 4) наличие эффективной вакцины [1].

Как следует из изложенного выше, возможность «управления» инфекцией определяется как биологическими особенностями возбудителя, так и кругом его естественных хозяев.

В соответствии с рекомендациями Международной тактической группы по ликвидации заболеваний [2, 3] при оценке заболеваний с точки зрения возможности их ликвидации термином «эрадикация» определяется снижение заболеваемости, вызванной инфекционным агентом, до нулевой отметки во всем мире. Эрадикация, как правило, влечет за собой ликвидацию возбудителя или «удаление его из природы», как в случае вируса натуральной оспы, возбудитель которой в настоящее время хранится только в двух лабораториях мира. Под термином «элиминация» понимается снижение заболеваемости вплоть до нулевой отметки на большой географической территории. Для поддержания этого состояния необходимо проведение дальнейших профилактических мероприятий. Эндемичная передача инфекции на этой стадии прервана. Завозные случаи инфекции возможны, однако их дальнейшее распространение отсутствует или ограничено. Под термином «контроль» заболевания принято понимать снижение заболеваемости до намеченного уровня благодаря тщательно спланированным действиям. Для поддержания заболеваемости на достигнутом или более низком уровне необходимо проведение дальнейших профилактических мероприятий. Эндемичная передача возбудителя на этой стадии инфекции продолжается.

В соответствии с этими представлениями среди вакциноуправляемых инфекций можно выделить инфекции, в отношении которых возможна постановка цели ликвидации, и инфекции, в отношении которых максимально возможным является снижение заболеваемости до минимального уровня. Среди инфекций, ликвидация которых представляется возможной, выделяют заболевания, в отношении которых ставится цель их ликвидации в глобальном масштабе, то есть эрадикации, и заболевания, в отношении которых ставится цель их ликвидации в региональном масштабе, то есть элиминации.

Несомненно, основное значение в снижении заболеваемости принадлежит качеству используемых вакцин и уровню охвата вакцинацией. Однако доля популяции, которую необходимо вакцинировать, чтобы прекратить возможность передачи инфекции (то есть критический уровень вакцинации), различается для разных инфекций и зависит от величины, определяемой как базовая скорость репродукции инфекции (R_0) — среднее число вторичных инфекций, вызываемых внедрением одного инфицированного индивида в популяцию, состоящую из восприимчивых хозяев [4]. Требование того, чтобы величина R_0 была больше единицы, является необходимым условием самоподдержания возбудителя инфекции в популяции хозяев. Успех программы глобального искоренения оспы во многом объясняется тем, что для этой инфекции характерно низкое значение R_0 , и для окончательного искоренения инфекции было достаточно вакцинировать 70—80% населения. В то же время для кори, хотя эта инфекция и соответствует условиям

6 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

ликвидации, базовая скорость репродукции в развивающихся странах составляет около 15, а соответствующий критический уровень вакцинации — 90—95% и даже выше, что делает ее глобальное искоренение значительно более трудной задачей [4].

Наряду с поддержанием высокого уровня охвата иммунизацией важная роль в выполнении программ контроля и ликвидации инфекций принадлежит совершенствованию системы эпидемиологического надзора — расширению лабораторной диагностики с использованием современных методов и осуществлению молекулярного мониторинга циркуляции возбудителей.

В данной статье представлены результаты вакцинопрофилактики полиомиелита, кори, краснухи и дифтерии в Республике Беларусь в историческом ракурсе. На примере этих заболеваний рассматриваются возможности выполнения программ эрадикации (полиомиелит), элиминации (корь, краснуха) и контроля (дифтерия) инфекций.

Полиомиелит. Первой инфекцией, которую удалось ликвидировать в глобальном масштабе с помощью вакцинации, стала натуральная оспа. Об успешной эрадикации этого заболевания было объявлено ВОЗ в 1980 г. [5]. Полиомиелит — вторая после натуральной оспы инфекция, в отношении которой поставлена цель ликвидации в глобальном масштабе [6]. Наряду с другими странами мира в выполнении программы глобальной эрадикации полиомиелита участвует и Республика Беларусь.

В первой половине прошлого столетия на территории Беларуси отмечался достаточно высокий уровень заболеваемости полиомиелитом. Своего пика заболеваемость достигла в 1958 г., когда в республике было зарегистрировано 1 000 случаев паралитического полиомиелита (12,6 на 100 000 населения) [7]. В 1956 г. в Белорусском НИИ эпидемиологии и микробиологии создана лаборатория по диагностике полиомиелита, а в 1957 г. впервые в республике изолированы полiovirusы.

Наличие специалистов и лабораторной базы определило участие БССР в первом эпидемиологическом опыте по применению живой оральной полиомиелитной вакцины (ОПВ) из аттенуированных штаммов А. Себина в 1959 г. В городах республики двукратно было привито свыше 500 000 детей в возрасте 6 мес—14 лет. Результаты этих испытаний и данные, одновременно полученные в других республиках СССР, показали полную безвредность и высокую эпидемиологическую эффективность ОПВ [8, 9]. Плановая иммунизация населения против полиомиелита введена в республике в 1960 г. До 1977 г. вакцинация осуществлялась в виде ежегодных кампаний массовых прививок, состоявших из 2—3 туров иммунизации. С 1978 г. проводится рутинная иммунизация детского населения страны согласно национальному календарю прививок. В 1978—1994 гг. схемой иммунизации предусматривалось введение 9 доз ОПВ, с 1995 по 1999 г. — 7 доз ОПВ, с 2000 г. — 6 доз вакцины (в возрасте 3, 4, 5, 18, 24 мес и 7 лет). С начала 2000-х годов используется комбинированная схема иммунизации, предусматривающая

начальную вакцинацию инактивированной полiovакциной (ИПВ) с последующим введением бустерных доз ОПВ. В 2000—2001 гг. по комбинированной схеме прививали детей только в крупных городах. Начиная с 2002 г. комбинированная схема иммунизации стала применяться по всей стране, постепенно она включала использование 2 доз ИПВ, а с 2007—2008 гг. — 3 доз.

Охват детей прививками в Республике Беларусь поддерживается на высоком уровне. В период 1990—1994 гг. 3 дозы ОПВ получили 89,8—92,3% детей первого года жизни, с 1995 по 1999 гг. — 96,1—98,8% детей. Начиная с 2000 г. охват прививками составил 97—99%.

Благодаря вакцинопрофилактике местные случаи полиомиелита не регистрируются с середины 60-х годов прошлого столетия. Завозные случаи полиомиелита были зарегистрированы в 1965 г. (из Казахстана), в 1968 г. (из Польши), в 1978 г. (из Узбекистана). Последний случай паралитического полиомиелита (бульбарная форма) с выделением дикого полiovirusа наблюдался в Минске в 1986 г. и был связан с завозным источником инфекции [10]. В то же время применение ОПВ практически ежегодно сопровождалось возникновением единичных случаев вакциноассоциированного паралитического полиомиелита (ВАПП). Всего в 1967—2009 гг. в Беларуси было выявлено 54 больных ВАПП (рис. 1).

Значительный прогресс в эпидемиологическом надзоре за полиомиелитом произошел в 1990-е годы, когда Беларусь включилась в выполнение программы эрадикации полиомиелита, разработанной ВОЗ. В 1996 г. в стране внедрена система эпидемиологического надзора за подозрительными на полиомиелит заболеваниями, протекающими с синдромом острого вялого паралича (ОВП), у детей до 15 лет. В 1998 г. на базе НИИ эпидемиологии и микробиологии (в 2009 г. переименован в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии) создан Национальный референс-центр по полиомиелиту, где с помощью молекулярно-биологических методов проводится изучение всех выделенных в Беларуси полiovirusов, позволяющее дифференцировать дикие и вакцинныe штаммы, а также определять уровень изменчивости вакцинных вирусов.

В течение 14 лет (1996—2009) в рамках надзора за полiovirusной инфекцией был выявлен и обследован 641 ребенок с синдромом ОВП. Полiovirusы изолированы от 42 пациентов, неполиомиелитные вирусы — от 38 детей. Молекулярно-генетическое исследование выделенных полiovirusов показало, что все они имели вакцинное происхождение. В большинстве случаев выделение вакцинного вируса являлось случайным совпадением развития паралича с недавней вакцинацией живой оральной полiovакциной. По результатам клинико-эпидемиологических и вирусологических исследований было установлено, что 629 случаев ОВП имели неполиомиелитную этиологию (в основном они были представлены полинейропатиями, травматическими невритами, преходящими монопарезами и миелитами), 12 случаев были классифицированы как ВАПП: 11 из них были выявлены в период с 1996 по 2001 г., 1 — в 2007 г. [11, 12].

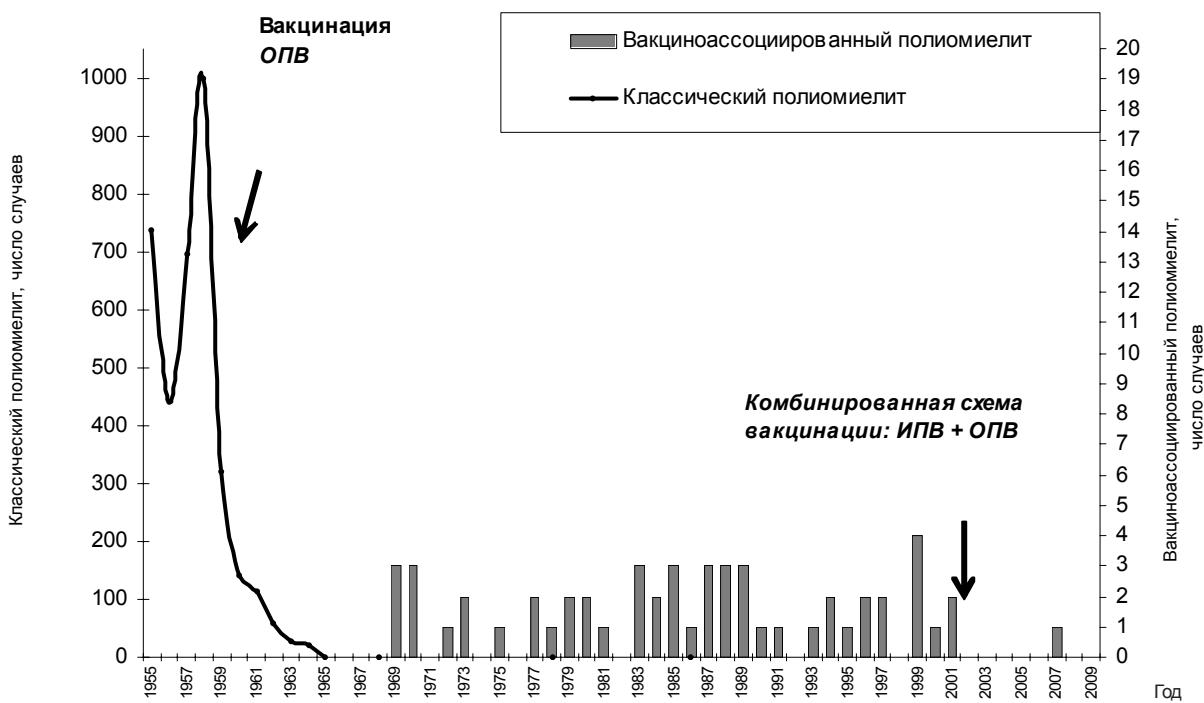


Рис. 1. Заболеваемость полиомиелитом в Беларусь

Значительное уменьшение частоты ВАПП в последние годы было достигнуто благодаря переходу на комбинированную схему вакцинации против полиомиелита. Однако использование комбинированной схемы также не позволяет полностью исключить риск возникновения ВАПП, что подтверждается регистрацией в 2007 г. такого случая у ребенка с первичным В-клеточным иммунодефицитом, получившего 5 прививок против полиомиелита (2 — с использованием ИПВ, 3 — с использованием ОПВ). Несмотря на предшествующую иммунизацию двумя дозами ИПВ, введение живого вакцинного полiovirusa в составе ОПВ привело у данного ребенка к развитию паралича. Выделенный от него вакцинородственный полiovirus характеризовался наличием 17 нуклеотидных замен в области основного капсидного белка, что свидетельствует о достаточно длительном (1,6 года, вероятнее всего с момента введения 2-й дозы ОПВ) периоде его размножения в организме ребенка. В соответствии с международной классификацией вирус отнесен к категории VDPV (vaccine-derived poliovirus — полiovirusы с высоким — более 1% — уровнем генетической изменчивости), занимающей промежуточное положение между дикими и вакцинными полiovirusами. Этот вирус стал первым iVDPV (VDPV, изолированный от иммунодефицитных лиц), обнаруженным в Беларуси, который входит в число трех десятков iVDPV, известных на сегодняшний день в мире [12—14].

Наряду с выявлением и вирусологическим обследованием детей с ОВП важную роль в надзоре за полиомиелитом играет проведение мониторинга циркуляции полiovirusов. Все выделенные в любом из регионов страны от людей или из объектов окружающей среды полiovirusы доставляются в Национальный референс-центр по полиомиелиту, где проводится их моле-

кулярно-генетическое изучение. С 1998 г. по настоящее время с использованием молекулярных методов изучено более 900 полiovirusов. Показано, что все они имели вакцинное происхождение, ни одного дикого вируса обнаружено не было.

Необходимость дальнейшего проведения эпидемиологического надзора за полиомиелитом определяет ситуацию в мире, где все еще остаются эндемичные по полиомиелиту страны (Индия, Нигерия, Афганистан, Пакистан), которые достаточно часто оказываются источником распространения дикого вируса полиомиелита. По данным ВОЗ, только в течение 2009 г. 19 стран мира были реинфицированы диким полiovirusом, что привело к возникновению 350 случаев паралитического полиомиелита. Кроме того, высокий уровень генетической изменчивости вакцинного полiovirusа определяет возможность появления VDPV, которые также могут представлять эпидемиологическую опасность для населения ввиду их высокой трансмиссионности и нейровирулентности [15]. На протяжении последних 10 лет циркулирующие VDPV, вызвавшие два и более случаев паралитического полиомиелита, были выявлены в 14 странах мира. Наиболее крупные вспышки, по данным ВОЗ, были зарегистрированы в Индонезии (2005 г. — 46 случаев) и Нигерии (2007 г. — 68 случаев, 2008 г. — 63 случая, 2009 г. — 148 случаев). Поэтому своевременное выявление не только диких полiovirusов, но и VDPV является чрезвычайно важной задачей эпидемиологического надзора за полiovirusной инфекцией на современном этапе.

Корь, краснуха. Обе эти инфекции удовлетворяют условиям, при которых возможно искоренение заболевания. Однако, учитывая те трудности, с которыми столкнулось мировое сообщество, выполняя поставленную

8 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

цель эрадикации полиомиелита, в отношении кори в начале 2000-х годов ВОЗ была поставлена менее трудоемкая задача — элиминировать эту инфекцию в отдельных регионах мира — Американском, Европейском, Западно-Тихоокеанском — и снизить смертность от кори в глобальном масштабе [16].

Принимая во внимание тот факт, что корь и краснуха имеют сходную клиническую картину и однотипную эпидемиологическую характеристику, а профилактика их в последние годы осуществляется с использованием одной комбинированной вакцины (против кори, паротита, краснухи), два региона мира — Американский и Европейский — наряду с элиминацией кори поставили задачу элиминации краснухи [17]. В Европейском регионе, в том числе и в Республике Беларусь, выполняется задача элиминации обеих инфекций.

До введения вакцинации заболеваемость корью в Беларуси была высокой и по данным официальной статистики в конце 50-х—начале 60-х годов XX столетия составляла от 500 до 950 на 100 000 населения. В 1967 г. введена вакцинация против кори с использованием моновакцины на основе штамма Л16 и до 1987 г. в стране применялась однократная схема вакцинации. Среднегодовой показатель заболеваемости в период однократной иммунизации (1967—1987 гг.) был на 76,9% ниже в сравнении с заболеваемостью в допрививочный период 1963—1966 гг. (174,97 против 756,0 на 100 000 населения). Однако и после введения вакцинации заболеваемость корью продолжала сохранять эпидемический характер, что выражалось периодическими подъемами (рис. 2).

В период однократной иммунизации было зарегистрировано несколько эпидемических волн инфекции. Лишь благодаря введению в 1987 г. ревакцинации 6-летних детей перед поступлением в школу произошло дальнейшее снижение заболеваемости корью. Среднегодовой показатель заболеваемости в 1987—1995 гг.

(17,2 на 100 000 населения) по сравнению с заболеваемостью в период однократной вакцинации снизился на 90,2%, в допрививочный — на 97,7%. Однако, несмотря на применение в стране двухдозовой схемы иммунизации, заболеваемость продолжала носить нестабильный характер. В 1987—1995 гг. ее уровень в расчете на 100 000 населения колебался от 140,0 в 1989 г. до 37,6 в 1993 г. Периодические подъемы заболеваемости указывали на сохранение эпидемического характера распространения кори в стране [18].

Дальнейшее снижение заболеваемости корью было связано с совершенствованием системы эпидемиологического надзора и тактики вакцинопрофилактики инфекции. С 1996 г. иммунизация детей против трех инфекций — кори, паротита и краснухи — в Республике Беларусь осуществляется с использованием трехвалентной вакцины КПК (корь—паротит—краснуха). В 1996—2000 гг. вакцина КПК использовалась только для иммунизации детей 12-месячного возраста, ревакцинация детей против краснухи и паротита не проводилась, а против кори осуществлялась в возрасте 6 лет с использованием моновакцины. Начиная с 2000 г. по настоящее время применяется двухдозовая схема вакцинации вакциной КПК — в возрасте 12 мес и 6 лет.

В течение 1996—2004 гг. применялась вакцина «Тримовакс» производства «Авентис Пастер» (Франция), содержащая аттенуированные вирусы кори (штамм Шварц), краснухи (штамм Wistar RA 27/3 M), паротита (штамм Urabe AM-10). В 2004 г. параллельно с вакциной «Тримовакс» использовали также вакцину «Приорикс» производства «ГлаксоСмитКляйн» (Бельгия), содержащую вирус кори (штамм Шварц), краснухи (штамм Wistar RA 27/3), паротита (штамм RIT 4385). С 2005 г. в стране применяется вакцина КПК производства «Serum Institute of India» (вирус кори — Эдмонтон—Загреб, краснухи — Wistar 27/3, паротита — Leningrad—Zagreb).



Рис. 2. Заболеваемость корью в Республике Беларусь

К началу 2000-х годов заболеваемость корью снизилась до уровня менее 1 случая на 100 000 населения, краснуха также перешла в разряд вакциноуправляемых инфекций. К середине 2000-х годов заболеваемость краснухой снизилась с 77,5—607,5 на 100 000 населения в довакцинальный период (1992—1995 гг.) до 20—40 на 100 000 населения (рис. 3).

До 2002 г. диагностика кори и краснухи в основном осуществлялась по клиническим данным, с организацией на базе НИИ эпидемиологии и микробиологии республиканской референс-лаборатории по диагностике кори и краснухи в 2002 г. практически все зарегистрированные случаи кори и большинство зарегистрированных случаев краснухи подтверждены лабораторно. Впервые в стране начата работа по обнаружению вирусов кори и краснухи в материале от больных с последующим определением их генотипа.

Результаты выделения и молекулярно-генетического изучения вирусов кори, изолированных от больных, свидетельствовали о том, что начиная с 2003 г. в Республике Беларусь в основном регистрировали завозные или связанные с завозными случаи кори. Это подтверждали и эпидемиологические данные. Вирусы, изолированные от единичных пациентов, заболевших корью в 2003 и 2007 г., принадлежали к генотипам D6 (вариант «Турция», завозной из Армении) и B5 (завозной из Таиланда) соответственно. Молекулярно-эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что рост заболеваемости корью в республике в 2006 г. (149 заболевших, или 1,50 на 100 000 населения) был обусловлен многочисленными заносами вируса кори генотипа D6 с Украины, где в 2006 г. отмечалась крупнейшая

вспышка кори (более 44 000 заболевших). В 2008 и 2009 г. больных корью в стране выявлено не было. Таким образом, несмотря на многократные случаи заноса инфекции, восстановления эндемичной циркуляции вируса кори в Республике Беларусь не произошло, что явилось результатом осуществлявшихся в течение нескольких десятилетий мероприятий по вакцинопрофилактике и совершенствованию системы эпидемиологического надзора [19, 20].

Проводимые в последние годы исследования по молекулярной эпидемиологии краснухи свидетельствуют о том, что в период 2004—2006 гг. в Республике Беларусь отмечалась циркуляция индигенных, то есть имеющих местное происхождение, вирусов краснухи трех различных генотипов (1G, 1E и 1h), что и обуславливало все еще достаточно высокий уровень заболеваемости [21]. Внедрение лабораторной верификации клинического диагноза показало, что среди привитых детей случаи краснухи практически не регистрируются. Основная заболеваемость сосредоточена среди подростков и молодых взрослых, что существенно повышало риск рождения детей с синдромом врожденной краснухи (СВК) [22—24]. Было обосновано, что для дальнейшего контроля краснушной инфекции наряду с плановой вакцинацией детей необходимо проведение дополнительной иммунизации подростков и молодых взрослых. Организованная в 2005—2006 гг. кампания дополнительной иммунизации (привито более миллиона человек) кардинальным образом изменила заболеваемость краснухой: в 2007 г. зарегистрировано лишь 7 случаев краснухи, в 2008 и 2009 г. — по 2 случая (в сравнении с 2360 случаями в 2006 г.).

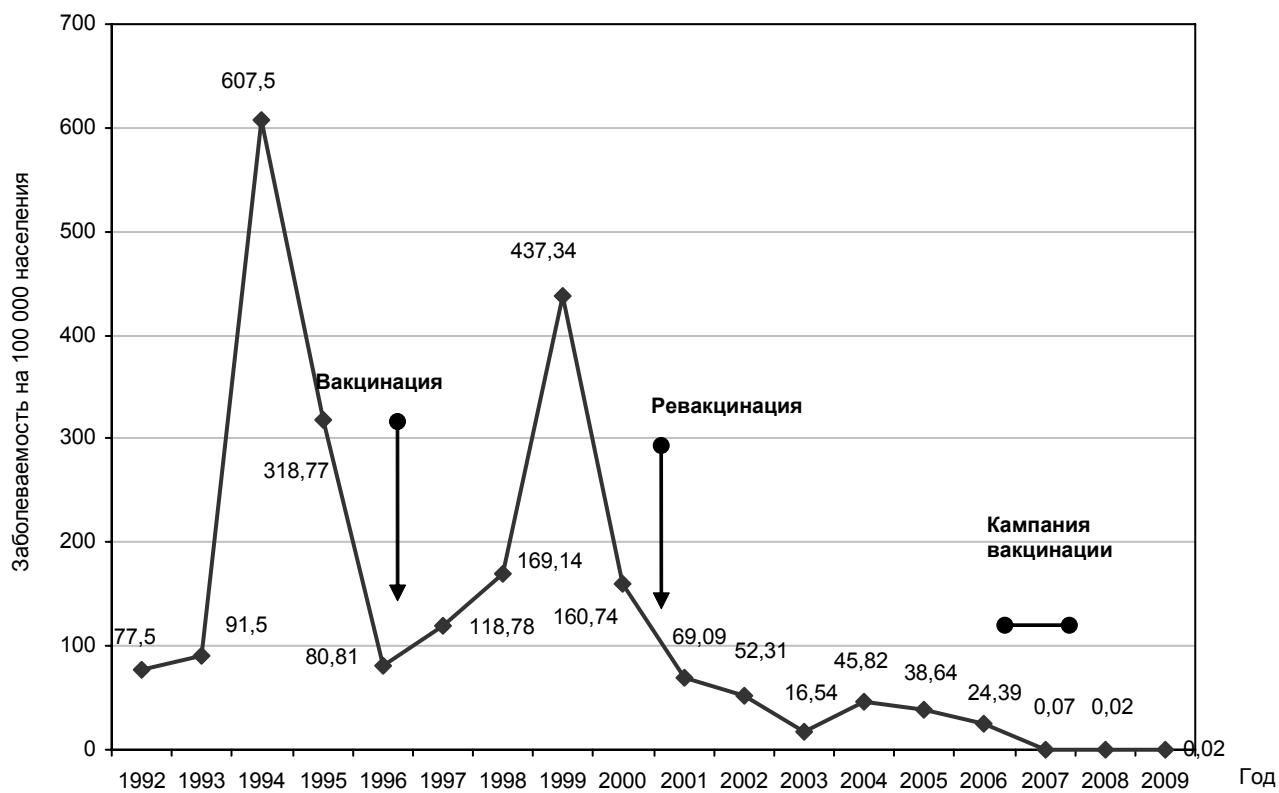


Рис. 3. Заболеваемость краснухой в Республике Беларусь

10 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

Как показывают результаты исследований, 2006 г. стал единственным годом, когда в Беларусь еще сохранялся достаточно высокий уровень заболеваемости краснухой (24,39 на 100 000 населения) и уже функционировала система надзора за СВК. В течение этого года было выявлено 8 случаев инфицирования женщин во время беременности, 6 из них в первый триместр, что послужило основанием для гинекологов рекомендовать этим женщинам прерывание беременности. Учитывая высокий риск инфицирования плода (60—90%) при заболевании женщины краснухой в ранние сроки беременности, можно предположить, что проведенное лабораторное обследование предотвратило рождение 4—5 детей с СВК [25]. Кроме того, 5 родившихся детей с СВК были выявлены в процессе эпидемиологического надзора. Таким образом, по расчетным данным в 2006 г. риск рождения детей с СВК составил не менее 9 на 100 000 новорожденных, что согласуется с данными по частоте встречаемости СВК в других странах, осуществляющих надзор за этим синдромом (Италия — 6 на 100 000 детей, родившихся живыми, в 2001 г., Греция — 4 на 100 000 в 1999 г. [26]). По данным, полученным в странах, не осуществляющих иммунизацию против краснухи, в период эпидемического подъема заболеваемости частота случаев СВК составляет от 0,4 до 4,3 на 1000 детей, родившихся живыми [27]. Несомненно, проводимая в Беларусь с 1996 г. иммунизация детского населения существенно снизила заболеваемость краснухой у детей, однако и в 2006 г. риск инфицирования вирусом краснухи во время беременности все еще оставался достаточно высоким. И только проведенные мероприятия по дополнительной иммунизации более 1 млн человек позволили свести риск местного инфицирования женщин во время беременности практически к нулю, о чем свидетельствуют как данные по заболеваемости краснухой, так и результаты лабораторного обследования беременных женщин и детей с подозрением на СВК в 2007—2008 гг.

Дифтерия. В отличие от инфекций, представленных выше, наряду с манифестными формами для дифтерии характерны скрытые формы, а также бессимптомное носительство возбудителя. Существование длительного носительства даже без регистрируемой заболеваемости обеспечивает непрерывность эпидемического процесса этой инфекции. Однако дифтерию как заболевание, зависящее от привитости населения, можно успешно контролировать. При этом по расчетным данным ввиду низкого значения базовой скорости репродукции инфекции минимальный уровень популяционного иммунитета, достаточный для ее контроля, составляет 82—87% [4].

Опыт Республики Беларусь в профилактике и контроле дифтерии подтверждает правильность этих положений. В отсутствие мер специфической профилактики эпидемический процесс дифтерии характеризовался высоким уровнем заболеваемости (100—250 случаев на 100 000 населения), цикличностью, сезонностью, преимущественным заболеванием детей дошкольного возраста, высокой летальностью [28].

Специфическая иммунопрофилактика дифтерии с использованием нейтральной смеси дифтерийного ток-

сина и антитоксина введена в Беларусь в ограниченном масштабе в конце 20-х — начале 30-х годов XX века [29]. После открытия Г. Рамоном дифтерийного анатоксина (1922) и получения результатов первых практических испытаний вакцинации анатоксином во Франции к началу 40-х годов в Беларусь начала проводиться иммунизация детского населения дифтерийным анатоксином, которая была прервана Великой Отечественной войной. В первые же послевоенные годы она была возобновлена и проводилась в значительном объеме. Применилось двухкратное введение анатоксина с интервалом в три недели. Дальнейшие наблюдения показали, что двухкратного введения анатоксина недостаточно для существенного влияния на заболеваемость дифтерией. Была обоснована необходимость проведения ревакцинирующих прививок. Многолетнее использование дифтерийного анатоксина при обязательном соблюдении кратности иммунизации и последующей ревакцинации постепенно освободило республику от дифтерии как массовой инфекции среди детей [29].

Успехи, достигнутые в борьбе с дифтерией с помощью дифтерийного анатоксина, были закреплены разработкой и использованием в практике здравоохранения комбинированного препарата, содержащего дифтерийный и столбнячный анатоксины и убитые коклюшные микробы, так называемой АКДС-вакцины. В отдельных зарубежных странах ассоциированные вакцины успешно применяли еще в 40-х годах XX века [30]. В Беларусь к 1965 г. АКДС-вакцина полностью заменила использовавшийся ранее дифтерийный анатоксин. Став первым комбинированным мультивалентным вакцинным препаратом, позволяющим с помощью одной инъекции осуществлять иммунизацию против нескольких инфекций, эта вакцина успешно применяется и в настоящее время.

Осуществление мероприятий по иммунопрофилактике дифтерии в комплексе с другими противоэпидемическими мерами позволило начиная с 1957 г. резко снизить заболеваемость дифтерией (рис. 4) и к концу 60-х годов достичь практически полного контроля над заболеваемостью. На протяжении 14 лет (с 1970 по 1983 г.) ежегодно в стране выявлялось не более 10 случаев дифтерии, за исключением 1974 г., когда было выявлено 25 случаев. В целом за этот период заболеваемость дифтерией составила 0,047 на 100 000 населения.

Однако начиная с 1984 г. отмечается постепенное медленное нарастание заболеваемости дифтерией. Так, среднемноголетний показатель заболеваемости с 1984 по 1991 г. был в 4,5 раза выше показателя заболеваемости периода 1970—1983 гг. и составил 0,213 на 100 000 населения.

Резкий подъем заболеваемости дифтерией в Беларусь начался с 1992 г. (68 случаев) и достиг своего пика в 1995 г. (319 случаев). В целом в течение 6 лет эпидемического подъема заболеваемости (1992—1997 гг.) было зарегистрировано 1012 случаев дифтерии, в том числе 28 (2,8%) — с летальным исходом, то есть практически в 3,5 раза больше, чем за предшествующий 25-летний период (1967—1991), в течение

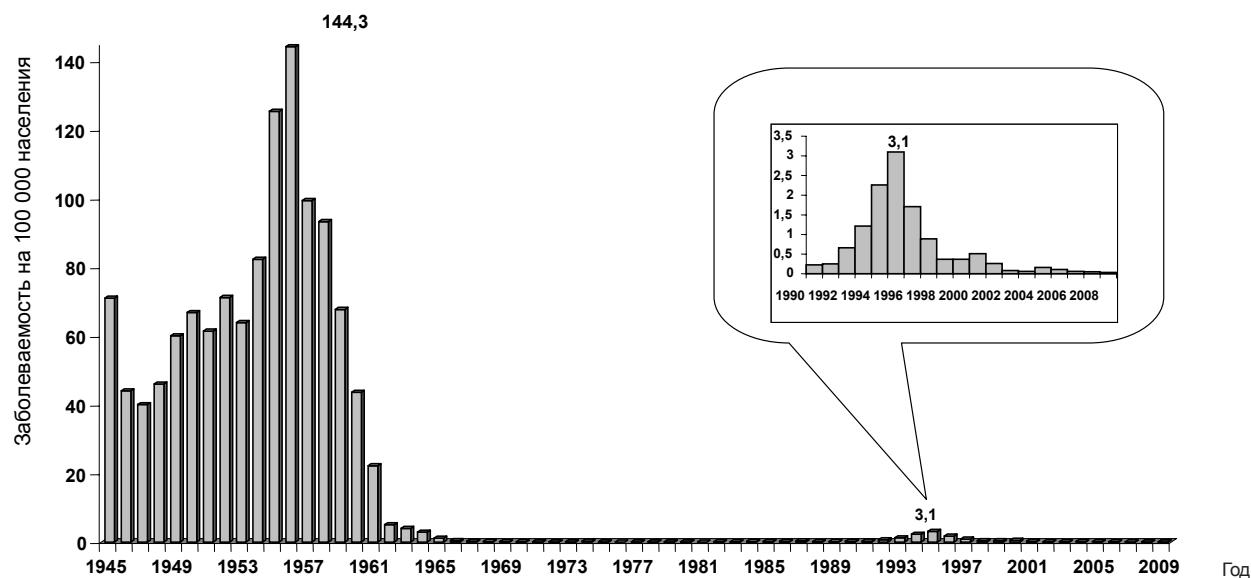


Рис. 4. Заболеваемость дифтерией в Республике Беларусь

которого был зарегистрирован 291 случай заболевания. Показатель заболеваемости в 1992—1997 гг. составил 1,64 на 100 000 населения, что в 7,8 раза выше показателя заболеваемости в 1984—1991 гг. и в 33 раза выше показателя заболеваемости в 1970—1983 гг.

Основными причинами развития эпидемического подъема заболеваемости дифтерией явились снижение охвата иммунизацией детей и провал в противодифтерийном иммунитете у взрослых, о чем свидетельствовали данные серологических исследований [31]. Переломить сложившуюся к середине 90-х годов эпидемиологическую ситуацию по дифтерии стало возможным только путем проведения кампании массовой иммунизации населения (1996 г.), в рамках которой было привито более 6 миллионов взрослого населения в возрасте 18—56 лет.

Проведенная кампания существенным образом отразилась на заболеваемости. С 1998 по 2001 г. зарегистрировано 153 случая дифтерии. Средний показатель заболеваемости этого периода составил 0,38 на 100 000 населения. Начиная с 2002 г. по настоящее время показатель заболеваемости дифтерией в Беларуси составляет менее 0,1 на 100 000 населения, за исключением 2004 и 2005 г. — 0,16 и 0,11 на 100 000 населения соответственно.

В последние десятилетия практически все зарегистрированные в стране случаи дифтерии подтверждены лабораторно. У большинства больных независимо от тяжести заболевания выделялись токсигенные *C. diphtheriae* биотипа *gravis* (85,3%), штаммы биотипа *mitis* были выделены от 14,7% больных. Результаты генотипирования 224 штаммов *C. diphtheriae* (191 штамм биотипа *gravis*, 33 — биотипа *mitis*), изолированных от больных в 1996—2007 гг., свидетельствуют о том, что основная доля изученных штаммов биотипа *gravis* (84,8%) принадлежала к двум риботовипам — *Sankt-Peterburg* и *Rossija*, 63,6% исследованных штаммов биотипа *mitis* принадлежали к риботовипу *Otchakov* [32]. Снижение заболеваемости дифтерией в стране сопровождалось уменьшением доли токсигенных штаммов

обоих биотипов, а также практически полной элиминацией токсигенных штаммов эпидемического риботовипа *Sankt-Peterburg* с сохранением штаммов другого эпидемического риботовипа *Rossija*, которые в последние годы удавалось выделить не только от больных дифтерией, но и от бактерионосителей. На фоне этого наблюдалось увеличение доли нетоксигенных штаммов и появление в циркуляции нетоксигенных штаммов, относящихся к риботовипам, которые не выявлялись в период эпидемического подъема заболеваемости дифтерией [32].

Таким образом, несмотря на успехи специфической профилактики дифтерии, возбудитель продолжает циркулировать среди населения, представляя опасность для непривитых лиц и лиц с ослабленным иммунитетом. Как известно, создаваемый в процессе вакцинации антитоксический иммунитет не может препятствовать инфицированию слизистых оболочек коринебактериями дифтерии. И хотя еще на первых этапах проведения массовой специфической иммунопрофилактики дифтерии в Беларуси было показано, что снижение заболеваемости сопровождалось уменьшением циркуляции токсигенных штаммов коринебактерий среди населения, циркуляция нетоксигенных штаммов оставалась достаточно интенсивной (0,28%) [28]. В некоторых случаях отмечалось многолетнее, продолжавшееся 10 и более лет, бактерионосительство, что, несомненно, является существенным фактором поддержания циркуляции возбудителя среди населения. Многочисленные данные литературы и собственные наблюдения свидетельствуют о том, что даже в условиях отсутствия заболеваемости дифтерией бактерионосительство не должно игнорироваться [28, 33]. И хотя в литературе не описаны случаи непосредственного заболевания дифтерией от хронических бактерионосителей нетоксигенных штаммов, нельзя недооценивать возможность фаговой конверсии нетоксигенных штаммов в токсигенные, а также возможность возникнове-

12 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

ния функционального tox-гена в результате рекомбинации между неконвертирующими фагами либо в результате спонтанной реверсии в пределах мутантной аллели [34—36]. Таким образом, нельзя исключить участие нетоксигенных, в том числе нетоксигенных токснесущих штаммов в процессе формирования эпидемического клона возбудителя дифтерийной инфекции.

Как показывают данные, полученные в Беларусь еще в середине 60-х годов, наличие антитоксического иммунитета у детей не обеспечивает прекращения циркуляции возбудителя дифтерии среди них. Полный курс вакцинации против дифтерии и не менее одной ревакцинации получили 978 (88,99%) из 1099 бактерионосителей [28]. Данные российских исследователей последних лет подтверждают, что эта же закономерность наблюдается и в настоящее время: среди бактерионосителей привитые лица составляют 80,6—88,8% [33]. Таким образом, несмотря на огромные успехи, достигнутые в борьбе с дифтерией с помощью специфической иммунопрофилактики на протяжении более чем полу века периода, без разработки эффективных мер борьбы с бактерионосительством задача ликвидации этой инфекции является неосуществимой. В то же время вся история иммунопрофилактики инфекции подтверждает реальность достижения полного контроля над заболеваемостью дифтерией. Низкий уровень заболеваемости дифтерией, то есть регистрация единичных спорадических случаев инфекции, или даже полное отсутствие заболеваемости зависит, в первую очередь, от полноты иммунизации населения. Как уже отмечалось, по расчетным данным уровень популяционного иммунитета при этом должен составлять не менее 82—88%. С учетом первичных и вторичных поствакцинальных неудач уровень популяционного иммунитета, как правило, оказывается несколько ниже реального уровня охвата вакцинацией. Следовательно, имеются все основания полагать, что поставленная и выполняющаяся в последние годы в Республике Беларусь цель охвата вакцинацией против дифтерии не менее 97% детей и не менее 95% взрослых позволит поддерживать стабильное эпидемическое благополучие в отношении этой инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гендон Ю. З. // Вопр. вирусологии.— 2000.— № 5.— С. 43—44.
2. Recommendations of the International Task Force for Disease Eradication. // MMWR.— 1993.— Vol. 42.— Р. 1—25.
3. Health 21: the Health for all Policy Framework for the WHO European Region // Copenhagen, 1999.
4. Мэй Р., Андерсон Р. Инфекционные болезни человека. Динамика и контроль.— М., 2004.
5. Hopkins D. R. // Assignment Children / Ed. P. E. Mandl.— Geneva, 1985.— Vol. 69/72.
6. Резолюция Всемирной Ассамблеи здравоохранения (WHA) № 41. 28, 1998.— Женева, 1989.
7. Кардаш И. Б. Итоги применения живой полиомиелитной вакцины в БССР (эпидемиологические, иммунологические, вирусологические исследования и организационные мероприятия): Автограф. дис. ... канд. мед. наук.— Минск, 1968.
8. Кардаш И. Б., Вотяков В. И., Ильинко В. И. и др. // Живая вакцина против полиомиелита: Сб. работ отдела вирусологии ИЭМ АМН СССР / Под ред. А. А. Смородинцева.— Л., 1960.— С. 222—241.
9. Chumakov M. P., Voroshilova M. K., Drozdov S. G. et al. // Second International conference on live poliovirus vaccines: Abstr.— Washington, 1960.— Р. 413—428.
10. Фельдман Э. В., Самойлович Е. О., Вотяков В. И., Титов Л. П. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук.— 2003.— № 4.— С. 140—145.
11. Самойлович Е. О., Ермолович М. А., Свищевская Е. Ю. и др. // ЖМЭИ.— 2007.— № 2.— С. 24—31.
12. Ухова И. Ф., Самойлович Е. О., Ермолович М. А., Свищевская Е. Ю. // Здравоохранение.— 2009.— № 12.— С. 16—19.
13. Ермолович М. А., Самойлович Е. О., Ухова И. Ф. и др. // Вирусные инфекции: эпидемиология, клиника, лабораторная диагностика и профилактика: Материалы междунар. науч.-практ. конф.— Минск, 2007.— С. 66—69.
14. Yakovenko M. L., Korotkova E. A., Ivanova O. E., et al. // J. Virol.— 2009.— Vol. 83, № 7.— Р. 3402—3406.
15. Kew O. M., Sutter R. W., de Gourville E. M., et al. // Annu. Rev. Microbiol.— 2005.— Vol. 59.— Р. 587—635.
16. WHO. Measles: Mortality Reduction and Regional Elimination. Strategic Plan. 2001—2005.— Geneva, 2001.
17. WHO. Eliminating Measles and Rubella and Preventing Congenital Rubella Infection. WHO European Region Strategic Plan 2005—2010.— Copenhagen, 2005.
18. Чистенко Г. Н. // Бел. мед. журн.— 2002.— № 1.— С. 91—94.
19. Самойлович Е. О., Свищевская Е. Ю., Шиманович В. П. и др. // Здравоохранение.— 2007.— № 11.— С. 37—41.
20. Samoilovich E. O., Yermalovich M. A., Semeiko G. V., et al. // Eurosurveillance.— 2006.— Vol. 11, № 7.— E060727.3.
21. Hubschen J. M., Yermalovich M., Semeiko G., et al. // J. Gen. Virol.— 2007.— Vol. 88, № 7.— Р. 1960—1966.
22. Самойлович Е. О., Ермолович М. А., Свищевская Е. Ю. и др. // Здравоохранение.— 2005.— № 12.— С. 53—55.
23. Самойлович Е. О., Семейко Г. В., Ермолович М. А., Свищевская Е. Ю. // ЖМЭИ.— 2010.— № 1.— С. 55—60.
24. Семейко Г. В., Самойлович Е. О., Ермолович М. А. и др. // Здравоохранение.— 2008.— № 12.— С. 20—23.
25. Banatvala J. E., Brown D. W. G. // Lancet.— 2004.— Vol. 3.— Р. 1127—1137.
26. Pandolfi E., Chiaradia G., Moncada M., et al. // Eurosurveillance.— 2009.— Vol. 14.— Р. 1—5.
27. Robertson S. E., Featherstone D. A., Gacic-Dobo M., et al. // Rev. Panam. Salud. Publica.— 2003.— Vol. 14.— Р. 306—315.
28. Суджаев Г. А. Эпидемиологические, микробиологические и иммунологические исследования, связанные с проблемой ликвидации заболеваемости дифтерией в Белоруссии: Автограф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1972.
29. Рытик П. Г. Профилактика дифтерии в Белоруссии (1945—1962 гг.): Автограф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1963.
30. Фаворова Л. А., Астафьевна Н. В., Корженкова М. П. и др. Дифтерия.— М., 1988.
31. Колодкина В. Л., Фельдман Э. В., Дронина А. М. и др. // Здравоохранение.— 1996.— № 12.— С. 29—31.
32. Kolodkina V., Titov L., Sharapa T., et al. // BMC Infect. Dis.— 2006.— № 6.— Р. 129—135.
33. Маркина С. С., Максимова Н. М., Черкасова В. В., Кошкина Н. А. // Вакцинация.— 2006.— № 1.— С. 7—9.
34. Freeman V. J. // J. Bacteriol.— 1951.— Vol. 61.— Р. 675—688.
35. Ciantotto N. P., Groman N. B. // Microbiol Pathogenesis.— 1997.— Vol. 22.— Р. 343—351.
36. Groman N., Cianciotto N., Bjorn M., et al. // Infect. Immun.— 1983.— Vol. 42, № 1.— Р. 48—56.

ROLE OF VACCINATION FOR INFECTIOUS DISEASES CONTROL AND ELIMINATION

E. O. Samoilovich, M. A. Yermolovich, V. L. Kolodkina

The basic principles of managing infections by vaccination are discussed in the article. The terms such as control, elimination and eradication of an infectious disease are determined. The outcomes of vaccine preventing poliomyelitis, measles, rubella, and diphtheria in the Republic of Belarus are presented. The possibilities of realizing programs for eradicating (poliomyelitis), eliminating (measles, rubella) and control (diphtheria) are shown.

Key words: vaccination, control, elimination, infectious disease, eradication.

В. А. ГОРБУНОВ, Л. П. ТИТОВ, Т. С. ЕРМАКОВА

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ ОСНОВНЫХ КЛАССОВ В УЧРЕЖДЕНИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ В 2007—2009 гг.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

В статье представлены данные об использовании основных групп антибиотиков в 44 стационарах Республики Беларусь. Показан удельный вес отдельных антибиотиков, дана сравнительная оценка структуры применения антибиотиков в 2003—2005 и 2007—2009 гг. Установлено, что наибольший удельный вес в структуре антибиотиков составляют β-лактамные антибиотики, макролиды и аминогликозиды. Уровни потребления отдельных препаратов значительно различаются в республиканских, областных, районных и городских учреждениях здравоохранения, а также в зависимости от территориального расположения стационара.

Ключевые слова: антибиотики, характеристика, использование, стационар.

Сегодня убедительно доказано, что нерациональная антибиотикотерапия способствует формированию госпитальных резервуаров мультирезистентных штаммов бактерий, борясь с которыми становится все труднее [1]. Борьба с распространением множественно резистентных форм микроорганизмов является одной из приоритетных задач ВОЗ и национальных систем здравоохранения [2—4].

Скорость развития устойчивости определяется селективным прессингом антибактериальных препаратов на геном микроорганизмов, что в свою очередь зависит от объема и спектра применяемых антибиотиков. Нерациональное применение антибиотиков на уровне отделения, учреждения здравоохранения (УЗ), региона или системы здравоохранения ускоряет процессы формирования резистентности, быстро выводит антибиотики из обращения и, соответственно, увеличивает затраты на химиотерапию в целом, диктует необходимость разработки новых препаратов. Устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков — это основной фактор развития мирового рынка антибиотиков.

Соответственно основой рекомендаций для рациональной антибиотикотерапии при инфекциях является использование результатов микробиологических исследований по определению резистентности к антибиотикам возбудителей этих заболеваний. Данная тактика общепринята (золотой стандарт), она позволяет отслеживать динамику изменения чувствительности микроорганизмов к основным антибактериальным средствам, вносить корректиды в протоколы терапии.

Кроме мониторинга антибиотикорезистентности основных возбудителей инфекций, циркулирующих в УЗ, важным элементом данной системы представляется мониторинг потребления антимикробных препаратов.

В РНПЦ эпидемиологии и микробиологии мониторинг антибиотикорезистентности бактерий, объемов и

спектра применяемых антибиотиков в Республике Беларусь осуществляется с 2003 г. [1, 2, 5].

Ниже представлены материалы, полученные в результате анкетирования в 44 многопрофильных стационарах республиканского, областного, городского, районного уровня 6 областей Республики Беларусь в 2007—2009 гг. Для обеспечения возможности сравнения данные по всем препаратам представлены в средних терапевтических дозах (СТД) и рассчитаны на 100 стационарных коек.

β-лактамные антибиотики характеризуются наличием β-лактамного кольца в химической структуре и общим механизмом действия. Однако между отдельными препаратами существуют значительные различия в уровне и спектре антимикробной активности [6, 7].

Пенициллины. Природные пенициллины (бензилпенициллин, феноксиметилпенициллин) и их пролонгированные производные (бензатинпенициллин) активны в отношении грамположительных бактерий (ГПБ) и некоторых грамотрицательных бактерий (ГОБ) со сложными питательными потребностями (*Neisseria spp.*), чувствительны к действию β-лактамаз бактерий. Изоксазолипенициллины (оксациллин, клоксациллин, диклоксациллин) активны в отношении ГПБ и устойчивы к действию пенициллиназ. Аминопенициллины (ампициллин, амоксициллин) активны в отношении ГПБ, а также некоторых видов ГОБ, чувствительны к действию β-лактамаз. Карбоксипенициллины (карбенициллин, тикарциллин) активны в отношении ГПБ и ГОБ, включая большинство представителей *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonas aeruginosa*, чувствительны к действию β-лактамаз. Уреидопенициллины (азлоциллин, мезлоциллин, пиперациллин) активны в отношении ГПБ, по уровню активности в отношении ГОБ превосходят амино- и карбоксипенициллины. Активны в отношении большинства анаэробных бактерий, чувствительны к β-лактамазам. Ингибиторозащищенные пенициллины (амоксициллин/клавуланат, ампициллин/сульбактам, тикарциллин/клавуланат, пиперациллин/тазобактам) представляют собой комбинацию пенициллина с одним из ингибиторов β-лактамаз, что расширяет спектр их действия [6, 7].

Как видно из представленных данных (табл. 1), препараты группы пенициллинов чаще использовались в городских УЗ.

Объемы их применения колебались в широких пределах — от 4493,2 до 48951,0 дозы на 100 больничных коек/год — в зависимости от уровня и территориального расположения стационара. Основными потребителями антибиотиков этого семейства являлись Минская и Брестская области (табл. 2).

В структуре применения пенициллинов преобладали полусинтетические аминопенициллины (амоксициллин и ампициллин), суммарно составляя более 80% препаратов этого семейства (рис. 1). Удельный вес ингибиторозащищенных пенициллинов, устойчивых к ряду β-лактамаз бактерий, составил 6%.

Цефалоспориновые антибиотики в зависимости от их свойств традиционно делятся на четыре поколения. В целом для них характерно наличие активно-

14 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

Таблица 1

Потребление антибиотиков основных групп в УЗ различного уровня в 2007—2009 гг. (СТД/100 коек/год)

Стационары	Группа антибиотиков								
	β-лактамные				макролиды	амино-гликозиды	фторхинолоны	линко-замиды	
	пенициллины	цефалоспорины	карбапенемы	всего					
Республиканские	5541,5	2250	0	7791,5	492,3	809,4	679,1	0	323,3
Областные	4493,2	11446	258,7	16197,9	395,8	2536,5	2492,7	351,6	204,4
Городские	48951	40293	259,5	89503,5	54765,6	4021,4	1400,6	345,9	419,3
Районные	6687,6	8777	403,3	15867,9	701,6	7092,3	2658,6	1320,2	655,7

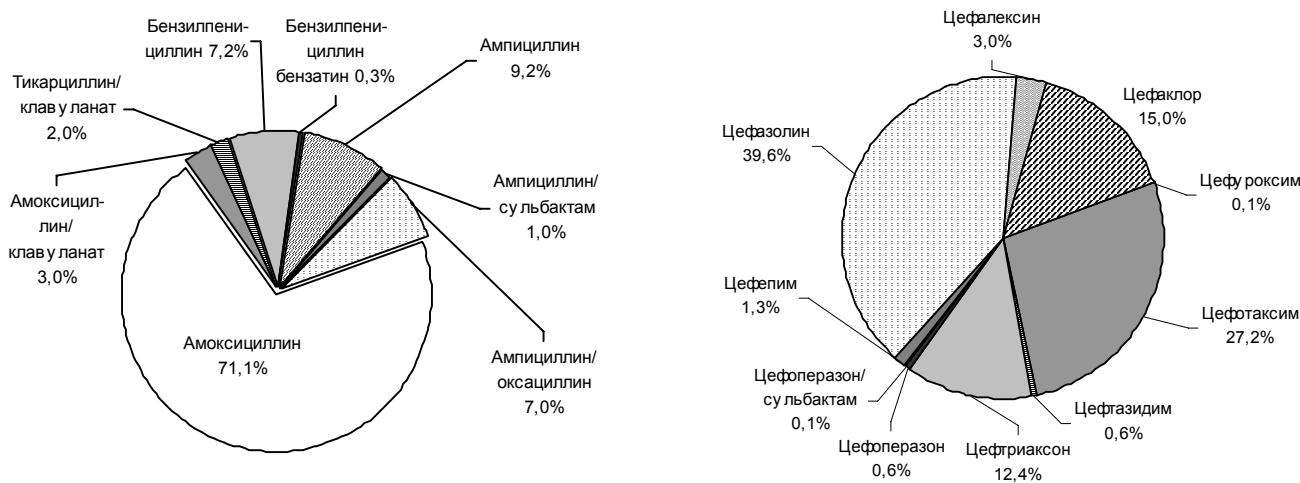


Рис. 1. Структура потребления пенициллинов и цефалоспоринов в стационарах Республики Беларусь в 2007—2009 гг.

сти в отношении широкого круга как ГПБ (за исключением *Enterococcus spp.*), так и ГОБ. С каждым поколением, как правило, расширяется спектр, повышается устойчивость к β-лактамазам [6, 7].

Основными потребителями антибиотиков семейства цефалоспоринов являлись городские УЗ, в которых на 100 коек приходилось около 40 000 доз/год (см. табл. 1). Цефалоспориновые антибиотики чаще использовали в Витебской, Минской и Брестской областях (см. табл. 2).

В структуре применяемых цефалоспоринов преобладали препараты I—II (цефазолин, цефаклор) и III поколений (цефотаксим, цефтриаксон).

Карбапенемы (имипенем, меропенем и др.) обладают наиболее широким спектром антибактериальной активности среди всех известных антибиотиков в отношении грамположительных и грамотрицательных аэробных и анаэробных бактерий; они высокоустойчивы к

действию подавляющего большинства β-лактамаз бактерий; разрушаются хромосомными и плазмидными β-лактамазами расширенного спектра ГОБ [6].

Карбапенемы чаще применялись в учреждениях районного уровня, основными потребителями этих препаратов являлись УЗ Минской, Витебской и Гродненской областей (см. табл. 1, 2).

В республике применяется 4 препарата семейства карбапенемов, в основном имипенем (74,9%) и меропенем (24,2%).

Макролиды классифицируют в соответствии со структурой макролактонного кольца, составляющего ядро препаратов этой группы. Механизм действия макролидов заключается в подавлении биосинтеза белка в результате связывания антибиотиков с 50S-субъединицей рибосом бактерий. Макролиды активны преимущественно в отношении ГПБ и некоторых грамотрицатель-

Таблица 2

Потребление антибиотиков основных групп в областях Республики Беларусь в 2007—2009 гг. (СТД/100 коек/год)

Область	Группа антибиотиков								
	β-лактамные				макролиды	амино-гликозиды	фторхинолоны	линко-замиды	
	пенициллины	цефалоспорины	карбапенемы	всего					
Брестская	12204,8	18164,3	93,1	30462,2	508,0	3485,3	3413,1	569,1	862,9
Витебская	1962,9	19490,5	392,4	21845,8	639,6	1440,4	3063,9	108,3	320,6
Гомельская	5886,2	7922,2	46,8	13855,2	292,9	1256,1	1926,7	454,9	108,0
Гродненская	7301,4	8776,6	331,0	16409,0	1062,4	2829,1	4425,2	292,7	1158,5
Минская	27019,1	18184,1	701,4	45904,6	26856,1	12572,6	1846,6	1635,7	479,7
Могилевская	3037,5	4021,6	23,7	7082,8	269,4	2296,1	724,5	50,8	84,9

ных аэробов — *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria*. Большое значение имеет активность макролидов в отношении микроаэрофилов — *Campylobacter*, *Helicobacter*. Определенной активностью макролиды обладают также в отношении анаэробов.

Макролидные антибиотики высокоактивны в отношении микроорганизмов, являющихся облигатными или факультативными внутриклеточными паразитами: *Chlamydia*, *Legionella*, *Mycoplasma*, *Rickettsia*, *Treponema*, *Borrelia* [6, 7].

Макролидные антибиотики чаще применялись в городских стационарах Минска и Минской области (см. табл. 1, 2). В структуре применения макролидов преобладали кларитромицин (83,1%) и азитромицин (14,8%) (рис. 2).

К аминогликозидным антибиотикам относятся стрептомицин, канамицин, гентамицин, тобрамицин, нетилмицин, амикацин и др. Механизм действия аминогликозидов связан с подавлением синтеза белка путем необратимого связывания с 30S-субъединицей рибосом бактерий. Эти антибиотики активны в отношении ГОБ и, в меньшей степени, в отношении стафилококков. Стрептомицин отличается наибольшей активностью в отношении микобактерий туберкулеза, тобрамицин — *P. aeruginosa*, нетилмицин — стафилококков.

На основании данных о чувствительности или устойчивости ГОБ к одному из аминогликозидов прогнозировать уровень резистентности к другим антибиотикам этой группы в большинстве случаев невозможно.

Для стафилококков, но не для ГОБ, устойчивость к гентамицину означает устойчивость ко всем другим аминогликозидам (кроме стрептомицина) независимо от результатов оценки чувствительности *in vitro*.

В отношении ГОБ амикацин отличается наименьшей частотой перекрестной резистентности с другими аминогликозидными антибиотиками [6].

К фторхинолонам относятся норфлоксацин, пефлоксацин, ципрофлоксацин, офлоксацин, ломефлоксацин, левофлоксацин, спарфлоксацин, моксифлоксацин и др.

Механизм действия хинолонов связан с ингибицией ДНК-гиразы и топоизомеразы IV — ферментов, обеспечивающих изменение пространственной конформации молекулы ДНК бактерии. Фторхинолоны проявляют высокую активность в отношении практически всех ГОБ.

Наименьшим уровнем активности среди них отличается норфлоксацин, применяющийся только для лечения инфекций мочевыводящих путей. По уровню активности в отношении ГПБ фторхинолоны можно разделить на две группы: норфлоксацин, пефлоксацин, ципрофлоксацин, офлоксацин и ломефлоксацин отличаются клинически малозначимой активностью в отношении этих микроорганизмов; левофлоксацин, спарфлоксацин и моксифлоксацин высокоактивны в отношении стафилококков и стрептококков. Наибольшее клиническое значение имеет их активность в отношении пневмококков [6, 7].

Аминогликозиды чаще применялись в стационарах Минска и Минской области, учреждениях районного и городского подчинения (см. табл. 1, 2).

В структуре применения антибиотиков этого класса (рис. 3) преобладал гентамицин (63,5%) и амикацин (34,6%).

Потребление фторхинолонов в зависимости от уровня стационара колебалось от 679 до 2658 доз на 100 коек/год (см. табл. 1). Эти препараты чаще применялись в Гродненской, Брестской и Витебской областях (см. табл. 2).

Наиболее часто применяемыми фторхинолонами (см. рис. 3) являлись ципрофлоксацин (52,3%) и офлоксацин (21%).

Линкозамиды (линкомицин, клиндамицин) по механизму действия весьма близки к макролидам. Линкомицин и клиндамицин подавляют биосинтез белка путем связывания с 50S-субъединицей рибосом в том же участке, с которым связываются макролиды. Линкозамиды высокоактивны преимущественно в отношении грамположительных микроорганизмов (за исключением энтерококков), умеренно активны в отношении *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Helicobacter*. Важным свойством линкозамидов является высокая активность в отношении анаэробных бактерий. Линкомицин и клиндамицин характеризуются перекрестной резистентностью, обусловленной метилированием участка связывания рибосом с антибиотиками [6].

Линкозамиды, применяемые в основном для терапии стафилококковых инфекций, чаще использовали в стационарах районного подчинения, где на 100 коек приходилось более 1300 доз/год. Чаще эти антибиотики применяли в Минске и Минской области (см. табл. 1, 2).

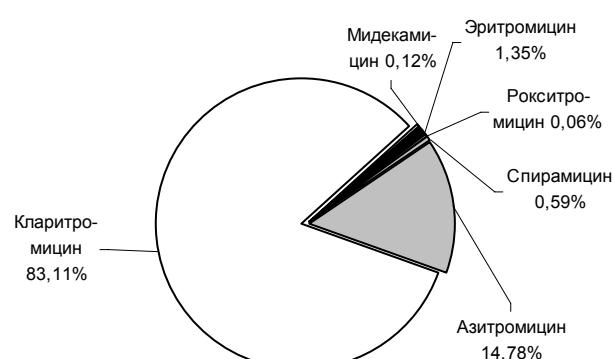
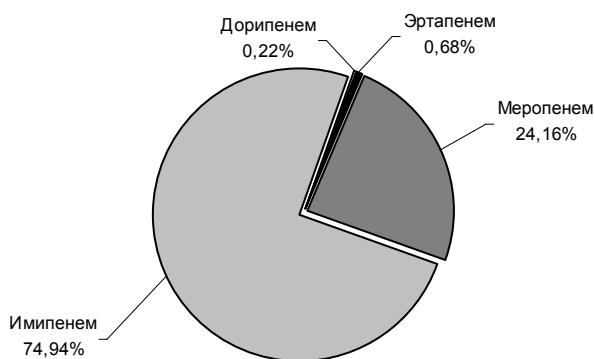


Рис. 2. Структура потребления карбапенемов и макролидов в стационарах Республики Беларусь в 2007—2009 гг.

16 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

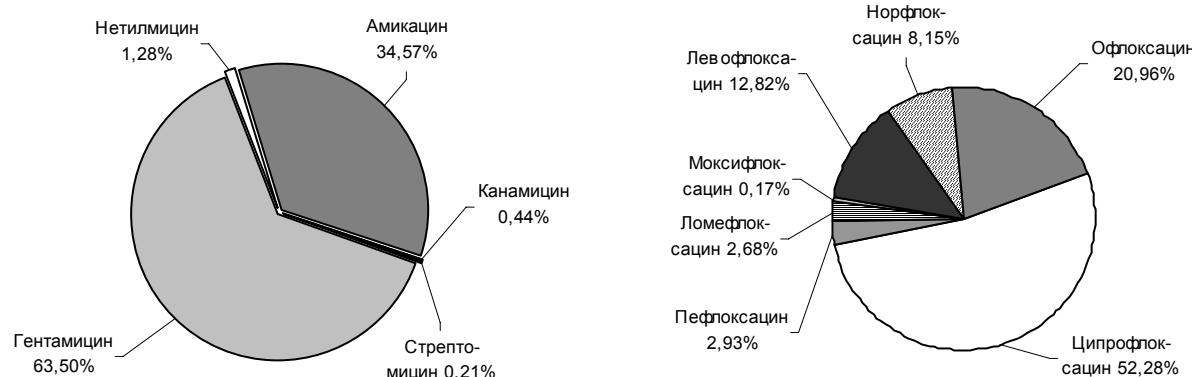


Рис. 3. Структура применения аминогликозидов и фторхинолонов в стационарах Республики Беларусь в 2007—2009 гг.

В лечебной практике использовали два линкозамида, причем в структуре препаратов этого класса они имели сопоставимый удельный вес (рис. 4).

Тетрациклины (тетрациклин, доксициклин). Механизм действия тетрациклических антибиотиков заключается в ингибции биосинтеза белка путем связывания с 30S-субъединицей бактериальных рибосом. Тетрациклины обладают широким спектром антибактериальной активности в отношении ГПБ и ГОБ и значительной части анаэробов. По уровню активности тетрациклины очень близки между собой. Клиническое значение тетрациклических антибиотиков в последнее время снизилось в связи с широким распространением устойчивости среди условно-патогенных микроорганизмов и появлением других высокоактивных антибиотиков. Тетрациклины сохраняют высокую эффективность при лечении бруцеллеза, холеры, риккетсиозов, боррелиоза, хламидиоза, микоплазмоза, туляремии.

Тетрациклины чаще применяли в районных стационарах Гродненской и Брестской областей (см. табл. 1, 2).

В группе тетрациклических антибиотиков (см. рис. 4) основное клиническое значение имеет синтетический препарат доксициклин, на долю которого приходилось 96%.

Представляет интерес доля отдельных классов антибиотиков, применяемых в республике (рис. 5). Наибольший удельный вес в структуре антибиотиков имеют β-лактамные препараты (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы) — 60,8%. Второе место по частоте при-

менения занимают макролиды (удельный вес в структуре — 26,5%). Аминогликозиды занимают третье место в структуре, их удельный вес составил 6,8%. На все остальные антибиотики в сумме приходилось 5,9%.

Сравнивая полученные данные с международными (см. рис. 5), необходимо отметить, что крупнейшим сегментом мирового рынка антибиотиков являются препараты цефалоспоринового ряда, объем продаж которых в коммерческом и госпитальном секторах в 2006 г. составил 27% от общего объема мирового рынка антибиотиков. Вторую позицию в мировых продажах занимают макролиды (20%), третью — хинолоны (18%), четвертую — пенициллины (17%). Совокупный объем продаж антибиотиков 4 основных групп составляет около 82% мирового объема продаж [8].

По прогнозам аналитиков, лидирующее положение на рынке антибиотиков к 2011 г. займут хинолоны. Доля цефалоспоринов — лидера рынка в 2007 г. — снижается в связи с прекращением действия многих патентов. Рост продажи цефалоспоринов в ближайшие годы составит 2,2%, фторхинолонов — 12,2% ежегодно. Карбапенемы образуют на данный момент один из самых небольших по объему сегментов мирового рынка антибиотиков, однако ожидается, что они значительно усилят свои позиции к 2011 г. К 2012 г. ситуация на мировом рынке антибиотиков претерпит значительные изменения. Большинство лидирующих на настоящий момент брендов столкнутся с конкуренцией со стороны дженериков,

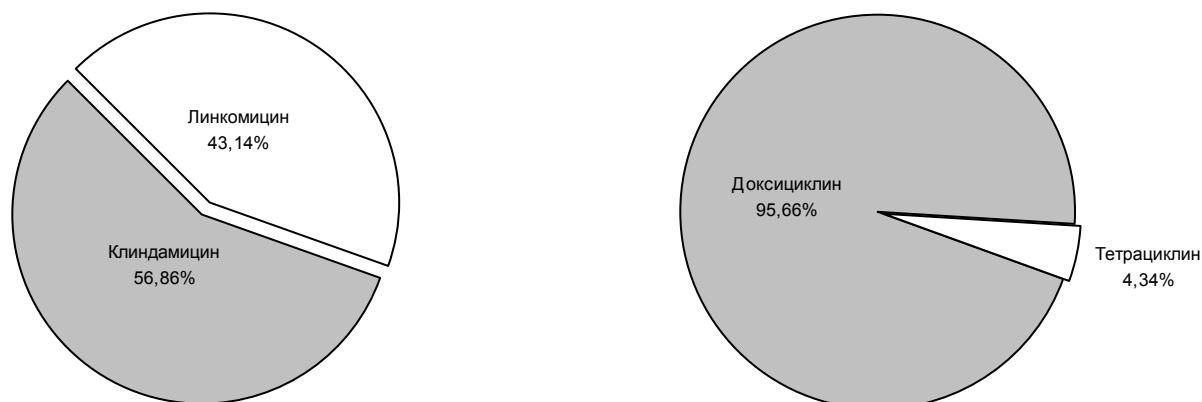


Рис. 4. Структура применения линкозамидов и тетрациклических антибиотиков в стационарах Республики Беларусь в 2007—2009 гг.

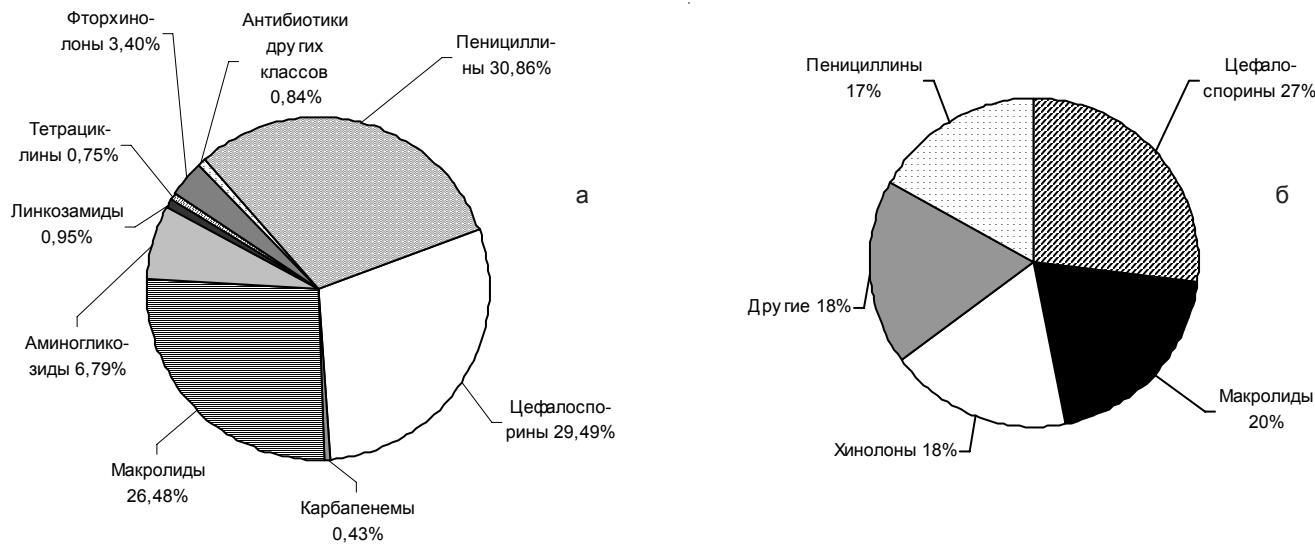


Рис. 5. Удельный вес применения разных классов антибиотиков:

а — в стационарах Республики Беларусь в 2007—2009 гг.; б — структура мирового потребления антибиотиков в 2006 г.

и на рынке появится с десяток новых антибиотиков. К 2012 г. продажи лидирующих брендов будут составлять около 36% от всех продаж антибиотиков в мире [8].

Структура применения антибиотиков в 2007—2009 гг. по сравнению с 2003—2005 гг. претерпела изменения в сторону повышения удельного веса более активных современных препаратов и снижения доли антибиотиков с неблагоприятными фармакологическими, микробиологическими и токсикологическими характеристиками (тетрациклины, хлорамфеникол, гентамицин и др.). Однако причины предпочтения одних препаратов другим и различия стационаров в интенсивности потребления отдельных антибиотиков в 2—10 раз не ясны.

Проведенный анализ потребления антибиотиков в ряде стационаров республики показывает, что стратегия использования этих лекарственных средств с 2003 г. претерпела значительные изменения. Наибольший удельный вес в структуре антибиотиков имеют β -лактамные антибиотики, макролиды и аминогликозиды. В структуре применяемых препаратов возрос удельный вес высокоактивных и менее токсичных антибиотиков. Препараты, к которым наблюдается высокая частота устойчивости бактерий, циркулирующих в стационарах республики, утратили былую популярность. Вместе с тем уровни потребления отдельных препаратов значительно различаются в республиканских, областных, районных и городских УЗ, а также в зависимости от территориального расположения стационаров. Необходимы динамическое исследование и корректировка политики применения антибиотиков в республике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Титов Л. П. и др. Национальная система мониторинга антибиотикорезистентности возбудителей гнойно-септических инфекций и потребления антибиотиков в ЛПО: Информ. материалы.— Минск, 2006.
2. Титов Л. П. и др. // БелНИИЭМ — практическому здравоохранению.— Минск, 2000.— Вып. 4.— С. 31—37.
3. Титов Л. П., Ключенович В. К. Резистентность микробов к антимикробным препаратам.— Минск, 2003.— С. 4—13.
4. Nordberg P., Monnet D. L., Cars O. Antibacterial drug resistance: Options for concerted action.— Geneva, 2005.
5. Гудкова Е. И. и др. // Бел. мед. журн.— 2005.— № 2.— С. 4—7.
6. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л. С. Страчунского и др.— М., 2002.
7. Ребенок Ж. А. Рациональная антибиотикотерапия: Инструкция по применению.— Минск, 2003.
8. Академия конъюнктуры промышленных рынков: www.newchemistry.ru/printletter.php?n_id=2802

ADMINISTRATION OF ANTIBIOTICS OF MAIN CLASSES IN PUBLIC HEALTH INSTITUTIONS OF REPUBLIC OF BELARUS IN 2007 – 2009

V. A. Gorbunov, L. P. Titov, T. S. Yermakova

The data about administration of antibiotics of the main groups in 44 stationaries of the Republic of Belarus are presented in the article. The ratio of certain antibiotics administration is shown, a comparative assessment of the antibiotics administered structure in 2003 – 2005 and in 2007 – 2009 is given. It has been determined that β -lactam antibiotics, macrolides and aminoglycosides form the largest group in the antibiotics structure. The levels of consuming individual preparations differ significantly in the republican, regional, district, and city institutions of public health as well as depending on the stationary territorial location.

Key words: antibiotics, characteristic, administration, stationary.

18 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

Е. И. БОРЕКО, Н. И. ПАВЛОВА

УСТОЙЧИВОСТЬ ВИРУСОВ ГРИППА К ИНГИБИТОРАМ М2 БЕЛКА И НЕЙРАМИНИДАЗЫ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

Анализ литературных данных свидетельствует о широком распространении штаммов вирусов гриппа, устойчивых к ингибиторам М2 белка (амантадин, ремантадин) и нейраминидазы (оселтамишивир). Вирусы гриппа В изначально недостаточно чувствительны к ингибиторам М2 белка. В связи с появлением ингибиторов нейраминидазы, эффективных при гриппе А и В, применение ингибиторов М2 белка было отменено в США начиная с 2005 г. Однако уже в 2008—2009 гг. зарегистрировано резкое снижение эффективности оселтамишивира в отношении вируса сезонного гриппа А (H1N1) и глобальное распространение оселтамишивирустойчивого варианта вируса. Воздушно-воздушный пандемии свиного гриппа А (H1N1) 2009 г., согласно имеющейся на тот период времени информации, был устойчив к действию ремантадина и чувствителен к действию оселтамишивира. Однако в том же году начали появляться сообщения о выделении вариантов вируса пандемического гриппа А (H1N1), устойчивых к действию оселтамишивира, прежде от лиц, принимавших препарат с профилактической целью. ВОЗ к настоящему времени располагает информацией о множественных случаях резистентности воздушного пандемического гриппа А (H1N1) к оселтамишивиру. Показана возможность распространения такого вируса в человеческой популяции. Складывающаяся ситуация вызывает беспокойство по поводу ожидаемого возникновения двойной устойчивости воздушного пандемического гриппа А (H1N1) к ремантадину и оселтамишивиру. ВОЗ в случае известной или подозреваемой устойчивости воздушного гриппа к оселтамишивиру рекомендует использовать занамивир, который пока эффективен в отношении всех воздушных гриппа А и гриппа В. Согласно выводам, следующим из математической модели развития пандемии гриппа Wu J. T. и соавт., использование вторичных антивирусных средств на ранней стадии локальных эпидемий позволит снизить опасность глобального развития резистентности к первичным (базовым) противогриппозным средствам. Из массово доступных препаратов вторичными средствами могут быть арбидол (арпетол), гроприносин, фитогор и другие средства с экспериментально доказанными противовирусными свойствами.

Ключевые слова: ремантадин, оселтамишивир (тамифлю), вирусы гриппа, лекарственная устойчивость.

Вирусные инфекции представляют особый тип патологии. Борьба с ними возможна на основе вакцино-профилактики. При отдельных инфекциях это дает ощутимый результат, заключающийся в глобальном или территориальном искоренении заболеваемости (оспа, полиомиелит). В других случаях вследствие быстрой антигенной изменчивости воздушного гриппа или наличия большого количества его серотипов (энтеровирусные, риновирусная и другие респираторные инфекции) полный контроль не достигается. При таких заболеваниях вспомогательную или главенствующую роль и в профилактике, и в лечении выполняют противовирусные химиопрепараты, разрабатываемые чаще всего на основе синтетических субстанций.

Наиболее массовой вирусной инфекцией, характеризующейся высокой контагиозностью и патогенностью,

сезонностью и пандемическим характером распространения, наличием различающихся типов и антигенных групп воздушителей, изменчивостью, является грипп. Среди доступных и наиболее используемых химиопрепаратов для экстренной профилактики и лечения гриппа основными (базовыми) являются ремантадин (а также амантадин, ингибиторы М2 белка вируса гриппа А) и тамифлю (оселтамишивир фосфат, провещество оселтамишивир карбоксилата — ингибитора нейраминидазы вирусов гриппа А и В). Основной областью применения ремантадина является грипп А (профилактика и лечение), однако лечебный эффект препарата доказан и при гриппе В. Тамифлю может применяться при гриппе А и при гриппе В, хотя его противовирусные свойства в последнем случае также менее выражены [1, 2].

События последних лет, связанные с развитием лекарственной устойчивости воздушных гриппа к применяемым массово лекарственным препаратам, а также появление новых вариантов вируса гриппа А заставили изменить тактику использования этих средств. В частности, применение ремантадина (амантадина) было прекращено в США с 2005 г. и лишь с 2009 г. снова рекомендовано совместно с тамифлю при лечении гриппа, вызванного новой разновидностью пандемического вируса гриппа А (H1N1). Что же касается тамифлю, то результаты мониторинга лекарственной устойчивости воздушных гриппа 2008—2009 гг. свидетельствуют о мировой тенденции резкого снижения эффективности препарата в отношении вируса сезона гриппа А (H1N1), вплоть до 100% устойчивости воздушного гриппа А (H1N1), и, более того, о глобальном распространении оселтамишивирустойчивого варианта вируса, в том числе в странах, где тамифлю применялся ограниченно.

До появления пандемического (свиного) вируса гриппа А (H1N1) весной 2009 г. ситуация относительно рационального применения ремантадина и тамифлю с учетом данных о чувствительности/устойчивости вируса гриппа различных типов и антигенных вариантов вируса гриппа А в целом укладывалась в следующую схему дифференцированного использования: для гриппа А (H3N2) и гриппа В — тамифлю, для гриппа А (H1N1) — ремантадин [1, 3]. С возникновением пандемии свиного гриппа А (H1N1), воздушного которого, согласно имеющимся сообщениям, устойчив к действию ремантадина и чувствителен к действию тамифлю, эти ориентиры на какое-то время потеряли свою значимость [4]. Однако тот факт, что воздушный пандемический грипп идентичен по антигенному формуле вирусу сезона гриппа А (H1N1), не мог не сказаться, и в условиях последовавшего массового применения тамифлю как с лечебной, так и с профилактической целью начиная уже с 2009 г. стали появляться сообщения об устойчивости пандемического вируса гриппа А (H1N1) к действию оселтамишивира, который широко использовался в лечении и профилактике. Были зарегистрированы спорадические случаи обнаружения устойчивости изолятов пандемического вируса гриппа А (H1N1) к оселтамишивиру, первыми из них стали случаи в летнем лагере в штате Северная Каролина, где в связи со вспышкой гриппоподобного

заболевания, начавшегося 18 июня, дети и персонал принимали тамифлю с целью профилактики [5, 6].

Мутация H275Y (H274Y) в гене нейраминидазы (замена гистидина на тирозин), ассоциированная с высоковирусной резистентностью к оселтамивиру, зарегистрирована у различных штаммов вируса пандемического гриппа А (H1N1): A/Washington/29/2009, A/North Carolina/15/2009, A/North Carolina/16/2009. Кроме того, обнаружен ряд замен в других аминокислотных остатках нейраминидазы, снижающих чувствительность вирусов сезонного гриппа H1N1, H3N2, H5N1 и в действии ингибиторов нейраминидазы [7].

Большинство изолятов пандемического гриппа А (H1N1) оставались чувствительными к ингибиторам нейраминидазы, и мутация H275Y (H274Y) определялась в основном в образцах вируса от пациентов с тяжелым течением заболевания и иммунокомпрометированных пациентов, принимавших тамифлю с целью лечения [8].

К середине ноября 2009 г. ВОЗ имела информацию о множественных случаях устойчивости к оселтамивиру у пациентов, принимавших препарат с целью профилактики, резистентность могла также развиваться при приеме субтерапевтических доз препарата, но о распространении данного вируса ранее не сообщалось [5, 6]. Первые случаи передачи штамма свиного гриппа, устойчивого к действию оселтамивира, от пациента к пациенту зарегистрированы 20.11.2009 г. в Великобритании (госпиталь Уэльского университета в Кардиффе) [9]. Таким образом, вирус пандемического гриппа А (H1N1), устойчивый к оселтамивиру, способен к распространению, и дальнейшее развитие устойчивости к действию тамифлю может повторить тенденцию, отмечавшуюся в случае сезонного гриппа А (H1N1). Как показано в работе D. Weinstock и G. Zuccotti, динамика нарастания устойчивости вируса гриппа А (H1N1) к оселтамивиру за период 2007—2009 гг. в точности повторяет динамику роста устойчивости вируса гриппа А (H3N2) к амантадину и ремантадину за период 2004—2006 гг.: с менее 20% в предыдущем эпидемическом сезоне до 90—100% в следующем [10]. Высказано предположение о том, что к распространению устойчивости к оселтамивиру пандемического вируса гриппа А (H1N1) может привести также дальнейшая реассортация со штаммами сезонного гриппа [11].

Чем-то сходная ситуация имела место в 2006 г. в связи с возникшей угрозой возникновения пандемии птичьего гриппа А (H5N1). Вначале о возбудителе было объявлено, что он устойчив к действию ремантадина и чувствителен к действию оселтамивира. Позднее же оказалось, что вирус птичьего гриппа А (H5N1) устойчив к действию оселтамивира, и применение препарата при данной разновидности инфекции неэффективно.

Интересен предполагаемый путь возникновения этой устойчивости. Более 80% оселтамивира карбоксилата, активного метаболита тамифлю, выводится из организма в неизмененном виде. Оселтамивир не распадается в сточных водах и присутствует в водном окружении во время эпидемического сезона. Концентрация оселтамивира в сточных водах достигает в этот период 290 нг/л,

в речной воде — 190 нг/л. Большинство распространенных вирусов гриппа переносятся водоплавающими птицами, и с этим может быть связано появление резистентных к оселтамивиру вариантов вируса А (H5N1), а также и других вирусов гриппа у диких птиц [12, 13]. Показано также, что в основе устойчивости вируса гриппа А (H5N1) к оселтамивиру лежат особенности молекулярного строения возбудителя. Кристаллографическое изучение структуры нейраминидазы вирусов гриппа позволило установить, что гидрофобные остатки Try347 нейраминидазы вируса А (H5N1) не соответствуют гидрофильным карбоксильным группам оселтамивира, как это имеет место в случае нейраминидазы вируса гриппа А (H1N1) [14]. В результате взаимодействие молекул препарата с гликопротеином вируса H5N1 невозможно.

Таким образом, складывающаяся на сегодняшний день ситуация вызывает беспокойство по поводу ожидаемого возникновения двойной устойчивости возбудителя пандемического гриппа А (H1N1) и к ремантадину, и к оселтамивиру [6, 15, 16]. В связи с этим возникает естественный вопрос о возможной тактике использования противогриппозных средств в этих условиях.

ВОЗ в случае известной или подозреваемой устойчивости возбудителя гриппа к оселтамивиру рекомендует использовать занамивир (ингаляционная форма оселтамивира карбоксилата), который пока эффективен в отношении всех возбудителей гриппа А и гриппа В [3]. К настоящему времени фармацевтической промышленностью производятся и другие противовирусные средства, эффективные при гриппе. Наиболее известными и доступными из них в нашей Республике являются препараты из группы иммуномодуляторов — арбидол (арпетол), гроприносин, а также фитолектиновый сбор «Фитогор». Однако, несмотря на лекарственную устойчивость к основным препаратам, каковыми являются ремантадин и тамифлю, ориентироваться на полный отказ от их применения не стоит по некоторым причинам.

Прежде всего следует учитывать сравнительную эффективность доступных противогриппозных средств. Уникальный механизм противогриппозного действия ингибиторов M2 белка и нейраминидазы вирусов гриппа позволяет реализовать противовирусный эффект в микро- и наномолярных (в случае оселтамивира) концентрациях, то есть имеется существенный запас в пределах диапазона нетоксичных эффективных концентраций. Преодоление резистентности в случае использования этих средств в качестве монопрепараторов может быть достигнуто увеличением дозировки в пределах допустимых значений. Так, рекомендациями ВОЗ по фармакологической терапии пандемического гриппа А (H1N1) предусмотрено использование высших дозировок оселтамивира и максимальной продолжительности лечения пациентов с тяжелым или прогрессирующим течением заболевания [3].

Гораздо более успешной может быть тактика комбинированного использования противогриппозных средств, позволяющая увеличить общую эффективность за счет синергизма или аддитивности действия, и использование при этом в качестве одного из компонентов сочетания препаратов базового противовирус-

20 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

ного средства с наиболее высокой активностью необходимо. Благодаря различающимся механизмам действия использующихся препаратов достигается замедление развития лекарственной устойчивости возбудителя и/или преодоление уже имеющейся резистентности, а также расширение спектра противовирусного эффекта. Согласно общепринятому подходу наиболее удачными считаются сочетания препаратов, позволяющие оказать, с одной стороны, непосредственное воздействие на возбудитель, а с другой — воздействие, опосредованное стимуляцией естественных защитных систем и механизмов организма. В частности, при комбинированном применении амантадина со стимуляторами продукции интерферона увеличивается индекс эффективности с 3,1 до 5,0, использование ремантадина совместно с современными иммуномодулирующими препаратами приводит к повышению противовирусной активности в 3—20 раз и более [17, 18].

Следует отметить, что комбинированное использование ремантадина с другими препаратами более проанализировано в сравнении с применением тамифлю. Из литературы известны такие удачные сочетания на основе ремантадина, как сочетание ремантадина с рибавирином, с арбидолом, с но-шпой [19—21]. Сочетание тамифлю с амантадином в предвидении усугубления ситуации с распространением устойчивых вариантов вируса рекомендуется дополнить рибавирином [15].

К сожалению, к настоящему времени для большинства перспективных сочетаний препаратов, которые интуитивно приемлемы, имеются лишь экспериментальные и, реже, клинические данные, но официально для использования они не утверждены. ВОЗ не рекомендует использовать такие сочетания до их принятия директивными органами. Однако в развитие рекомендаций по фармакологическому мониторингу пандемического гриппа А (H1N1) изучение эффективности существующих и разрабатывающихся противовирусных и сопутствующих средств, изучение эффективности иммунотерапии, в том числе с использованием сыворотки, плазмы, моноклональных антител, сравнительные клинические испытания ингибиторов нейраминидазы, стандартизация клинических и вирусологических подходов, сравнительное изучение эффективности комбинаций средств в популяции, разработка альтернативных лекарственных форм и другие направления в области химиотерапии гриппа признаются приоритетными [3].

Согласно выводам, следующим из математической модели развития пандемии гриппа, использование вторичных антивирусных средств на ранней стадии локальных эпидемий снижает опасность глобального развития резистентности к первичным (базовым) противогриппозным средствам [22, 23]. Из массово доступных препаратов такими вторичными средствами могут быть арбидол (арпетол), гроприносин, фитогор, другие средства с экспериментально доказанными противовирусными свойствами.

Среди них прямым вирусингибирующим и вирулицидным эффектом широкого спектра действия, в том числе в отношении лекарственно-устойчивых штаммов

вирусов, обладает сбор лекарственных растений «Фитогор», применение которого разрешено при гриппе в качестве вспомогательного средства. Собственные экспериментальные данные свидетельствуют о выраженных вирусингибирующих и вирулицидных свойствах в отношении вирусов гриппа, герпеса простого, ЕCHO 6, а также достаточно высокой эффективности препарата при экспериментальной гриппозной инфекции у лабораторных животных [24, 25]. В результате контролируемого эпидемиологического наблюдения, проведенного в НИИ гриппа РАМН (Санкт-Петербург, Россия), установлено, что профилактическая эффективность водного настоя фитогора при гриппе по эффективности в 1,9 раза превышает эффективность человеческого лейкоцитарного интерферона альфа-2 и в 2,5 раза — иммунала (информация размещена на сайте <http://fitogor.narod.ru/content1.html>).

Гроприносин — комплексный синтетический препарат, сочетающий в себе свойства универсального иммуномодулятора с прямой противовирусной активностью в отношении широкого спектра ДНК и РНК вирусов. Показаниями к применению препарата являются вирусные инфекции: грипп, парагрипп, рино-, адено- и другие вирусные респираторные инфекции, заболевания, вызванные вирусами герпеса простого, вирусные гепатиты, вторичные инфекционно-вирусные заболевания на фоне ВИЧ-инфекции; острые и хронические инфекционные заболевания дыхательных путей, мочеполовой системы; вторичные иммунодефицитные состояния, вызванные применением цитостатиков и иммуносупрессоров, лучевой и химиотерапии у онкологических больных, неблагоприятными социальными и экологическими факторами. Гроприносин может быть использован также для этиотропной терапии энтеровирусных инфекций [26].

Арпетол — отечественный аналог российского препарата «Арбидол» — обладает противовирусным и иммуностимулирующим действием. Активен в отношении вирусов гриппа А всех субтипов и вируса В.

Рибавирин представляет собой универсальный ингибитор репродукции всех оболочечных вирусов нуклеозидного ряда. Этот препарат обладает широким спектром противовирусного действия, но особенно активен в отношении вирусов гриппа и первоначально разрабатывался как противогриппозный препарат. Значительно более высокая эффективность рибавирина достигается при аэрозольном применении, особенно в комбинации с амантадином или ремантадином. По причине недостаточной эффективности, установленной в эпидемиологических испытаниях, а также достаточно серьезных побочных эффектов рибавирин не используется как противогриппозное средство, и показаниями к его применению являются тяжелые РС-вирусные поражения нижних отделов дыхательных путей. Препарат используется аэрозольно под наблюдением медицинского персонала в стационарных условиях.

Для профилактики и лечения гриппа (в последнем случае лучше в комбинации с противогриппозными химиопрепаратами) могут быть использованы также

препараты интерферона, индукторы интерферонообразования, другие иммуномодуляторы (интерферон человеческий лейкоцитарный, виферон, циклоферон, нуклеинат натрия, иммунал, гроприносин и др.). Упомянутый выше арбидол также относится к иммуномодулирующим средствам.

В заключение следует напомнить, что в классическом представлении наиболее массовым методом профилактики гриппа является вакцинация. Химиопрофилактика относится к вспомогательным методам предотвращения распространения гриппа и в глобальном масштабе не рекомендована [3]. Однако существуют группы лиц, которым показана экстренная химиопрофилактика гриппа. Это лица с противопоказаниями к вакцинации; лица, не успевшие привиться до начала эпидемии или привитые с опозданием; контактные лица в семейных очагах и коллективах закрытого и полузакрытого типа, где появляются первые заболевшие (в этом случае химиопрофилактика должна начинаться одновременно с началом лечения больных, по возможности с использованием вторичных, то есть отличающихся по механизму противовирусного действия средств); лица, относящиеся к группам риска согласно перечню рекомендаций ВОЗ (дети, в основном в возрасте до 2 лет; беременные; больные хроническими легочными и сердечно-сосудистыми заболеваниями, хроническими заболеваниями почек, печени, больные с метаболическими нарушениями, например с диабетом, заболеваниями ЦНС; больные с гемоглобинопатиями, иммуносупрессией, в том числе с ВИЧ-инфекцией; дети, получающие аспирин; лица старше 65 лет) [3]. Химиопрофилактика гриппа противопоказана в течение 2 нед после прививки живой противогриппозной вакциной.

Вирусы гриппа А подвержены изменчивости, и, поскольку вакцинация проводится имеющимися в наличии препаратами, заготовленными на основе прогнозных показателей циркуляции вирусов и развития эпидемии на предстоящий сезон, в реальности могут складываться ситуации, когда антигенный состав использованной вакцины недостаточно полно соответствует доминирующему возбудителю. В таком случае вакцинация неспособна создать адекватную иммунную прослойку населения и химиопрофилактика вынужденно становится основным медикаментозным способом профилактики заболеваемости гриппом.

ЛИТЕРАТУРА

- Бореко Е. И., Павлова Н. И. // Здравоохранение.— 2009.— № 10.— С. 13—16.
- Sheu T. G., Deyde V. M., Okomo-Adhiambo M., et al. // Antimicrob. Agents Chemother.— 2008.— Vol. 52, № 9.— P. 3284—3292.
- WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses.— Geneva, 2010.
- CDC // MMWR.— 2009.— Vol. 58.— P. 433—435.
- World Health Organization. Pandemic (H1N1) 2009: update 60.— Geneva, 2009.
- Oseltamivir-resistant 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in two summer campers receiving prophylaxis — North Carolina, 2009 // MMWR.— 2009.— Vol. 58, № 35.— P. 969—972.
- Deyde V. M., Sheu T. G., Trujillo A. A., et al. // Antimicrob. Ag. Chemother.— 2010.— Vol. 54, № 3.— P. 1102—1110.
- Wang B., Dwyer D. E., Blyth C. C., et al. // Antiviral Res.— 2010.— Vol. 87, № 1.— P. 16—21.
- Gulland A. // BMJ.— 2009.— Vol. 339.— P. 4975.
- Weinstock D. M., Zuccotti G. // JAMA.— 2009.— Vol. 301, № 10.— P. 1066—1069.
- Scalera N. M., Mossad S. B. // Postgrad. Med.— 2009.— Vol. 121, № 5.— P. 43—47.
- Soderstrom H., Jarhult J. D., Olsen B. et al. // PLoS ONE.— 2009.— Vol. 4, № 6.— e6064.
- Ghosh G. C., Nakada N., Yamashita N., Tanaka H. // Environ. Health Perspectives.— 2010.— Vol. 118, № 1.— P. 103—107.
- Wang S. Q., Du Q. S., Huang R. B., et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 2009.— Vol. 386, № 3.— P. 432—436.
- Nguyen J. T., Hoopes J. D., Le M. H., et al. // PLoS ONE.— 2010.— Vol. 5, № 2.— e9332.
- Hurt A. C., Holien J. K., Parker M. W., Barr I. G. // Drugs.— 2009.— Vol. 69, № 18.— P. 2523—2531.
- Бореко Е. И., Павлова Н. И. // Мед. новости.— 1999.— № 3.— С. 20—25.
- Бореко Е. И., Павлова Н. И., Николаева С. Н. и др. // Междунар. науч. конф. «Новые лекарственные средства: синтез, технология, фармакология, клиника»: Тез. докл.— Минск, 2001.— С. 17—18.
- Galegov G. A., Pushkarskaya N. L., Obrosova-Serova N. P., Zdanov V. M. // Experientia.— 1977.— Vol. 33.— P. 905—906.
- Бурцева Е. И., Шевченко Е. С., Ленева И. А. и др. // Вопр. вирусол.— 2007.— № 2.— С. 24—29.
- Осидак Л. В., Афанасьева О. И., Дриневский В. П. и др. // Леч. врач.— 2004.— № 10.— С. 23—25.
- Wu J. T., Leung G. M., Lipsitch M., et al. // PLoS Med.— 2009.— Vol. 6.— e1000085.
- Shay D. K., Ridenhour B. J. // PLoS Med.— 2009.— Vol. 6.— e1000103.
- Павлова Н. И., Савинова О. В., Римша В. М. и др. // Здравоохранение.— 1999.— № 1.— С. 50—53.
- Савинова О. В., Павлова Н. И., Бореко Е. И. // Здравоохранение.— 2008.— № 11.— С. 71—73.
- Савинова О. В., Бореко Е. И., Амаросьева Т. В., Кишкуню Е. П. // Достижения медицинской науки Беларусь.— Минск, 2007.— С. 26—28.

INFLUENZA VIRUSES RESISTANCE TO PROTEIN AND NEURAMINIDASE M2 INHIBITORS

E. I. Boreko, N. I. Pavlova

The literature analysis evidence about a wide spread of influenza viruses resistant to protein (Amantadin, Remantadin) and neuraminidase (Oseltamivir) M2 inhibitors. Influenza B viruses are initially insufficiently sensitive to protein M2 inhibitors. When neuraminidase inhibitors efficient for influenza A and B appeared protein M2 inhibitors were rejected in the USA beginning from 2005. But already in 2008—2009 an acute reduction of Oseltamivir efficiency for the seasonal influenza A(H1N1) and a worldwide spread of the Oseltamivir resistant virus variants were registered. The pandemic swine influenza virus A(H1N1) appeared in 2009 was resistant to Remantadin action and sensitive to Oseltamivir, as evidenced the information known at that time. At the same time information about separating pandemic influenza A(H1N1) virus resistant to Oseltamivir was coming from persons having taken that preparation for prophylaxis. WHO by nowadays has information on multiple cases of the pandemic influenza A(H1N1) virus resistance to Oseltamivir. A possibility of such viruses spread in the human population was shown. The situation generates concern that the pandemic influenza A(H1N1) virus double resistance can develop both to Remantadin and to Oseltamivir. In case the influenza virus resistance to Oseltamivir is suspected WHO recommends to administer Zanamivir efficient whatever to the influenza A and B viruses. In accordance with the conclusions followed from the J. T. Wu et al. mathematic model of the influenza pandemic development administration of secondary anti-viral means at the local epidemic early stages may allow reduce the global development of resistance to primary anti-influenza preparations. Those mass available secondary preparations include Arbidol (Arpetol), Groprinocin, Phytogor, other prerations possessing experimentally proven anti-viral properties.

Key words: Remantadin, Oseltamivir (Tamiflu), influenza viruses, drug resistance

22 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

Т. В. АМВРОСЬЕВА, З. Ф. БОГУШ, О. Н. КАЗИНЕЦ,
Н. В. ПОКЛОНСКАЯ, А. А. БЕЗРУЧКО, К. Л. ДЕДЮЛЯ,
П. И. ГРИНКЕВИЧ

ВИРУСНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ЭПИДЕМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

Представлены данные о спектре и типовой структуре неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ), циркулирующих в водах разного вида пользования на территории Республики Беларусь в период 2001—2009 гг. Проанализированы уровни энтеровирусной контаминации эпидемически значимых объектов окружающей среды. В 2009 г. отмечено некоторое повышение данного показателя на фоне наметившейся тенденции к снижению в последние годы.

Ключевые слова: неполиомиелитные энтеровирусы, энтеровирусная инфекция, мониторинг, циркуляция, водные объекты, пищевые продукты.

Ряд возбудителей социально значимых вирусных инфекций человека (рота-, норо-, адено-, астро-, энтеровирусы, вирусы гепатита A, E и другие кишечные вирусы) способны передаваться через водные объекты и пищевые продукты. Среди данных вирусов-контаминантов наиболее широко распространенными и многочисленными по своему представительству являются неполиомиелитные энтеровирусы. Высокий эпидемический потенциал этих возбудителей обусловлен их высокой устойчивостью к физико-химическим факторам и дезинфицирующим средствам, а также крайне низкой инфицирующей дозой. Присутствие патогенных для человека инфекционных агентов в эпидемически значимых водных объектах и в пищевых продуктах даже в незначительных концентрациях может вызывать обострение эпидситуации в виде вспышек и даже эпидемий инфекций. Так, в 90-е годы в Европейских государствах произошло более 700 водных вспышек, в результате которых заболело около 45 тыс. человек [1]. Что касается нашей страны, то за последнее десятилетие на ее территории было зарегистрировано 4 вспышки энтеровирусной инфекции (ЭВИ), связанные с вирусным загрязнением водопроводной воды в крупных областных центрах: в Гомеле — в 1997 г., в Витебске — в 2001 г., в Гродно — в 2003 г. и в Минске — в 2003 г. [2—5]. По официальным данным, пострадало более 2 тыс. человек. Наиболее серьезной по своим последствиям была вспышка ЭВИ в Минске, во время которой действовали сразу 3 водных фактора передачи инфекции: питьевая водопроводная вода, вода водоемов и расфасованная в емкости бутилированная вода [6]. В этой связи регулярное и качественное осуществление надзора за циркуляцией возбудителей вирусных инфекций в объектах окружающей среды представляется одной из важных мер в общей системе эпидемиологического надзора за группой инфекций с природным резервуаром.

Настоящая работа посвящена результатам лабораторного контроля по выявлению возбудителей ЭВИ в водах разного вида пользования на территории нашей страны за 9-летний период.

Анализ данных, полученных на базе лабораторий территориальных центров гигиены и эпидемиологии, показал, что ежегодно в Республике Беларусь проводится порядка 8—10 тыс. исследований санитарно-вирусологических проб на предмет выявления в них энтеровирусных агентов. Детектируемыми объектами энтеровирусного загрязнения являются как сами инфекционные агенты, так и их генетический материал (РНК) и антигены (АГ), которые определяются путем выделения вирусов в пермиссивных клеточных линиях методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА).

В последние годы в структуре осуществляемых по данному направлению лабораторных исследований 43—78% составляют вирусологические, 18—36% — серологические, 4—22% — молекулярно-биологические исследования. Возросший процент использования экспресс-методов (ИФА, ПЦР) в работе по оценке вирусологической безопасности воды и пищевых продуктов согласуется с регламентируемым в нашей стране инструктивными документами порядком осуществления санитарно-вирусологических исследований, предусматривающим обнаружение энтеровирусных АГ и/или РНК, в случае устойчивого выявления которых (в двух повторно взятых пробах) проводится детекция инфекционных энтеровирусных агентов в культуре клеток.

Общереспубликанские показатели количества нестандартных по вирусологическим показателям проб из окружающей среды колебались в анализируемый период в пределах 0,77—2,65% (рис. 1). Наиболее высокие уровни вирусного загрязнения отмечались в 2001 и 2003 г., когда в стране регистрировалась вспышочная заболеваемость ЭВИ с подтвержденным действием водного фактора. В 2009 г. удельный вес положительных результатов составил 1,67%, что в 2,2 раза превысило аналогичный показатель, зарегистрированный в 2008 г. (0,77%). Эти данные согласуются с показателями регистрируемой на территории Беларуси энтеровирусной заболеваемости, которая увеличилась в

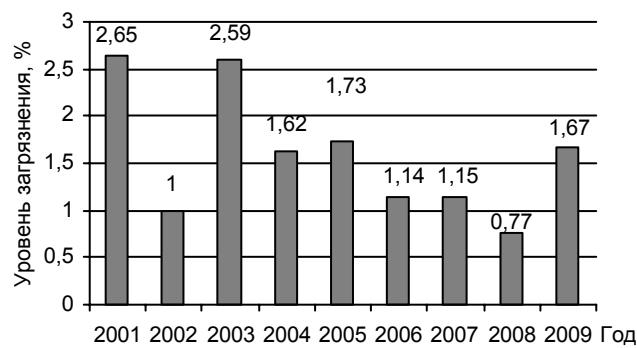


Рис. 1. Годовая динамика общереспубликанских уровней вирусного загрязнения объектов окружающей среды

2009 г. (10,24 на 100 тыс. населения) по сравнению с 2008 г. (8,93 на 100 тыс. населения) на 15%.

Вклад регионов в формирование общереспубликанского показателя вирусной контаминации водных объектов и пищевых продуктов неодинаков (рис. 2). Так, например, в 2009 г. максимально высокие уровни выявления нестандартных проб регистрировались в Минске (3,72%), Гродненской (3,13%), Брестской (2,23%) и Гомельской (1,98%) областях. В Минской, Могилевской и Витебской областях показатели энтеровирусного загрязнения колебались в пределах 0—0,8%. В 2008 г. лидирующее положение в этом отношении принадлежало Гомельской области (2,04%), Минску (2,01%) и Витебской области (1,02%). В остальных регионах доля нестандартных проб колебалась от 0,19 (Могилевская область) до 0,48% (Гродненская область).

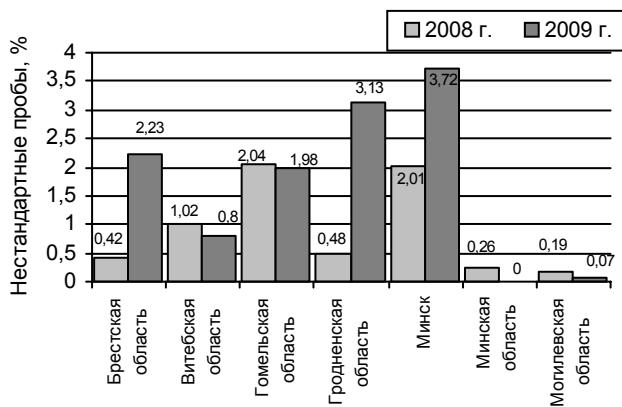


Рис. 2. Годовая динамика уровней вирусного загрязнения объектов окружающей среды на региональном уровне

Как известно, с точки зрения эпидемического риска из всех контролируемых на предмет вирусной контаминации объектов окружающей среды наиболее опасным для здоровья человека является энтеровирусное загрязнение питьевой воды, воды водоисточников и пищевых продуктов.

В общей структуре осуществляемых в Республике Беларусь санитарно-вирусологических исследований за последние 9 лет в целом на долю воды источников водоснабжения приходилось порядка 2%, продуктов питания — 24%, питьевой воды — 44%. При этом 90—96% от общего количества исследований питьевой воды составляли пробы, отобранные в контрольных точках распределительной сети централизованного водоснабжения.

Анализ данных текущего санитарно-вирусологического контроля питьевой воды в системе централизованного хозяйствственно-питьевого водоснабжения показал, что в целом по стране уровень ее загрязнения находился в пределах 0,56—2,81% (табл.). Наиболее высокие показатели выявления нестандартных проб были отмечены в 2001 и 2003 г. (2,81% и 1,93% соответственно), когда в отдельных регионах Республики Беларусь зарегистрированы вспышки ЭВИ с установленным водным путем передачи инфекции [2, 3, 5].

Выявление маркеров энтеровирусов (%) в питьевой воде и воде водоисточников в целом по стране

Год	Вода питьевая (централизованное водоснабжение)	Вода питьевая (децентрализованное водоснабжение)	Вода водоисточников
2001	2,81	4,20	4,92
2002	1,35	0	0
2003	1,93	0,83	0
2004	1,38	6,75	0,30
2005	1,20	4,50	3,64
2006	0,80	3,60	0,96
2007	0,80	1,50	4,67
2008	0,56	0	0,98
2009	1,56	1,67	0,28

Последующие 2 года (2004—2005 гг.) характеризовались стабилизацией уровней вирусного загрязнения питьевой воды. В 2006—2008 гг. наметилась тенденция к улучшению ее качества по данному показателю — доля вируспозитивных проб составила всего 0,56%. Эти показатели регистрировались на фоне повышения уровня загрязнения воды водоисточников (4,67% — 2007 г.) и воды шахтных колодцев (3,6% — 2006 г.). В 2009 г. удельный вес контамированных проб питьевой воды вырос по сравнению с таковыми в 2008 г. практически в 3 раза и составил 1,56%. В этом же году отмечалось и ухудшение качества питьевой воды в системе децентрализованного водоснабжения (1,67% положительных проб).

В формировании среднереспубликанских показателей вирусного загрязнения питьевой воды централизованного водоснабжения основной вклад принадлежал Гомельской, Витебской, Брестской, Минской областям и Минску, где наиболее часто и постоянно регистрировались нестандартные по вирусологическим показателям пробы питьевой воды, уровни которых в основном колебались в пределах 0,8—4,8%. В отдельные годы обнаружение в питьевой воде маркеров энтеровирусов достигало значительно более высоких показателей: 11,7% (в Минске в 2003 г.), 8,1% (в Минской области в 2006 г.), 5,3% (в Витебской области в 2001 г.). Относительно благоприятная ситуация имела место в Могилевской и Гродненской областях, где уровни вирусного загрязнения питьевой воды не превышали 0,3% и только в 2001 г. в Могилевской области этот показатель достиг 5,3%, а в 2009 г. в Гродненской области — 3,5%.

Ситуация по вирусологическому качеству питьевой воды в системе децентрализованного водоснабжения была значительно более неблагополучной. Уровни регистрации нестандартных проб колебались в пределах 0—6,75% (см. табл.). В целом же динамика уровней вирусного загрязнения питьевой воды децентрализованного водоснабжения в течение последних 9 лет (рис. 3) имела тенденцию к снижению.

В общей структуре энтеровирусов, выделенных из водных объектов (всего 828 изолятов), доля инфекционных агентов, обнаруженных в питьевой воде и воде водоисточников, составила 29,47% (244 энтеровируса). В отдельные годы этот показатель достигал значитель-

24 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней



Рис. 3. Динамика и тенденция уровней вирусного загрязнения питьевой воды в Республике Беларусь

но более высоких величин. Так, в 2003 г. он составил 60,8% (48 из 79), в 2005 г. — 54,8% (17 из 31), в 2001 г. — 36,67% (33 из 90). В последние 3 года доля энтеровирусов, выделенных из питьевой воды и воды водоисточников, резко уменьшилась: в 2007 и 2009 г. случаев контаминации зарегистрировано не было, а в 2008 г. их вклад составил 11,1% от общего пулла водных вирусов (2 из 18).

Спектр энтеровирусов, циркулировавших в питьевой воде и воде водоисточников в анализируемый период в Республике Беларусь, включал представителей как серогруппы *ECHO* (*ECHO* 6, 7, 11, 12, 16, 20, 25, 29, 30), так и *Coxsackie B* (*Coxsackie B* 1, 2, 4, 5, 6), причем доминировали вирусы *Coxsackie B5*, *Coxsackie B4*, *ECHO 30* и *ECHO 6* (рис. 4).

Следует отметить, что питьевая вода — это не только вода из водопроводов, колодцев и колонок. С каждым годом все более активно для питья и приготовления пищи население нашей страны употребляет бутилированную воду (БВ), то есть воду, расфасованную в емкости. Обеспечение нормативного вирусологического качества БВ с учетом их предназначения является приоритетной задачей во всем мире, требующей к себе постоянного внимания с точки зрения эпидемической безопасности [7]. Как указывалось выше, именно БВ была одним из факторов передачи энтеровирусных менингитов во время вспышки ЭВИ в Минске в 2003 г. [6]. На рис. 5 представлены результаты pilotных ис-

следований по выявлению вирусного загрязнения БВ во время эпидподъема заболеваемости острыми кишечными инфекциями (ОКИ) неустановленной этиологии в одном из крупных белорусских городов. Как видно, в воде, анализируемой в очагах инфекции по эпидемиологическим показаниям, обнаруживались энtero- (16,7%) и норовирусы (8,3%).

Существует множество литературных данных, свидетельствующих о том, что причиной возникновения и развития спорадической и вспышечной заболеваемости кишечными инфекциями в ряде случаев являлись контаминированные кишечными вирусами (в том числе и энтеровирусами) пищевые продукты. В область осуществляемого в нашей стране лабораторного контроля по эпидемиологическим показаниям входят также исследования продуктов питания на предмет их вирусного загрязнения. Анализ полученных данных показал, что в анализируемый период в среднем по стране уровни энтеровирусной контаминации пищи варьировали от 0,05 (2002 г.) до 2,37% (2003 г.). Факты контаминации пищевых продуктов инфекционными энтеровирусами были установлены практически во всех регионах Республики Беларусь: в Могилевской области (2001 г. — *ECHO* 6, 11, 13, 20), в Гомельской области (2002 г. — *Coxsackie B5*, 2003 г. — *ECHO* 7, 2005 г. — *Coxsackie B5*, энтеровирусы с неустановленным серотипом, 2006 г. — *ECHO* 6), в Брестской области (2007 г. — *ECHO* 16, 2008 г. — энтеровирусы с неустановленным серотипом), а также в Минске (2003 г. — энтеровирусы с неустановленным серотипом, 2006 г. — *ECHO* 11, 2007 г. — *ECHO* 16, 2008 г. — *ECHO* 6) и в Минской области (2007 г. — *Coxsackie B4*). Чаще всего энтеровирусные агенты выделялись из молока и молочных продуктов (кефир, творог, сырки творожные, сметана, масло, кисломолочные напитки). По результатам собственных исследований, проведенных в 2006—2008 гг. во время подъемов заболеваемости ОКИ неустановленной этиологии, общий уровень обнаружения в продуктах питания маркеров более широкого спектра кишечных вирусов-контаминантов достигал 19%. Средний уровень выявления маркеров энтеровирусов составил 11,31%, норовирусов — 6,79%, ротавирусов — 0,9%.

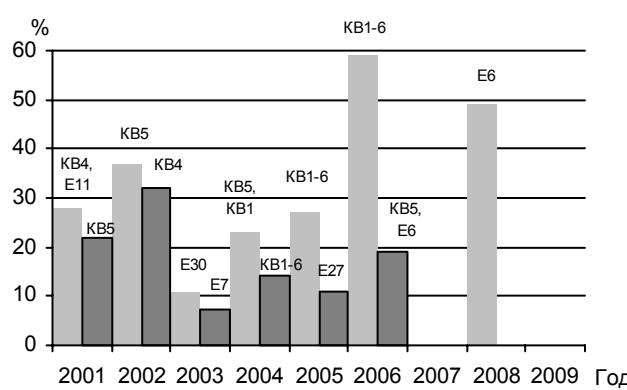


Рис. 4. Рейтинг НПЭВ, выделенных из питьевой воды и воды водоисточников (ось ординат — % изолятов доминирующих серотипов энтеровирусов от всех выделенных)

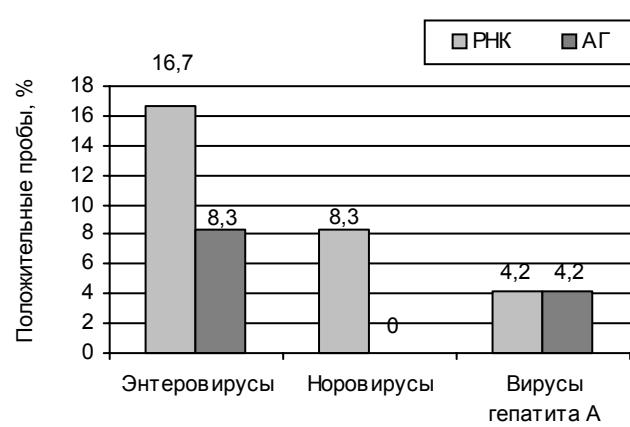


Рис. 5. Результаты обнаружения маркеров вирусов в БВ (во время эпидподъемов заболеваемости ОКИ в 2006—2007 гг.)

Объектом особого эпидемического риска является контаминированная вирусами вода плавательных бассейнов. Исследования по контролю вирусологического качества воды бассейнов проводятся в нашей стране в рамках санитарно-эпидемиологического надзора по эпидемиологическим показаниям. Анализ представленных региональными ЦГЭ данных показал, что уровни выявления маркеров энтеровирусов колебались в анализируемый период от 0 до 2,9%. Факты выделения из воды бассейнов инфекционных энтеровирусов были зафиксированы в 2001 г. в Могилевской (вирус ECHO 20) и Брестской (энтеровирусы с неустановленным серотипом) областях, в 2004 г. — в Брестской области (вирус Coxsackie B1). В связи с возрастающей востребованностью населением этих водных объектов были проведены пилотные исследования по изучению качества воды бассейнов в отношении их контаминации: энtero-, рота-, норо-, адено-вирусами, вирусом гепатита А [8]. Детектируемыми маркерами присутствия данных вирусов в воде были их генетический материал (ДНК или РНК) и АГ. Как видно из рис. 6, выявлены маркеры 3 из 5 предполагаемых вирусов-контаминантов. Среди них доминировали энtero- и адено-вирусы (6,8%). Маркеры ротавирусов определялись в 2,3% случаев.

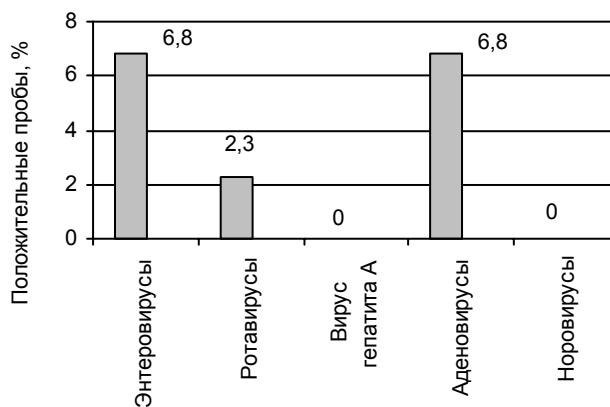


Рис. 6. Результаты выявления маркеров вирусов в воде плавательных бассейнов

Представленные данные свидетельствуют о том, что факты выявления маркеров кишечных вирусов в эпидемически значимых объектах, к которым прежде всего относится вода водоисточников, питьевая вода и пищевые продукты, являются далеко не единичными практически во всех регионах нашей страны. Наметившаяся в последние годы динамика к снижению внешнесредовой вирусной нагрузки, а также отсутствие регистрации вспышечной заболеваемости ЭВИ свидетельствуют в пользу эффективности и оперативности проводимого отечественной лабораторной службой контроля за данной группой инфекций в целом. В настоящее время практические лаборатории благодаря наличию на отечественном рынке необходимых диаг-

ностических и санитарно-вирусологических препаратов, а также возможности использования современных молекулярно-биологических и молекулярно-эпидемиологических методов исследования имеют возможность достаточно быстро и достоверно выявлять вирусное загрязнение объектов окружающей среды, отслеживать источник заражения человека, определять факторы передачи инфекции, что является основой для своевременного и оперативного осуществления адекватных профилактических мероприятий, направленных на профилактику и/или прерывание заболеваемости. Именно такой подход к анализу качества воды и пищевых продуктов, основанный на детекции доступными методами специфических маркеров ее вирусного загрязнения, рекомендуется использовать в рамках осуществляющего производственного контроля. Естественно, что воплощение данных рекомендаций в жизнь станет возможным только после замены нормируемых СанПиНом по питьевой воде колифаговых показателей на прямые вирусологические и введение их в действующие по контролю качества пищи нормативные документы, что уже сделано в отношении БВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Water Quality / Ed. L. Fewtrell, J. Bartram.— London, 2001.
2. Амвросьева Т. В., Титов Л. П., Майдерс М. и др. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.— 2001.— № 1.— С. 21—25.
3. Амвросьева Т. В., Богуш З. Ф., Казинец О. Н. и др. // Вопр. вирусологии.— 2004.— № 1.— С. 30—34.
4. Амвросьева Т. В., Поклонская Н. В., Позин С. Г. и др. // Здравоохранение.— 2004.— № 10.— С. 24—28.
5. Amvrosieva T. V., Paklonskaya N. V., Biazruchka A. A., et al. // Cent. Europ. J. Publ. Health.— 2006.— Vol. 14, № 2.— P. 67—73.
6. Казинец О. Н., Амвросьева Т. В., Богуш З. Ф. и др. // Материалы юбил. конф., посвящ. 80-летию НИИЭМ.— Минск, 2004.— С. 82—87.
7. Амвросьева Т. В., Казинец О. Н. // Питьевая вода.— 2008.— № 4.— С. 9—13.
8. Амвросьева Т. В., Казинец О. Н., Безручко А. А. и др. // Питьевая вода.— 2009.— № 6.— С. 31—34.

VIRAL CONTAMINATION OF EPIDEMICALLY SIGNIFICANT WATER OBJECTS

T. V. Amvrosieva, Z. F. Bogush, O. N. Kazinets, N. V. Poklonskaya, A. A. Bezruchko, K. L. Dedyulya, P. I. Grinkevich

The data concerning the spectrum and typical structure of the non-polioenteritis enteroviruses (NPEV) circulating in water intended for various usage in the Republic of Belarus in 2001 - 2009 are presented. The enterovirus contamination levels in the epidemiically significant water objects have been analyzed. In 2009 a slight increase of that variable was registered on the background of a tendency to reducing last years.

Key words: non-polioenteritis enteroviruses (NPEV), enteroviral infection, monitoring, circulation, water objects, food products.

Авторы статьи выражают благодарность специалистам региональных вирусологических служб ЦГЭ за плодотворное сотрудничество и помочь в сборе материала.

26 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

Е. П. СЧЕСЛЕНOK, Е. Г. ФОМИНА, И. И. ГРИГОРОВИЧ,
Т. В. ШКОЛИНА, П. А. СЕМИЖОН, С. Ф. СЕМЕНОВ,
А. С. ВЛАДЫКО

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИГЕНЗНАЧИМОГО НР-БЕЛКА ВИРУСА ЛАССА

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

Цель исследования. Получить рекомбинантный полипептид, представляющий собой антигензначимый фрагмент (6/8 NP) нуклеокапсидного белка (NP) вируса Ласса, для включения его в рекомбинантную иммуноферментную тест-систему, в которой полученный полипептид будет использоваться в качестве специфического антигена.

Материал и методы. Вирус Ласса (штамм *Josiach*), референс-сыворотка, содержащая антитела к вирусу Ласса, полученная в лаборатории при иммунизации вирусным антигеном яванской макаки. Для приготовления компетентных клеток взята методика, описанная в руководстве Т. Маниатис и соавт. Трансформацию плазмидной ДНК проводили с использованием теплового шока бактериальных клеток. Кроме того, применяли электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ), аффинную металлохелатную хроматографию, иммуноблоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ.

Результаты. Была получена рекомбинантная плазмида, кодирующая фрагмент нуклеокапсидного белка вируса Ласса. После трансформации в пермиссионный штамм *E. coli* BL21(DE3) рекомбинантная плазмидная ДНК была выделена и проверена на наличие вирусоспецифической вставки. Рекомбинантный полипептид взаимодействовал со специфическими антителами, содержащимися в референс-сыворотке. Антигенная активность рекомбинантного полипептида вируса Ласса была подтверждена методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа.

Заключение. С использованием метода металлохелатной хроматографии получен очищенный рекомбинантный полипептид в препартивных количествах (500 мкг), обладающий антигенной специфичностью.

Ключевые слова: вирус Ласса, рекомбинантные полипептиды, нуклеокапсидный белок, антигенная специфичность.

Возрастающие в силу экологических или экономических факторов естественные международные контакты и миграционные потоки населения приводят к возникновению новых или расширению ареалов известных опасных инфекционных заболеваний. Республика Беларусь по-прежнему остается незащищенной от особенно опасных (ООИ) и опасных, природно-очаговых, вирусных инфекций. Кроме этого, нарастающая угроза биотерроризма с новой силой стимулировала в ряде стран Европы и Америки создание специальных лабораторий и программ по обеспечению безопасности этих государств.

Для региона Беларуси наибольшую опасность представляют особо опасные вирусы, включая вирус натуральной оспы, вирусы, вызывающие геморрагические лихорадки Ласса, Эбола, Марбург. Лихорадка Ласса — острая вирусная болезнь из группы зоонозов с природной очагостью. Характеризуется тяжелым течением, высокой летальностью, тромбогеморрагическим синдромом, язвенным стоматитом, поражением орга-

нов дыхания, почек, центральной нервной системы, миокардитом.

Возбудитель относится к семейству *Arenaviridae*, род *Arenavirus*. Имеет антигенное родство с другими аренавирусами (вирус лимфоцитарного хориоменингита, возбудители геморрагических лихорадок Южной Америки — вирусы Такарибе, Хунин, Мачупо и др.). Возбудитель лихорадки Ласса относится к числу наиболее опасных для человека вирусов, при работе с ним требуется соблюдение строжайших мер предосторожности. Как и другие аренавирусы, вирус лихорадки Ласса передается человеку воздушно-пылевым путем от инфицированных грызунов. Возможна также передача инфекции от человека.

Лихорадка Ласса распространена в Нигерии, Сьерра-Леоне, Гвинее и Либерии. Известны случаи завоза в Европу лихорадки Ласса, закончившиеся летально [1, 2]. Занос вируса Ласса на территорию Республики Беларусь создаст чрезвычайную ситуацию, поскольку средства профилактики и лечения возбудителей ООИ до настоящего времени не разработаны. Своевременная диагностика возбудителей позволит провести ранние противоэпидемические мероприятия — пока единственный способ борьбы с этой группой инфекций. В США уже к 2001 г. были разработаны комплексные диагностиконы, обеспечивающие существенную биологическую безопасность страны. Во многих странах также имеются диагностиконы для данных возбудителей.

Показано, что структурные нуклеокапсидные белки ареновирусов могут быть использованы в диагностических тест-системах для выявления специфических антител [3, 4].

Цель настоящего исследования состояла в получении рекомбинантного полипептида, представляющего собой антигензначимый фрагмент (6/8 NP) нуклеокапсидного белка (NP) вируса Ласса, для включения его в рекомбинантную иммуноферментную тест-систему, в которой полученный полипептид будет использоваться в качестве специфического антигена.

М а т е р и а л и м е т о д ы

Вирус Ласса (штамм *Josiach*) получен от доктора G. Van der Groen (Институт тропической медицины, Антверпен, Бельгия)

Референс-сыворотка, содержащая антитела к вирусу Ласса, получена в лаборатории при иммунизации вирусным антигеном яванской макаки [4].

Приготовление компетентных клеток. Для приготовления компетентных клеток взята методика, описанная в руководстве Т. Маниатис и соавт. [5]. В 50 мл LB-среды инокулировали одну отдельную колонию *E.coli*, штамм BL21(DE3). Инкубировали клетки *E.coli* в шейкере в течение ночи при температуре 37°C. Затем переносили 4 млочной культуры в 400 мл LB-среды и культивировали в 2-литровом флаконе в шейкере (250 об./мин) до достижения оптической плотности OD₆₀₀ — 0,375. Все дальнейшие процедуры проводили на холода. Клетки осаждали и центрифугировали в течение 7 мин при 3000 об./мин. Осадок клеток супендируя-

ли в холодном буфере следующего состава: 60 ммоль CaCl_2 , 15% глицерола, 10 ммоль PIPES, pH 7,0. Клетки дважды осаждали и вновь суспендировали в 10 мл кальциевого буфера. После последней отмычки клетки суспендировали в 2 мл кальциевого буфера, разливали по аликовитам (250 мкл) и хранили до использования при 70°C.

Клонирование рекомбинантных плазмид в бактериальные клетки. Трансформацию плазмидной ДНК проводили с использованием теплового шока бактериальных клеток. Трансформанты высевали на селективную среду, содержащую ампициллин (50 мкг/мл). Колонии клеток, содержащие рекомбинантные плазмиды pJC40 [6] со вставками фрагментов гена белка NP вируса Ласса, образовывали бесцветные колонии в присутствии ампициллина. В результате колонии были отобраны и накоплены в питательной среде. Реакции рестрикции, лигирования, обратной транскрипции и полимеразную цепную проводили с помощью ферментов «Fermentas» в соответствии с рекомендациями производителей.

Накопление бактериальной культуры. Единичные колонии клеток *E. coli*, штамм BL21(DE3), трансформированные плазмидами pJC40, выращивали при 37°C в 5 мл питательной LB-среды с ампициллином (50 мкг/мл) в течение ночи. Затем 5 мл «ночной» культуры вносили в 100 мл бульона LB, содержащего 0,2% глюкозы и 50 мкг/мл ампициллина, помещали на шейкер и инкубировали до достижения культурой логарифмической фазы роста (OD_{600} — 0,375). Добавляли в среду ИПТГ в концентрации 0,4 ммоль и инкубировали в течение 3—5 ч. Клетки бактерий собирали центрифугированием, растворяли в буфере следующего состава: 0,5 моль NaCl; 20 ммоль Tris HCl, pH 8,0 и помещали в холодильник (-20°C).

Приготовление клеточного лизата. 100 мл бактериальной культуры подвергали центрифугированию при 3000 об./мин в течение 10 мин при 4°C для осаждения бактериальных клеток. Осадок ресуспензировали в 4 мл лизирующего буфера и помещали в холодильник (-20°C). Полученные лизаты бактериальных клеток содержали экспрессируемые рекомбинантные полипептиды вируса Ласса в смеси с бактериальными белками. В дальнейшем лизаты использовали для получения очищенных рекомбинантных полипептидов.

Электрофорез в поликариламидном геле (ПААГ). Электрофоретический анализ рекомбинантных полипептидов проводили в ПААГ, используя 10% разделяющие гели. В качестве красителя использовали кумасси R-250.

Аффинная металлохелатная хроматография. Хроматографию проводили на HisBind-колонке («Novagen») с иммобилизованными катионами Ni^{2+} в денатурирующих условиях, все буферы содержали 6-молярную мочевину. Для приготовления клеточного лизата клетки *E. coli* (100 мл бактериальной культуры) осаждали центрифугированием при 5000 об./мин в течение 10 мин. Супернатант удаляли и осадок ресуспензировали в 4 мл холодного буфера 1Ч «Bind» (5

ммоль имидазола, 0,5 моль NaCl, 20 ммоль трис-HCl, pH 7,9). Затем клеточную суспензию обрабатывали дважды ультразвуком при 20 кГц в течение 30 с на льду. После обработки ультразвуком клеточные лизаты центрифugировали при 5000 об./мин, супернатант, содержащий растворимые белки, собирали и наносили на колонку с помощью перистальтического насоса со скоростью 15—20 мл/ч. После нанесения материала колонку отмывали 10 объемами связывающего буфера «Bind» (5 ммоль имидазола, 0,5 моль NaCl, 20 ммоль трис-HCl, pH 7,9). Элюцию связавшихся на колонке рекомбинантных полипептидов проводили 5 объемами элюирующего буфера «Elute» (300 ммоль имидазола, 0,5 моль NaCl, 20 ммоль трис-HCl, pH 7,9). Фракции элюции и все остальные фракции аффинной хроматографии анализировали методом электрофореза в 10% ПААГ.

Иммуноблоттинг. Электроперенос белков, разделенных в 10% поликариламидном геле, на нитроцеллюлозную мембрану («Sigma», размер пор 0,45 мкм) осуществляли полусухим способом в течение 1 ч при силе тока 150 mA. Полоски нитроцеллюлозной мембраны с иммобилизованными белками (стрипами) выдерживали 2 ч в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ), pH 7,4, содержащем 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА), для блокирования неспецифических мест связывания. Затем полоски инкубировали с первичными антителами (античеловеческая иммунная сыворотка), разведенными в 100 раз ФСБ, содержащим 0,05% твина-20 и 1% БСА (ФСБ-Т-БСА), в течение 2 ч при постоянном покачивании. После чего отмывали стрипы ФСБ, содержащим 0,05% твина-20 (ФСБ-Т), 3 раза по 5 мин, и погружали в раствор антивидового пероксидазного коньюгата, приготовленного на ФСБ-Т-БСА, на 1 ч. После отмычки стрипы помещали в раствор субстрата, в качестве которого использовали диаминонензидин, растворенный в ФСБ, pH 7,2, содержащем 0,3% перекись водорода. После развития окраски реакцию останавливали, отмывая стрипы трижды дистиллированной водой.

Твердофазный иммуноферментный анализ. Для постановки твердофазного иммуноферментного анализа антиген (рекомбинантные полипептиды) сорбировали в лунки 96-луночных панелей. Адсорбцию проводили в ФСБ, pH 7,4. Все сыворотки и коньюгат разводили ФСБ с добавлением 0,05% твина-20 и 0,5% БСА (ФСБ-Т-БСА). После каждого этапа панели промывали 5 раз буфером ФСБ-Т-БСА. Адсорбцию антигена проводили в объеме 100 мкл (концентрация антигена 0,1—1 мкг/мл) при 4°C в течение 18 ч. Использовали референс-сыворотку в разведении 1:100. Результаты оценивали на ELISA-процессоре по уровню поглощения при длине волны 450 нм.

Результаты и обсуждение

Для создания рекомбинантной плазмиды, содержащей вирусоспецифическую вставку, нужно было получить фрагмент гена нуклеокапсидного белка вируса Ласса. С этой целью были синтезированы две пары

28 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

праймеров для реакции обратной транскрипции — полимеразной цепной реакции на матрице выделенной РНК вируса Ласса.

В качестве вектора была использована плазмида pJC40. ДНК плазмиды pJC40 кодирует ген устойчивости к кампициллину, что позволяет селективно отбирать колонии *E. coli*, содержащие данную плазмиду, после трансформации в пермиссивный штамм BL21(DE3). Вектор содержит последовательность, кодирующую десять аминокислотных остатков гистидина, которые присоединяются к N-концу получаемого полипептида и дают возможность очистить его с помощью металлохелатной хроматографии.

Полученный в реакции обратной транскрипции — полимеразной цепной реакции — фрагмент был обработан ферментами рестрикции и клонирован в полилинкерную область вектора для экспрессии. В результате была получена рекомбинантная плазмиды, кодирующая фрагмент нуклеокапсидного белка вируса Ласса (рис. 1). Размер рекомбинантной плазмиды — 3708 п. н. (пары нуклеотидов), из них 2402 п. н. составляет нуклеотидная последовательность плазмиды pJC40 и 1306 п. н. — последовательность, кодирующая антигеннезимый фрагмент нуклеокапсидного белка вируса Ласса.

После трансформации в пермиссивный штамм *E. coli* BL21(DE3) рекомбинантная плазмидная ДНК была выделена и проверена на наличие вирусоспецифической вставки рестрикцией по сайтам Bam HI и Hind III. Для подтверждения наличия вирусоспецифической вставки и оценки размера клонированной ДНК-копии вирусного генома полученную рекомбинантную плазмиду обрабатывали соответствующими ферментами рестрикции Bam HI и Hind III и продукты гидролиза анализировали в 1,5% агарозном геле. На рис. 2 представлен рестрикционный анализ рекомбинантной плазмидной ДНК.

Полученные рекомбинантные клоны использовали для экспрессии рекомбинантного полипептида.

Продукты экспрессии анализировали, применяя электрофорез в ПААГ. Электрофоретический анализ в ПААГ продуктов экспрессии рекомбинантных плазмид в *E. coli* показал наличие рекомбинантного полипептида размером около 48 кДа, соответствующего 6/8 нуклеокапсидного белка NP вируса Ласса (рис. 3).

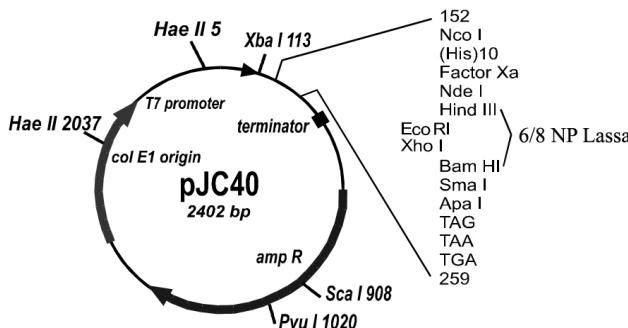


Рис. 1. Плазмида pJC/6/8 NP Lassa, кодирующая фрагмент нуклеокапсидного белка вируса Ласса

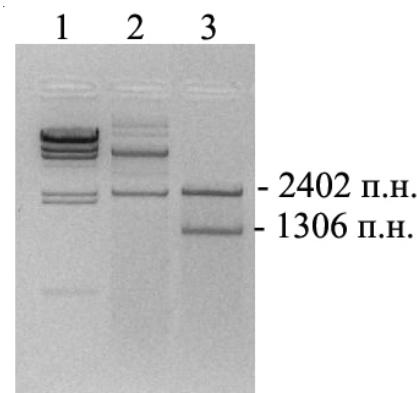


Рис. 2. Рестрикционный анализ ДНК плазмиды pJC40/6/8 NP Lassa: 1 — маркер λ /Hind III; 2 — рекомбинантная плазмиды pJC40/6/8 NP Lassa; 3 — рекомбинантная плазмиды pJC40/6/8 NP Lassa, порезанная по сайтам рестрикции Bam HI и Hind III

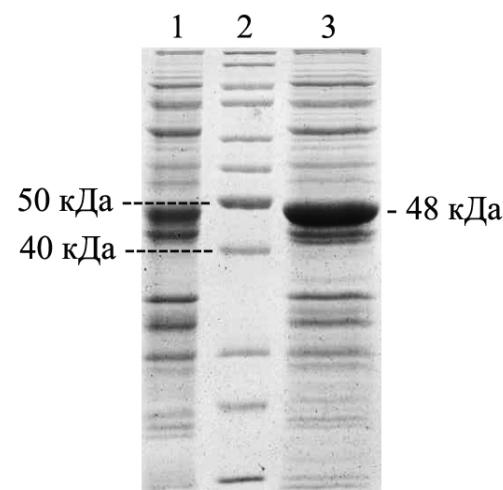


Рис. 3. Электрофоретический анализ рекомбинантного полипептида вируса Ласса в ПААГ: 1 — трансформированные клетки BL 21 без индукции экспрессии IPTG; 2 — маркерные белки (Fermentas); 3 — лизат клеток *E. coli* BL21, экспрессирующих рекомбинантный полипептид вируса Ласса

Специфичность полученного рекомбинантного полипептида оценивали методом иммуноблоттинга. Для этого иммобилизованный на нитроцеллюлозную мембрану рекомбинантный полипептид вируса Ласса был обработан референс-сывороткой, содержащей антитела к вирусу Ласса, и нормальной человеческой сывороткой, не содержащей специфических антител. Результаты иммуноблоттинга представлены на рис. 4. Видно, что рекомбинантный полипептид взаимодействовал со специфическими антителами, содержащимися в референс-сыворотке (дорожка 2), о чем свидетельствует наличие интенсивно окрашенной полосы в области, соответствующей расположению рекомбинантного полипептида вируса Ласса (48 кДа). В то же время рекомбинантный полипептид не взаимодействовал с компонентами нормальной человеческой сыворотки (дорожка 3).

Антигенная активность рекомбинантного полипептида вируса Ласса подтверждена методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (нТИФА)

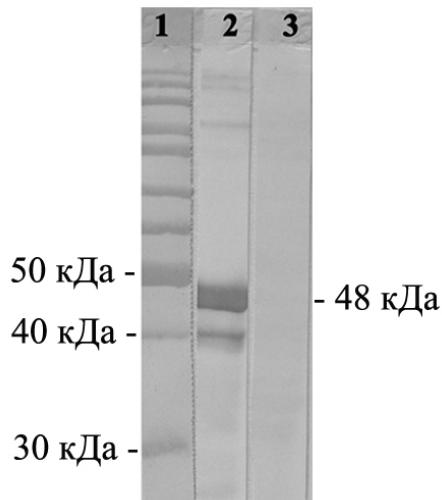


Рис. 4. Иммунооблottинг рекомбинантного полипептида вируса Ласса: 1 — маркерные белки (Fermentas); 2 — рекомбинантный полипептид вируса Ласса, обработанный референс-сывороткой к вирусу Ласса; 3 — рекомбинантный полипептид вируса Ласса, обработанный нормальной сывороткой, не содержащей специфических антител

при обработке иммобилизованного на поверхности лунок панелей рекомбинантного антигена контрольной сывороткой, содержащей антитела к вирусу Ласса: сыворотка, полученная при иммунизации вирусным антигеном яванской макаки (рис. 5).

Таким образом, в результате проведенных исследований была сконструирована рекомбинантная плазмида, содержащая вставку фрагмента гена NP белка вируса Ласса; получен синтез рекомбинантного полипептида в клетках *E. coli*, штамм BL21(DE3). С использованием метода металлохелатной хроматографии получен очищенный рекомбинантный полипептид в препаративных количествах (500 мкг). Показана антигенная специфичность экспрессируемого полипептида методом иммунооблottинга. Антигенная активность рекомбинантного полипептида вируса Ласса подтверждена методом нТИФА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lassa fever imported case, Germany // Wkly Epidemiol. Rec.—2000.—Vol. 75, № 14.—P. 109.
2. Lassa fever imported case, United Kingdom // Wkly Epidemiol. Rec.—2000.—Vol. 75, № 11.—P. 85.
3. Зудин Б. И., Роздяловский А. Н., Петкович А. С. // Вопр. вирусологии.—1990.—№ 3.—С. 231—233.

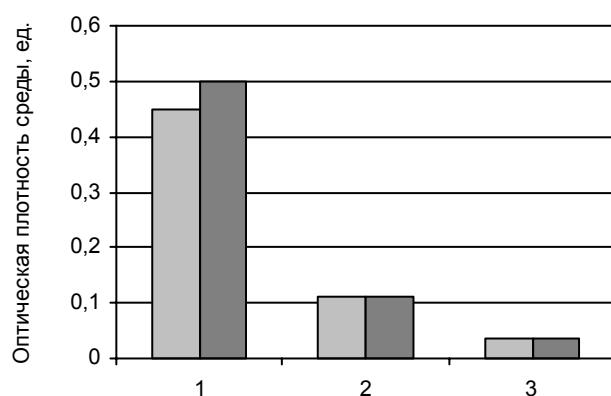


Рис. 5. Анализ антигенной активности рекомбинантного полипептида вируса Ласса методом нТИФА:

- 1 — положительный контроль (сыворотка яванской макаки);
2 — отрицательный контроль (сыворотка человека);
3 — контроль с использованием коньюгата

4. Владыко А. С., Быстрова С. И., Малахова И. В. и др. // Вопр. вирусологии.—1993.—№ 1.—С. 30—34.

5. Маниатис Т. и др. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М., 1984.

6. Clos J., Brandau S. // Prot. Expre. Purific.—1994.—№ 5.—Р. 133—137.

CHARACTERISTICS OF RECOMBINANT LASA VIRUS NP PROTEIN

E. P. Scheslenok, E. G. Fomin, I. I. Hryhorovich, T. V. Shkolina, P. A. Semizhon, S. F. Semenov, A. S. Vladkyo

Objective. To get a recombinant polypeptide being an antigen significant fragment (6/8 NP) of virus Lassa nucleocapsid protein (NP) for including it into the recombinant immune enzyme test system in which the polypeptide obtained will be used as a specific antigen.

Materials and methods. Lassa virus (strain Josiach), reference serum containing antibodies to Lassa virus obtained in immunization Javanese macaque with virus antigen in the laboratory conditions. The competent cells were prepared applying the technique described in Maniatis et al. manual. The plasmide DNA was transformed using heat shock of bacterial cells. In addition electrophoresis in polyacryl amide gel (PAAG), affine metal chelate chromatography, immunoblotting, enzyme-linked immunoassay were applied.

Results. Recombinant plasmid coding the Lassa virus nucleocapsid protein fragment was obtained. After its transformation into a permissive strain *E. coli* BL21(DE3) the recombinant plasmid DNA was separated and studied for the virus specific inclusion presence. The recombinant polypeptide interacted with the specific antibodies present in the reference serum. The Lassa virus recombinant polypeptide antigen activity was confirmed in the indirect enzyme-linked immunoassay.

Conclusion. Applying the method of metal chelate chromatography purified recombinant polypeptide possessing antigen specificity was obtained in a preparative quantity (500 µg).

Key words: Lassa virus, recombinant polypeptide, nucleocapsid protein, antigen specificity.

30 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

Н. В. ПОКЛОНСКАЯ, Т. В. АМВРОСЬЕВА,
А. А. БЕЗРУЧКО, Г. М. ИГНАТЬЕВ, П. И. ГРИНКЕВИЧ,
Е. П. КИШКУРНО, Н. Л. КЛЮЙКО, Л. В. ЗАЙЦЕВА,
Д. В. ХОДИН

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ НОРОВИРУСОВ, ВЫЗВАВШИХ ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ОСТРЫМИ КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ В МИНСКЕ В 2009—2010 гг.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь, Белорусская медицинская
академия последипломного образования,
Городская детская инфекционная клиническая больница,
23-й санитарно-эпидемиологический центр
Вооруженных Сил Республики Беларусь

Цель исследования. Изучить роль норовирусной инфекции в формировании заболеваемости ОКИ. Провести молекулярно-эпидемиологический анализ возбудителей, циркулировавших в Минске в 2009—2010 гг.

Материал и методы. Дифференциальную диагностику кишечных вирусов (норо-, рота-, астро-, сапо-, адено-, энтеровирусы) у больных ОКИ (190 детей и 41 взрослый) осуществляли с помощью ПЦР. Молекулярно-эпидемиологические исследования включали секвенирование фрагмента гена полимеразы норовирусов и филогенетическую реконструкцию.

Результаты. Этиологическая структура вирусных ОКИ у детей в Минске в 2009—2010 гг. была представлена ротавирусной (37,5% обследованных), норовирусной (29,5%), адено-вирусной (18,6%), астровирусной (7,4%) и энтеровирусной (2,1%) инфекцией. РНК норовирусов геногруппы I выявлена в 7,4% образцов, геногруппы II — в 92,6%. Все норовирусы геногруппы II принадлежали генотипу GII.4, наиболее распространенному в мире в последние 15 лет. В пределах генотипа норовирусы объединены в 3 монофилетические кластеры, соответствующие трем субтипам. Спорадическую заболеваемость ОКИ среди детей зимой 2009 г. вызвали вирусы 1-го субтипа, принадлежавшие известному эпидемическому варианту GII.4, спровоцировавшему многочисленные вспышки в различных странах в 2007—2008 гг. Вирусы 2-го субтипа были этиологическими агентами двух вспышек ОКИ у взрослых и подростков в 2010 г. Спорадическую заболеваемость среди детей зимой 2010 г. вызвали вирусы 3-го субтипа, который раньше не встречался в нашей стране и на территории других государств.

Заключение. Появление нового субтипа норовирусов позволяет предположить повышение заболеваемости норовирусными ОКИ зимой 2011 г., обусловленное циркуляцией в популяции. Применение молекулярно-эпидемиологических методов анализа дает возможность адекватно оценить эпидситуацию, быстро выявлять геноварианты, обладающие высоким эпидемическим потенциалом, и сдерживать их дальнейшее распространение.

Ключевые слова: норовirus, кишечная инфекция, генотип, молекулярная эпидемиология.

Норовирусы (НВ) принадлежат сем. *Caliciviridae*, роду *Norovirus* и являются одними из доминирующих этиологических агентов вирусных острых кишечных инфекций (ОКИ). По распространенности и частоте вызываемых ими заболеваний среди детей в настоящее время НВ уступают только ротавирусам, тогда как среди взрослых, и особенно пожилых людей, НВ — наиболее часто встречающиеся этиологические агенты

ОКИ [1]. Ведущая роль НВ в развитии ОКИ была установлена сравнительно недавно, сегодня НВ активно изучают. Причиной тому является значительный экономический ущерб, обусловленный вызванной НВ заболеваемостью. По данным службы эпидемиологического надзора за кишечными вирусами, в Европейском регионе 90% всех вспышек вирусных ОКИ за последние 10 лет были вызваны НВ [2]. Результаты эпиднадзора, проводимого в 1996—2006 гг. в США, показали, что на долю НВ пришлось 23,2% всех вспышек ОКИ [3]. Учитывая значительность НВ в формировании заболеваемости ОКИ, с 2008 г. в России норовирусная инфекция введена в форму государственного статистического наблюдения.

Проведение вакцинопрофилактики для снижения заболеваемости, вызванной НВ, сегодня невозможно вследствие высокой генетической и антигенной изменчивости вируса. Единственным эффективным средством снижения заболеваемости является строгий эпидемиологический надзор за циркуляцией НВ и проведение противоэпидемических мероприятий.

Геном НВ характеризуется высокой частотой мутаций, приводящих к возникновению новых вариантов вируса, способных быстро распространяться среди населения из-за отсутствия иммунной прослойки [4—6]. С помощью методов молекулярной эпидемиологии осуществляется анализ географического распространения наиболее эпидемически значимых вариантов НВ, а также отслеживается процесс смены одного геноварианта вируса другим и его влияние на показатели заболеваемости в данном регионе.

Целью исследования было изучение роли норовирусной инфекции в формировании заболеваемости ОКИ среди населения Минска и проведение молекулярно-эпидемиологического анализа ее возбудителей.

Материал и методы

Обследовали 190 детей в периоды спорадической заболеваемости в 2009—2010 гг., а также 41 взрослого пациента во время двух вспышек ОКИ. Для обнаружения маркеров кишечных вирусных инфекций в исследуемых образцах стула больных использовали методы ПЦР (аденовирусы), ОТ-ПЦР (норо-, рота-, астро-, сапо- и энтеровирусы), ИФА (энтеро- и ротавирусы). Проведено 1250 исследований, в том числе методом ПЦР в отношении норовирусов — 213, адено-вирусов — 134, астровирусов — 213, саповирусов — 147, ротавирусов — 119 (методом ИФА) и 157 (методом ОТ-ПЦР), энтеровирусов — 119 (методом ИФА) и 119 (методом ОТ-ПЦР).

Для выделения РНК из проб клинического материала применяли коммерческий набор «РНК-СОРБ» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью набора для обратной транскрипции «RevertAid» («Fermentas», Литва) и случайных гексануклеотидов.

Диагностическую ПЦР для выявления ДНК адено-вирусов, кДНК норовирусов I и II геногрупп, рота-, аст-

ро- и энтеровирусов проводили с использованием коммерческих наборов («АмплиСенс», Россия) согласно инструкциям производителя. Для амплификации кДНК саповирусов применяли набор праймеров, ранее описанных в литературе [7]. Постановку реакции осуществляли в условиях, предложенных разработчиками праймеров.

Визуализацию результатов реакции осуществляли с помощью горизонтального гель-электрофореза.

Для генотипирования НВ, обнаруженных в образцах фекалий, использовали фрагмент гена РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), локализованный в пределах 3' RdRp их генома. Матрицей для проведения реакции секвенирования являлся продукт амплификации 340 нт, получаемый в ПЦР с праймерами JV12/JV13 [8].

Секвенирование участков ДНК проводили в термоциклической реакции с коммерческим набором «DTCS Quick Start Kit», с последующим анализом продуктов на ДНК-анализаторе «CEQ8000» («Beckman Coulter»). Нуклеотидные последовательности (прямую и обратную) для каждой исследуемой пробы обрабатывали в программе «Sequence Investigator» («Beckman Coulter») для получения консенсусных последовательностей, используемых для дальнейшей работы.

Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в базе данных NCBI GenBank с помощью программы BLAST [9]. Компьютерный анализ последовательностей (множественное выравнивание, определение оптимальной модели нуклеотидных замен, филогенетическую реконструкцию и определение достоверности ее топологии) осуществляли в программе MEGA 5 [10]. Определение оптимальной математической модели нуклеотидных замен проводили методом максимального правдоподобия с использованием скорректированного информационного критерия Акаике (AIC). Модель с минимальным значением AIC была выбрана в качестве оптимальной. Для филогенетической реконструкции использовали метод максимального правдоподобия [11]. Достоверность топологии оценивали методом псевдореплик (по каждому дереву были проанализированы 1000 псевдореплик) [12].

Результаты и обсуждение

Чтобы определить роль НВ в формировании заболеваемости ОКИ, проводили анализ их этиологической структуры у детей Минска. Всего было обследовано 190 больных. Исследования проводили в зимне-весен-

ний период, когда обычно наблюдается сезонный подъем заболеваемости вирусными ОКИ.

В 73,7% исследуемых образцов было установлено присутствие одного или более вирусных агентов. Этиологическая структура была представлена ротавирусной (до 37,5% пациентов), норовирусной (29,5%), адено-вирусной (18,6%), астровирусной (7,4%) и энтеровирусной (2,1%) инфекцией.

Сравнительный анализ данных свидетельствует о значительной роли норовирусов, наряду с ротавирусами, в развитии данной патологии. Так, в 2009 г. норовирусная инфекция была диагностирована у 24,4% детей с ОКИ. В I-II кварталах 2010 г. отмечался рост заболеваемости, вызванной НВ: в 38,4% исследуемых образцов обнаружены маркеры норовирусной инфекции. Доля пациентов с ротавирусной инфекцией составляла 26—37,5% обследованных в различные периоды времени с использованием разных методов исследования.

Наблюдались незначительные отличия доли заболевших в различных возрастных группах (рис. 1). Так, у детей до 3 лет НВ обнаруживались в 26,3—26,6% случаев, старше 7 лет — в 23,5%. Некоторое снижение частоты заболеваний, вызванных этой группой патогенов, наблюдалось у детей 3—7 лет (18,2%). Однако данные различия не были статистически достоверны. Отсутствие преобладающей возрастной группы при норовирусной инфекции обусловлено особенностями биологии НВ и патогенеза вызываемых ими заболеваний. Установлено, что инфицирование одним геновариантом НВ не приводит к формированию устойчивого иммунитета, препятствующего последующему реинфицированию. В зависимости от генотипа НВ, перекрест-

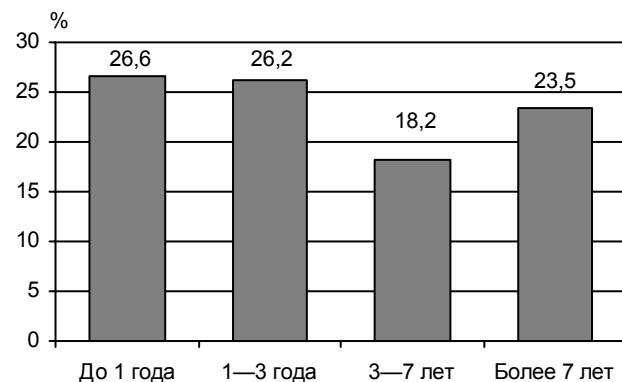


Рис. 1. Возрастная структура пациентов с норовирусной инфекцией

Общая характеристика вспышек вирусных ОКИ в Минске в 2009—2010 гг.

Таблица 1

Дата	Диагноз	Количество обследованных	Возраст, лет	Этиологический агент	Доля заболеваний, установленной этиологией, %
Май, 2009 г.	ОГЭ	8	18—20	Саповирус	75
Февраль, 2010 г.	ОГЭ	10	18—20	Саповирус Норовирус Энтеровирус	60 10 30
Март, 2010 г.	ОГЭ	8	45—86	Норовирус	87,5
Апрель, 2010 г.	ОГЭ	15	16—17	Норовирус	86,6

32 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

ный иммунитет может присутствовать, быть неполным или практически отсутствовать [13]. Этот факт определяет также доминирующую роль НВ в развитии ОКИ у взрослых.

В 2009 г.—первом полугодии 2010 г. было зарегистрировано 4 вспышки острого гастроэнтерита (ОГЭ) среди подростков и взрослых в Минске. Все они имели место в закрытых военных коллективах. В общей сложности заболело более 100 человек. В период вспышек были проведены лабораторные исследования 41 образца кала пациентов. Диагностику проводили в отношении 6 доминирующих возбудителей вирусных ОКИ (рота-, норо-, сапо-, астро-, адено- и энтеровирусов), применяя метод ПЦР и ОТ-ПЦР. Полученные результаты показали, что основные этиологические агенты вспышек принадлежали сем. *Caliciviridae*. В двух из четырех вспышек (май 2009 г., февраль 2010 г.) это были саповирусы, тогда как две другие (март и апрель 2010 г.) были вызваны НВ (табл. 1).

Таким образом, представленные результаты лабораторной диагностики указывают на доминирующую роль НВ как этиологического агента ОКИ в периоды сезонных подъемов спорадической заболеваемости среди детей, а также при возникновении вспышек среди взрослых. Сегодня появилась необходимость развивать и внедрять методы лабораторной диагностики норовирусной инфекции в существующую в нашей стране систему эпиднадзора за инфекционной заболеваемостью.

Род *Norovirus* включает РНК-содержащие вирусы, характеризующиеся высоким уровнем нуклеотидной изменчивости, и является генетически разнородной группой. В пределах рода выделяют 5 геногрупп НВ (I—V), доля аминокислотных различий между которыми достигает 61%. Патогенные для человека НВ входят в три геногруппы (I, II и IV), тогда как геногруппы III и V включают НВ животных [14]. Геногруппы НВ также характеризуются высокой внутригрупповой гетерогенностью: аминокислотная последовательность основного капсидного белка НВ может содержать до 44% различий в пределах одной геногруппы [15]. В связи с этим в двух наиболее разнородных геногруппах патогенных для человека НВ (I и II) выделяют отдельные генотипы: 8 и 17 генотипов в геногруппах I и II соответственно. Наиболее клинически значимыми являются НВ геногруппы II, так как они широко распространены во всем мире и наиболее часто ассоциируются со вспышками и эпидемиями заболеваний в различных странах. Порядка 62% всех вспышек было связано с четвертым генотипом НВ (GII.4). Он же за последние 10 лет вызвал 5 основных пандемий НВ, причем в каждой последующей фигурировал новый эпидемический вариант НВ: *US-95/96_US* — в 1995—1996 гг., *Farmington Hills* — в 2002 г., *Hunter* — в 2004 г., *2006a* — в 2006 г. и *2006b* — в 2007—2008 гг. [16—19]. Анализ географического распространения наиболее эпидемически значимых вариантов НВ, процесс смены одного геноварианта вируса другим и его влияние на показатели заболеваемости в регионе возможно осуществлять толь-

ко с помощью методов молекулярной эпидемиологии. Проведение подобных исследований позволяет быстро выявлять геноварианты НВ, обладающие высоким эпидемическим потенциалом, и предотвращать (или сдерживать) их дальнейшее распространение.

Исходя из этого были проведены молекулярно-эпидемиологические исследования НВ, вызвавших спорадическую заболеваемость среди детей в Минске в 2009—2010 гг., а также две вспышки среди взрослых и подростков в 2010 г.

Генотипирование обнаруженных норовирусов осуществляли с помощью ПЦР с типоспецифическими праймерами (определяли принадлежность вируса к геногруппе I или II), а также с помощью секвенирования (для установления генотипа в пределах геногруппы). Для секвенирования был выбран фрагмент (340 нт) гена, кодирующего RdRp. Всего в исследованиях было использовано 28 нуклеотидных последовательностей НВ, обнаруженных в пробах клинического материала пациентов.

Полученные результаты показали, что абсолютное большинство положительных проб содержали НВ геногруппы II — РНК этих вирусов была выявлена в 92,6% (63) положительных проб, тогда как НВ геногруппы I были обнаружены только в 7,4% (5) образцов.

Для установления генотипа циркулирующих НВ геногруппы II проводили филогенетическую реконструкцию, в которую помимо 27 исследуемых нуклеотидных последовательностей были включены последовательности 8 прототипных НВ наиболее распространенных генотипов. В качестве внешней группы использовали НВ *Norwalk*, принадлежащий к геногруппе I. Для выбора оптимальной модели эволюции на первом этапе с помощью программы MEGA 5 были рассчитаны значения максимального правдоподобия для 24 математических моделей нуклеотидных замен, а также показатели AIC для сравнения значений максимального правдоподобия для каждой из них. Полученные результаты (табл. 2) показали, что оптимальной моделью нуклеотидных замен для филогенетической реконструкции на основании используемого блока данных является двухпараметрическая модель Кимуры, учитывающая различные уровни замен для разных сайтов последовательности (G-распределение). Исходя из этого методом максимального правдоподобия было рассчитано значение показателя α , характеризующего форму дискретного G-распределения для анализируемого блока данных. Получен-

Таблица 2
Сравнительные показатели 5 наиболее оптимальных моделей нуклеотидных замен для блока данных (36 нуклеотидных последовательностей, длина фрагмента — 226 нт), использованных при генотипировании НВ

Модель	Параметр	AIC	BIC	InL
K2+G	71	3689,022	4185,042	-1772,877
K2+G+I	72	3691,058	4194,046	-1772,877
GTR+G	78	3691,112	4235,899	-1766,791
T92+G	72	3691,833	4194,821	-1773,265
GTR+G+I	79	3693,152	4244,903	-1766,791

ное значение ($\alpha=0,4$) было использовано в дальнейшем при филогенетической реконструкции.

На основании данных об оптимальной модели нуклеотидных замен (K2+G) и значении показателя α была проведена филогенетическая реконструкция для генотипирования нуклеотидных последовательностей 27 НВ, циркулировавших в Минске в периоды спорадической заболеваемости в 2009—2010 гг., а также вызвавших две вспышки ОГЭ у взрослых и подростков в 2010 г. Полученные результаты (рис. 2) показали, что все исследуемые норовирусы геногруппы II относились к 4-му генотипу, наиболее распространенному в настоящее время в мире. НВ геногруппы II объединены в общий монофилетический кластер с прототипным НВ *Lordsdale virus* генотипа GII.4. В пределах данного кластера НВ входили в различные субкластеры, что свидетельствовало о генетической неоднородности НВ, циркулировавших в Минске в 2009—2010 гг. Этот факт послужил основанием для проведения внутригенотипового филогенетического анализа исследуемых НВ.

Для реконструкции филогенетических взаимоотношений 27 исследуемых НВ внутри генотипа GII.4 с помощью метода максимального правдоподобия предварительно определили оптимальную модель нуклеотидных замен — GTR G+I и значение показателя ($\alpha=0,3$). Блок данных, использованных для анализа, содержал фрагмент размером 270 нт, локализованный в гене RdRp 43 НВ. В анализ были включены 27 НВ, циркулировавших в 2009—2010 гг. в Минске, прототипные НВ GII.4 *Bristol* и *Lordsdale*, 13 НВ, встречавшихся в других странах, нуклеотидные последовательности которых обнаруживали максимальную степень сходства с

исследуемыми по результатам поиска BLAST, а также НВ *Melksham* GII.2 в качестве внешней группы. Результатом филогенетического анализа стала дендрограмма (рис. 3), на которой видно, что все исследуемые НВ, циркулировавшие в 2009—2010 гг. на территории Минска, входили в состав трех различных монофилетических кластеров.

В составе 1-го кластера были все НВ, обнаруженные у детей со спорадическими случаями инфекции в период эпидподъема зимой 2009 г., и 33,3% штаммов НВ, выявленных у детей зимой 2010 г. В этот кластер также входили НВ, циркулировавшие в странах Европы (Италия, Германия, Нидерланды) и в Южной Корее в 2007—2008 гг. Максимальное генетическое разнообразие внутри этого кластера доходило до 5%, средняя доля внутригрупповых различий составила 1,9%.

НВ, вызвавшие две вспышки инфекции у взрослых и подростков в Минске в 2010 г., а также штамм НВ, обнаруженный в 2008 г. на территории Австралии, представляют 2-й монофилетический кластер. Максимальная генетическая гетерогенность внутри кластера составила 7%, а средняя доля различий — 2,9%.

В состав 3-го монофилетического кластера на дендрограмме вошли 66,7% НВ, обнаруженных у детей в Минске в период сезонного подъема в 2010 г., а также НВ, обнаруженный в Австралии в 2008 г. Этот кластер характеризовался минимальной генетической гетерогенностью: доля нуклеотидных различий между последовательностями не превышала 0,7%, средняя доля внутригрупповых различий составила 0,3%.

Таким образом, по результатам филогенетического анализа все исследуемые НВ были отнесены к трем ге-

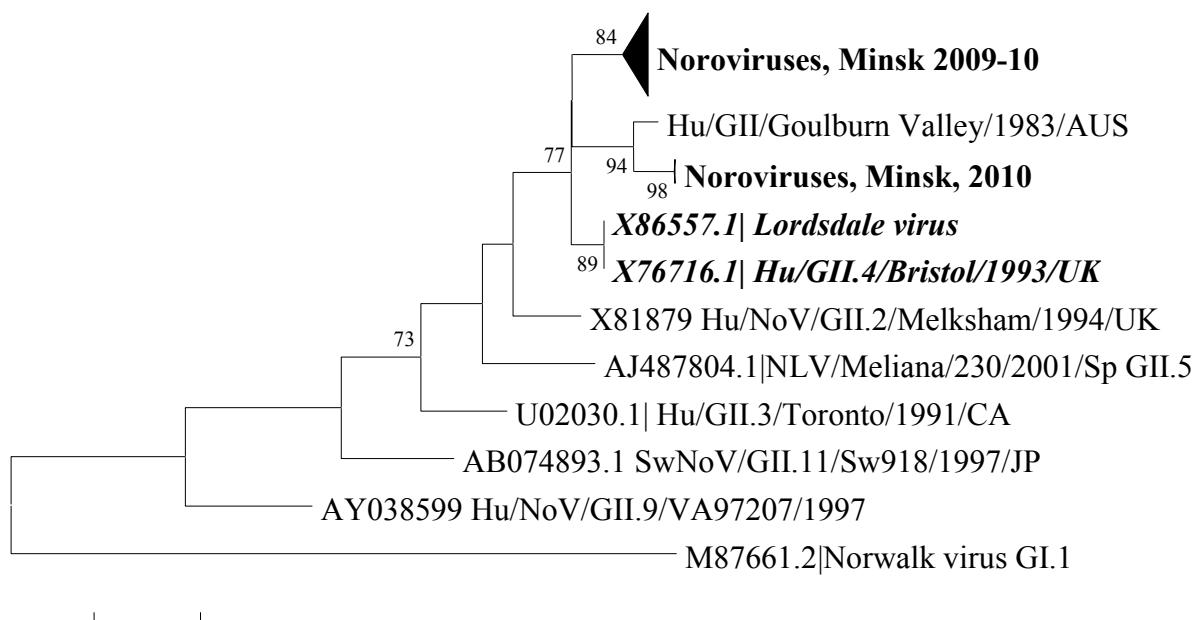


Рис. 2. Дендрограмма, построенная по результатам филогенетического анализа фрагмента 226 нт гена RdRp 36 норовирусов, в том числе 27 вирусов, выделенных в Беларусь, и 9 нуклеотидных последовательностей прототипных норовирусов различных генотипов из базы данных GenBank. Здесь и на рис. 3 цифры в узлах дерева — значения бутстрепинга.

Внизу слева — шкала генетического расстояния

34 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

нетическим субтипам, соответствующим трем монофилетическим кластерам на дендрограмме (см. рис. 3).

Определение доли нуклеотидных различий между тремя выявленными субтипами НВ показало, что 1-й и

2-й субтипы в среднем отличались на 7,7%. На дендрограмме они достоверно объединялись в более крупный общий монофилетический кластер. При этом 3-й субтип имел значительно большие нуклеотидные отли-

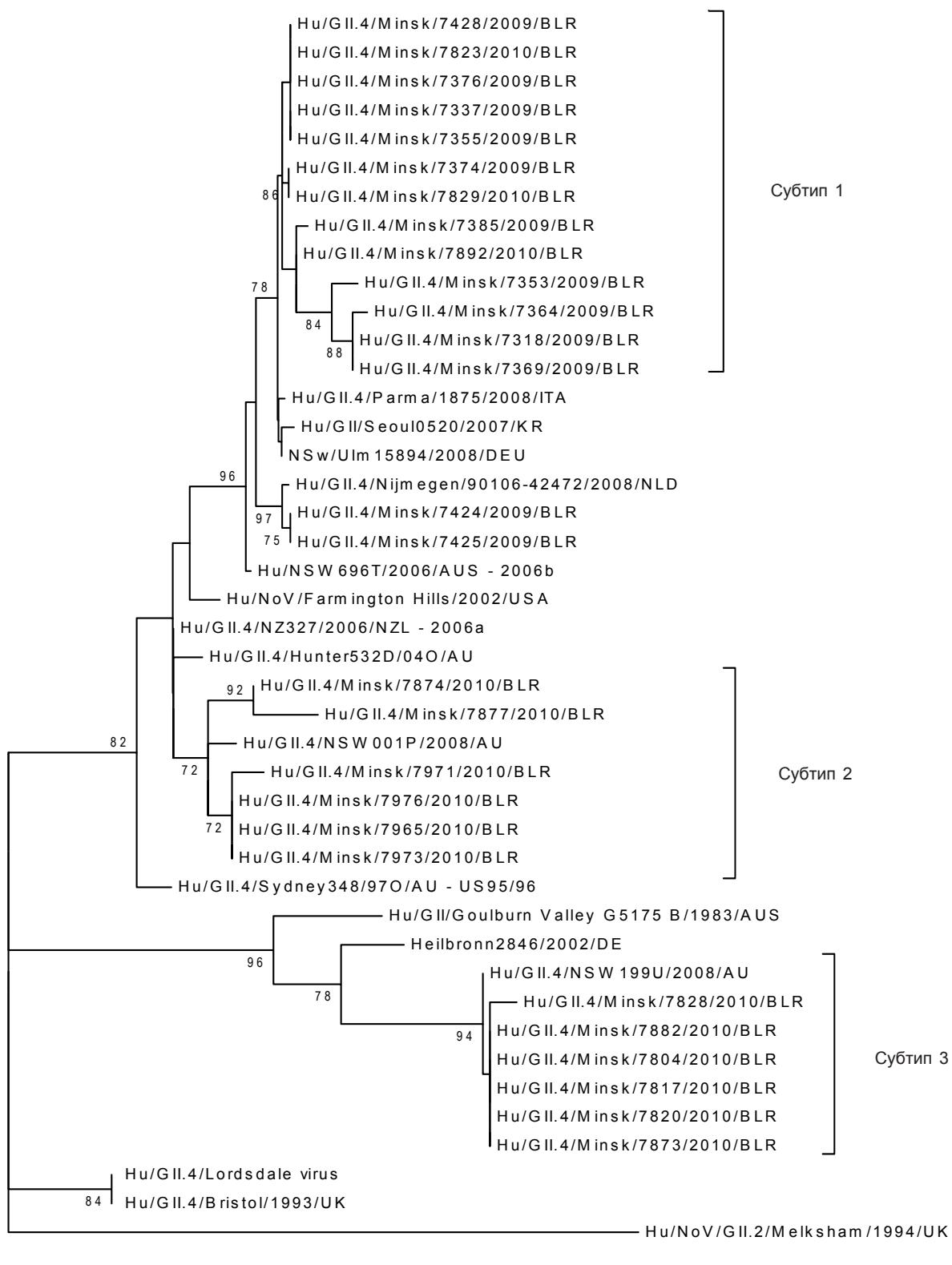


Рис. 3. Дендрограмма, построенная по результатам филогенетического анализа фрагмента 270 нт гена RdRp 43 норовирусов, в том числе 27 норовирусов, обнаруженных в Минске, и 16 нуклеотидных последовательностей, наиболее близких НВ GII.4 из базы данных GenBank

чия от первых двух. Средняя доля нуклеотидных различий 3-го и 1-го субтипа составила 19,3%, 3-го и 2-го субтипа — 18,9%. На дендрограмме 3-й субтип формировал изолированный монофилетический кластер, в который также входили НВ *Goulburn Valley G5175 B* и *Heilbronn2846*.

Полученные результаты свидетельствуют о циркуляции на территории Минска в 2009—2010 гг. НВ трех различных субтипов генотипа GII.4, которые можно рассматривать как отдельные эпидемические варианты вируса. Например, 1-й субтип вызвал спорадическую заболеваемость у детей в 2009 г. (100% циркулировавших НВ в этот период) и распространился среди детского населения Минска в 2010 г. Однако доля его изолятов в 2010 г. значительно снизилась и составила 33,3% от всех выявленных НВ. При этом в период сезона подъема заболеваемости ОКИ зимой 2010 г. появился новый субтип НВ (3-й субтип). Доля изолятов этого субтипа составила 66,7% от всех выявленных НВ, что свидетельствовало о смене доминирующего эпидемического геноварианта НВ в 2010 г. Высокий уровень генетических отличий между 1-м и 3-м субтипом (в среднем — 19,3% нуклеотидной последовательности) позволяет предположить присутствие антигенных различий в структуре вирионов этих субтипов. Появление и циркуляция отличного от предшествующих варианта НВ объясняет повышение заболеваемости ОКИ норовирусной этиологии среди детей в Минске в 2010 г. по сравнению с предыдущим годом (по нашим данным, зимой 2009 г. норовирусная инфекция обнаруживалась у 24,4% детей с ОКИ, тогда как в 2010 г. — у 38,4% заболевших).

Сравнение вирусов 1-го и 3-го субтипов с НВ, циркулирующими в других странах, показало, что 1-й субтип относился к так называемому эпидемическому геноварианту GII.4 2006b: прототипный *NB Hu/NSW696T/2006/AUS* эпидемического варианта 2006b достоверно группировался в составе монофилетического кластера с НВ 1-го субтипа. Этот эпидемический вариант НВ впервые появился в 2006 г. и широко распространился по всему миру, вызвав многочисленные вспышки заболеваний в 2007—2008 гг. Результат поиска в базе данных NCBI обнаружил, что около 100 изолятов НВ, идентифицированных во всем мире (Австралия, Япония, Китай, Корея, страны Европейского региона), обладали более чем 97% сходства нуклеотидных последовательностей с изолятами 1-го субтипа, доминировавшими среди детей Минска в 2009 г.

Результаты сравнительного анализа изолятов 3-го субтипа с НВ, циркулировавшими в других странах, имели принципиальные отличия. В базе данных GenBank была найдена единственная нуклеотидная последовательность GII.4/NSW199U/2008/AU, обладающая значительной степенью сходства (99%) с последовательностями НВ 3-го субтипа, которая принадлежала вирусу, обнаруженному на территории Австралии в 2008 г. Еще два НВ (*Goulburn Valley G5175 B* и *Heilbronn2846/2002/DE*), идентифицированные в Австралии в 1983 г. и в Германии в 2002 г., обладали

в 92% сходством с последовательностями 3-го субтипа. Они же по результатам филогенетической реконструкции достоверно формировали монофилетический кластер с изолятами 3-го субтипа, что позволяет отнести их к той же генетической линии. Однако очевидно, что 3-й субтип является новым геновариантом НВ, впервые появившимся в 2008 г. в Австралии. По нашим данным, в течение эпидсезона 2010 г. происходила смена предыдущего эпидемического варианта (1-й субтип, геновариант GII.4 2006b) новым эпидемическим вариантом НВ (3-й субтип). Появление нового эпидемического варианта НВ позволяет прогнозировать рост заболеваемости ОКИ в зимне-весенний сезон 2011 г., обусловленный его дальнейшим распространением в популяции.

Анализ изолятов НВ, вызвавших две вспышки ОКИ среди взрослого населения и подростков в 2010 г., показал, что все эти изоляты принадлежали 2-му субтипу. В пределах данного субтипа изоляты, выделенные во время каждой из вспышек, достоверно формировали два отдельных монофилетических субкластера, что не позволяет говорить о наличии эпидемической связи между этими вспышками. При этом данные свидетельствуют также об отсутствии эпидемической связи НВ, вызвавших вспышки у взрослых и спорадическую заболеваемость среди детей в тот же период, так как они имели значительные отличия и принадлежали к различным генетическим субтипам. Сравнение с нуклеотидными последовательностями, содержащимися в базе данных NCBI, показало, что значительное количество НВ, циркулировавших в других странах в 2006—2009 гг., обладало высокой степенью сходства с последовательностями 2-го субтипа (около 100 изолятов НВ содержали 95—98% идентичных нуклеотидов). Изучение основных характеристик НВ, выделенных в других регионах, показало, что нуклеотидные последовательности с максимальной степенью сходства (97—98%) с НВ 2-го субтипа принадлежали НВ, обнаруженным в объектах окружающей среды (пробах речной воды — EU056674, EU056675, смыве с рук — EU169442, пробе морковного салата — HM167931). Полученные результаты подтверждают многочисленные факты контаминации этим геновариантом НВ объектов окружающей среды в различных странах, указывают на возможную связь между норовирусными вспышками ОКИ и вирусной контаминацией объектов окружающей среды.

Таким образом, представленные в работе результаты пилотных исследований свидетельствуют о существенной роли НВ в формировании заболеваемости как среди детей, так и взрослого населения. Полученные данные указывают на важность внедрения диагностики в широкую практику отечественной лабораторной службы, а также актуальность проведения научных исследований с применением молекулярно-эпидемиологических методов анализа для адекватной эпидемиологической оценки текущей ситуации по заболеваемости норовирусными ОКИ и ее дальнейшего прогнозирования.

36 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

ЛИТЕРАТУРА

1. Wilhelm I., Roman E., Sanchez-Fauquier A. // Clin. Microbiol. Infect.—2003.—Vol. 9.—P. 274—262.
 2. Food-borne viruses in Europe. Rapid detection of transnational food-borne viral infections and elucidation of transmission routes through molecular tracing and development of a common database. Final report. 2004
 3. Fankhauser R. L., Monroe S. S., Noel J. S., et al. // J. Infect. Dis.—2002.—Vol. 186.—P. 1—7.
 4. Parrino T. A., Schreiber D. S., Trier J. S., et al. // N. Engl. J. Med.—1977.—Vol. 297.—P. 86—89.
 5. Wyatt R. G., Dolin R., Blacklow N. R., et al. // J. Infect. Dis.—1974.—Vol. 129.—P. 709—714.
 6. Johnson P. C., Mathewson J. J., DuPont H. L., Greenberg H. B. // J. Infect. Dis.—1990.—Vol. 161.—P. 18—21.
 7. Yan H., Yagyu F., Okitsu S., et al. // J. Virol. Met.—2003.—Vol. 114.—P. 37—44.
 8. Vinje J., Vennema H., Maunula L., et al. // J. Clin. Micror.—2003.—Vol. 41, № 4.—P. 1423—1433.
 9. Altschul S. F., Gish W., Miller W., et al. // J. Mol. Biol.—1990.—Vol. 215, № 3.—P. 403—410.
 10. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. // Mol. Biol. Evol.—2007.—Vol. 24.—P. 1596—1599.
 11. Huelsenbeck J. // Ann. Rev. Ecol. Syst.—1997.—Vol. 28.—P. 437—466.
 12. Felsenstein J. // Evolution.—1985.—Vol. 43.—P. 63—68.
 13. Donaldson E., Lindesmith L., Lobue A., Baric R. // Immunol. Rev.—2008.—Vol. 225.—P. 190—211.
 14. Zheng D. P., Ando T., Fankhauser R. L., et al. // Virol.—2006.—Vol. 346.—P. 312—323.
 15. Ando T., Noel J. S., Fankhauser R. L. // J. Infect. Dis.—2000.—Vol. 181 (Suppl. 2).—P. S336—S348.
 16. Kroneman A., Verhoef L., Harris J., et al. // J. Clin. Microbiol.—2008.—Vol. 46.—P. 2959—2965.
 17. Blanton L. H., Adams S. M., Beard R. S., et al. // J. Infect. Dis.—2006.—Vol. 193.—P. 413—421.
 18. Tu E. T., Bull R. A., Greening G. E., et al. // Clin. Infect. Dis.—2008.—Vol. 46.—P. 413—420.
 19. Tu E. T., Nguyen T., Lee P., et al. // Emerg. Infect. Dis.—2007.—Vol. 13.—P. 1128—1130.
- GENETIC VARIETY OF NOROVIRUSES HAVING CAUSED ACUTE INTESTINAL INFECTIONS MORBIDITY IN MINSK IN 2009 – 2010**
- N. V. Poklonskaya, T. V. Amvrosieva, A. A. Bezruchko, G. M. Ignatiev, P. I. Grinkevich, E. P. Kishkurno, N. L. Klyuiko, L. V. Zaitseva, D. V. Khodin
- Objective.** To study the norovirus caused infection role in the All morbidity formation. To perform a molecular and epidemiological analysis of the pathogenic agents circulated in Minsk in 2009 – 2010.
- Material and methods.** The intestinal viruses (noro-, rota-, astro-, sapo-, adeno-, enteroviruses) were differentiated in the All patients (190 children and 41 adults) applying the PCR method. The molecular and epidemiological studies included sequencing of the norovirus polymerase gene fragment and phylogenetic reconstructing.
- Results.** The viruses caused All etiological structure in children in Minsk in 2009 – 2010 was presented by rotavirus caused infection (in 37.5% of the patients examined), by norovirus caused infection (in 29.5%), by adenovirus caused infection (in 18.6%), and by astrovirus caused infection (in 2.1%). The RNA of genogroup I norovirus was determined in 7.4% of samples, of genogroup II – in 92.6% of samples. The genogroup II noroviruses referred to GII.4 genotype – the most widely met in the world last 15 years. The noroviruses within one genotype were united in three monophyletic clusters corresponding to three subtypes. The All sporadic morbidity among children in winter of 2009 was caused by subtype 1 viruses referred to the known epidemic variant GII.4 caused numerous outbreaks in various countries in 2007 – 2008. Subtype 2 viruses were the etiological agents caused two outbreaks of All in adults and adolescents in 2010. The sporadic morbidity among children in winter of 2010 was caused by subtype 3 viruses not detected in our country and on the territory of other countries earlier.
- Conclusion.** Appearance of the norovirus new subtype allows suppose increasing of noroviruses caused All frequency in winter of 2011 due to their circulation in the population. Application of molecular and epidemiological methods for analysis would allow assess the epidemic situation adequately, determine the genovariant possessing a high epidemic potential quickly as well as restrict their future spreading.
- Key words:** norovirus, intestinal infection, genotype, molecular epidemiology.

В. Г. ГУДКОВ, К. Ю. ПЛОТНИКОВА, В. Л. ЗУЕВА

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА А В БЕЛАРУСИ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь, Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья

Цель исследования. Получить характеристику эпидемического процесса (ЭП) гепатита А (ГА) в Беларусь, провести пилотный молекулярно-эпидемиологический мониторинг за возбудителем.

Материал и методы. Использованы данные медицинской статистики о заболеваемости ГА, общепринятые методы расчетов и статистической обработки эпидемиологических показателей. Периоды ЭП определяли исходя из выдвинутых ранее положений о базовом потенциале и периодичности ЭП ГА с помощью разработанных методик. Исследовано 140 образцов РНК вируса ГА (ВГА), полученных от больных ГА из Минска и регионов республики. Применили ПЦР и секвенирование фрагмента VP1-P2A области генома ВГА. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программ MEGA4, BLAST.

Результаты. В ЭП ГА выделено 4 периода с различным базовым потенциалом. В последние десять лет темп снижения заболеваемости составил 41,8%, показатель заболеваемости в 2009 г. — 0,88 на 100 тыс. В социально-профессиональной структуре заболевших превалирует работающее население (50,7% в 2009 г.) и учащиеся средних учебных заведений (15,3%). Показатели заболеваемости среди прививаемого контингента (дети 7–14 лет) за 5 лет снизились в 142 раза. Нуклеотидная последовательность соединения VP1-P2A была установлена для 54 образцов: 27 принадлежат к субгенотипу IA, 7 — IB и 20 — IIIA. Все случаи инфицирования ВГА субгенотипа IB в 2008–2009 гг. имели завозной характер, страна происхождения вируса — Египет. К завозным отнесены отдельные случаи заражения ВГА субгенотипов IA и IIIA. С 2009 г. в Минске наблюдается рост выявляемости различных вариантов ВГА субгенотипа IIIA.

Заключение. Получена характеристика ЭП ГА во временном аспекте и в последние годы эпидемиологического благополучия. Мониторинг за популяцией ВГА является необходимым звеном эпидемиологического надзора за ГА.

Ключевые слова: вирус гепатита А, эпидемический процесс, периодичность, базовый потенциал, эпидемиологический надзор, генотипирование.

Гепатит А (ГА) сохраняет свою актуальность, несмотря на значительное снижение уровня заболеваемости в последние 20 лет. Очевидным следствием этого процесса является накопление контингента населения, не

обладающего иммунитетом к вирусу, что в условиях неполного охвата вакцинацией неизбежно приводит к возрастанию риска возникновения вспышек инфекции.

В осуществлении контроля над ГА важную роль играет эпидемиологический надзор (ЭН). В рамках ЭН проводится ретроспективный и оперативный эпидемиологический анализ, изучаются особенности эпидемического процесса (ЭП) ГА, разрабатываются противоэпидемические мероприятия. В соответствии с выдвинутой ранее территориально-факторной концепцией ЭН важной текущей задачей является анализ ЭП ГА в республике во временном аспекте и в условиях относительного эпидемиологического благополучия в последние годы [1].

Современная система ЭН, безусловно, предполагает проведение систематического молекулярно-эпидемиологического мониторинга за циркулирующей популяцией возбудителя. Мониторинг осуществляется с помощью передовых вирусологических и молекулярно-биологических методов исследования. При этом, как правило, с помощью ПЦР проводится выявление вируса гепатита А (ВГА), а затем секвенирование и филогенетический анализ генома возбудителя. Нуклеотидные последовательности определенных фрагментов генома вируса размещаются в национальной и международной базах данных и являются важными критериями при определении путей и факторов распространения инфекции.

Цель настоящей работы — получить характеристику ЭП ГА в Республике Беларусь во временном аспекте и в условиях относительного эпидемиологического благополучия в последние годы, провести пилотный молекулярно-эпидемиологический мониторинг за возбудителем и оценить его эффективность.

Материал и методы

В эпидемиологических исследованиях использовали данные официальной медицинской статистики по учету заболеваемости ГА в Республике Беларусь за 1953—2010 гг. Периоды ЭП определяли исходя из выдвинутых ранее положений о базовом потенциале и периодичности ЭП ГА [2, 3] с помощью разработанных методик [4]. Использовали также общепринятые методы расчетов и статистической обработки эпидемиологических показателей.

В молекулярно-биологических исследованиях изучено 140 образцов, полученных от пациентов с ГА из Минска и различных областей республики в 2006 г. и в период с января 2008 по май 2010 г.

Использовали следующие праймеры к VP1-2A области генома: прямой 5'-CTATTCAAGATTGCAAATTACAAT-3' (2896—2918) и обратный 5'-CCATTCAAGAGTCCA CACACT-3' (3381—3360) [5, 6]. Праймеры были синтезированы ОДО «Праймтех» (Минск).

ПЦР, реакцию секвенирования и анализ нуклеотидных последовательностей проводили, как описано ранее [7].

Результаты и обсуждение

Периодичность ЭП ГА. Периоды ЭП определяли исходя из следующих установленных ранее положений и формулировок.

ЭП — процесс взаимодействия макро- и микропопуляций в определенной экобиосоциоэкономической среде и в конкретный период времени.

Базовый потенциал ЭП — совокупность факторов (условий), обуславливающих минимальную интенсивность ЭП в эпидемическом цикле. Появление дополнительных, стимулирующих ЭП временно действующих факторов вызывает циклические подъемы заболеваемости, которая после восстановления баланса в процессе взаимодействия обеих популяций возвращается к базовому уровню. В случае же длительного воздействия стимулирующих или угнетающих ЭП факторов базовый потенциал и соответствующий ему уровень минимальной заболеваемости изменяются, характеризуя наступление нового сбалансированного периода взаимодействия популяций. Поскольку базовый потенциал ЭП, как и сам этот процесс, изменяется в динамике, его динамическая граница может быть достаточно адекватно отражена линией регрессии, рассчитанной по значениям минимальной среднегодовой заболеваемости в фазах ее спада. Отклонение от этой линии (с учетом доверительных границ) значений минимальной заболеваемости свидетельствует о наступлении нового периода ЭП с измененным в ту или иную сторону базовым потенциалом. Таким образом, в основе этого подхода к периодизации ЭП лежит признак его однородности по уровню базового потенциала, а по существу — активности основных составляющих ЭП в совокупности. С этой точки зрения период ЭП можно определить как один или несколько последовательных эпидемических циклов с одинаковым базовым потенциалом. Другими словами, показатели минимальной среднегодовой заболеваемости (ПМСГЗ) или их выборка в каждый период статистически значимо отличаются от аналогичных показателей, не входящих в определяемый период. При этом ПМСГЗ определяется как более низкий, чем в предыдущем и последующем году, показатель среднегодовой заболеваемости.

Границы между периодами проводятся по пикам заболеваемости между примыкающими друг к другу периодами. Признаком начала нового периода в случае уменьшения базового потенциала является значение показателя среднегодовой заболеваемости ниже границы доверительного интервала ПМСГЗ текущего периода. Если же новый период будет характеризоваться увеличением базового потенциала ЭП, то его наступление можно будет определить только после завершения фазы спада и начала фазы подъема очередного цикла, при этом значение ПМСГЗ должно достоверно отличаться от аналогичного показателя за предшествующий период [2—4].

Динамика ЭП ГА в республике со времени начала устойчивой регистрации заболеваемости в 1956 г. до настоящего времени представлена на рис. 1.

При анализе кривой заболеваемости с помощью описанного приема было выделено четыре существенно различающихся по уровню базового потенциала и, соответственно, величине ПМСГЗ периода ЭП (табл. 1).

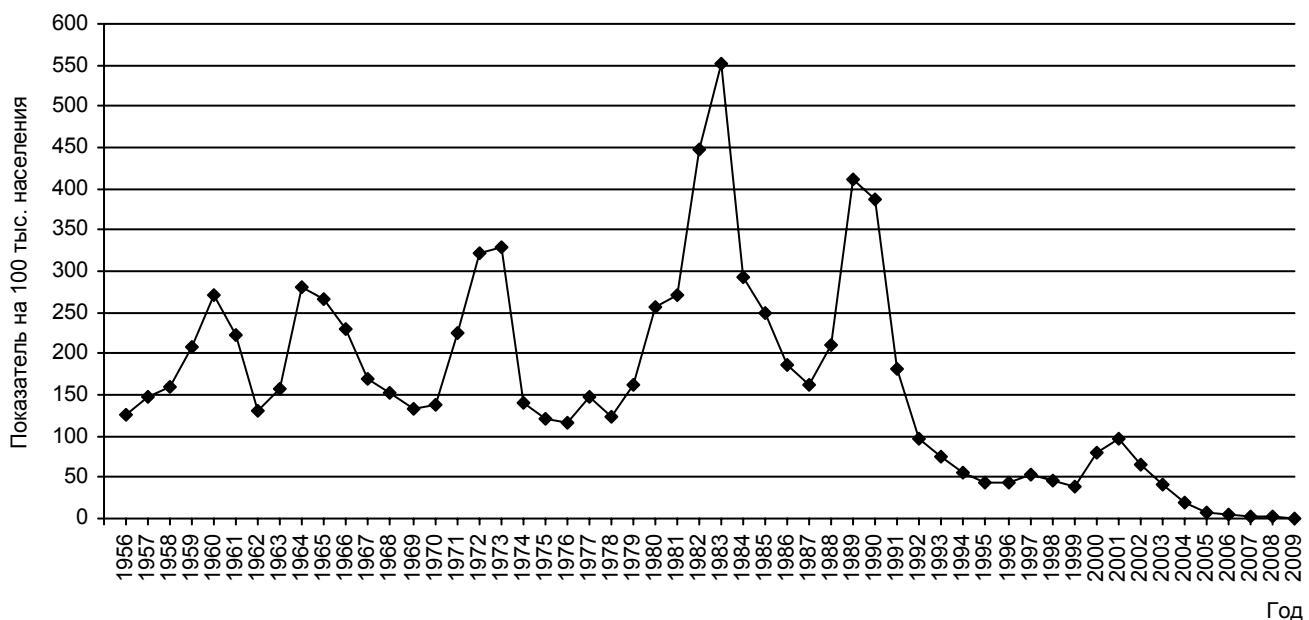


Рис. 1. Многолетняя динамика заболеваемости ГА в РБ

Первый период определяется 5 ПМСГЗ, второй и четвертый — по 1, третий — двумя.

Первый период отсчитывается с 1956 г. — начала устойчивой регистрации заболевания. Он характеризуется как период средней интенсивности ЭП с присущими ему чертами: многолетней и сезонной цикличностью, преимущественным поражением детей, высокой плотностью иммунной прослойки населения к вирусу, выраженной зависимостью уровня заболеваемости от степени социально-экономического развития государства, санитарно-гигиенических условий жизни и т. п.

В этот период в мире четко выявлялись территории с различной степенью эндемичности в отношении ГА, а уровни заболеваемости на гиперэндемичных территориях достигали 500—700 случаев на 100 тыс. жителей и более, в то время как на гипоэндемичных территориях этот показатель составлял всего около 20—40 случаев. Беларусь в эти годы относилась к территориям со средним (промежуточным) уровнем эндемичности, минимальные среднегодовые показатели заболеваемости, характеризующие базовый потенциал эпидемического процесса, не опускались ниже 100 случаев на 100 тыс. жителей, составляя от 127,0 в 1956 г. до 158,0 в 1963 г., максимальный уровень заболеваемости составлял 328,7 на 100 тыс. в 1973 г. Средний

показатель заболеваемости в этот период был равен 214,55 на 100 тыс. населения.

Второй период высокой интенсивности ЭП наблюдался в республике с 1983 по 1989 г. ПМСГЗ составлял 161,8 на 100 тыс. населения, а показатели заболеваемости на пиках в 1983 и 1989 г. достигали 551,6 и 410,7 случая на 100 тыс. населения соответственно. Средний показатель заболеваемости в этом период составлял 294,79 на 100 тыс. населения.

С начала 90-х годов XX века эпидемиологическая ситуация в отношении ГА в Беларуси, как и во всем мире, начала меняться. Интенсивность ЭП стала снижаться, сгладились многолетние циклические и даже сезонные колебания заболеваемости, сократилась иммунная прослойка в популяции, существенно снизились уровни заболеваемости в странах, которые раньше относились к гипер- и среднеэндемичным территориям, возрастная структура заболеваемости сместилась в сторону старших возрастов (подростки и взрослые).

Важно отметить, что в ряде стран, в том числе СНГ, уменьшение интенсивности ЭП ГА происходило на фоне снижения социально-экономических показателей, нередко при ухудшении санитарно-гигиенических условий, что противоречило сложившимся ранее представлениям. Гипотетически, одной из причин наблюдав-

Таблица 1

Периоды ЭП ГА с различным базовым потенциалом

Параметр периода	Период ЭП			
	1-й	2-й	3-й	4-й
Годы, входящие в период	1956—1983	1983—1989	1989—2001	2001—2009
Годы учета ПМСГЗ	1956, 1962, 1969, 1976, 1978	1987	1996, 1999	2009
Величина ПМСГЗ на 100 тыс. человек	127; 130; 132,9; 116,5; 123,8	161,8	42,93; 38,02	0,88
Средняя величина ПМСГЗ с доверительным интервалом	126,04±5,54*	161,8	40,48±4,81*	0,88
Средняя величина заболеваемости	214,55	294,79	123,60	26,44

*Доверительный интервал при уровне значимости 0,05.

шегося с 1989 по 2001 г. периода эпидемиологического шифта ГА могло быть изменение биологических свойств вируса, в частности его вирулентности, выходящее за рамки изменчивости возбудителя в процессе обычных циклических колебаний заболеваемости. ПМСГЗ составлял $40,48 \pm 4,81$ на 100 тыс. населения, хотя показатели заболеваемости на пиках достигали 410,7 в 1989 г. и 96,22 случая на 100 тыс. населения в 2001 г. Средний показатель заболеваемости в этот период составлял 123,60 на 100 тыс. населения.

Четвертый, текущий, период стабилизации ЭП и планомерной массовой вакцинации детей отсчитывается с 2001 г. и характеризуется последовательно снижающимся уровнем среднегодовой заболеваемости, преимущественным, хотя и не частым, поражением людей средних лет, относительно большой прослойкой неиммунного к вирусу населения. Этот период имеет необычайно низкий для республики базовый потенциал ЭП (ПМСГЗ — 0,88 на 100 тыс.). Хотя уровень заболеваемости на пике в начале отсчета периода в 2001 г. составлял 96,22 на 100 тыс., средний показатель заболеваемости в этот период на текущий момент — 26,44 на 100 тыс. населения.

Эпидемиологический анализ заболеваемости ГА в последние годы. В этиологической структуре острых вирусных гепатитов на фоне снижения интенсивности ЭП в течение последних 6 лет доля ГА последовательно уменьшалась и в 2009 г. составила 27% (в 2008 г. — 40%). Тенденция ЭП ГА в Беларуси в 1987—2009 гг. имеет выраженную направленность к снижению в среднем на 12,6%.

В последние десять лет ежегодный темп снижения значительно увеличился и составил 41,8%. В 2009 г. направленность динамики ЭП сохранилась, заболеваемость снизилась на 56,5% и составила 0,88 (2007 г. — 2,02) на 100 тыс. населения. Выше республиканского уровня заболеваемость была в Минске (1,24) и Гомельской области (1,03). Уровень заболеваемости ГА среди городского населения в 2009 г. снизился на 43% (с 1,74 до 0,97), сельского — на 78% (с 2,83 до 0,61).

В структуре социально-профессионального состава переболевших ГА превалирует работающее население (2009 г. — 50,7%, 2008 г. — 33,5%) и учащиеся учреждений среднего образования (15,3% и 29,36% соответственно). Неработающее население, включая пенсионеров, составило 13% и 16,9% в 2009 г. и 2008 г. соответственно; учащиеся средних специальных заведений и вузов — 10,5% и 9,53%; дети, посещающие ДДУ, — 2,3% и 4,6%; неорганизованные дети младшего возраста — 8,2% и 6,1%.

Место инфицирования ГА часто (56% в 2008 г., 42,3% в 2009 г.) установить не удается; значительная часть (39,4% в 2008 г. и 25,6% в 2009 г.) заболевших инфицировались по месту жительства (2008 г. — 4%, 2009 г. — 30,7%) и по месту временного пребывания. В единичных случаях местом инфицирования была школа или место работы (0,6% в 2008 г. и 1,4% в 2009 г.).

Сезонный подъем ГА (рис. 2) в 2009 г. наблюдался в январе—марте, мае, сентябре и октябре (в 2008 г. — в феврале—июле, сентябре), пик заболеваемости — в мае. По сравнению с 2008 г. степень влияния сезонных факторов в 2009 г. существенно не изменилась (16,50% и 16,26%), удельный вес круглогодичной заболеваемости составил 83,5% и 83,7% соответственно.

Возрастная структура заболевших ГА за последние 5 лет характеризуется снижением удельного веса детей в возрасте до 14 лет в 4 раза — с 50 до 12,5%. Наиболее интенсивно (в 142 раза) снизились показатели заболеваемости среди прививаемого контингента (дети 7—14 лет) — с 128,4 в 2005 г. до 0,9 на 100 тыс. детей в 2009 г. Заболеваемость ГА взрослых (15 лет и старше) за этот же период снизилась только в 17 раз — с 34,26 до 2,02 на 100 тыс. численности соответствующей возрастной группы.

Плановая иммунизация детей 6 лет и контактных лиц в очагах по эпидемиологическим показаниям (2003—2006 гг.) осуществлялась в соответствии с Национальной программой демографической безопасности Республики Беларусь на 2007—2010 гг. (п.2.2.) и Государственной программой обеспечения санитарно-эпидеми-

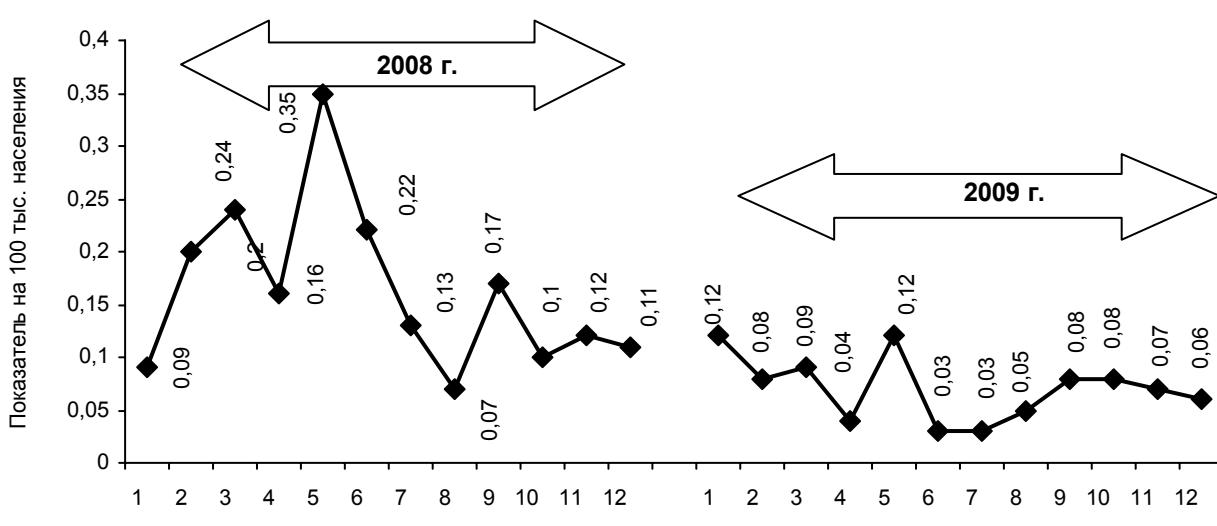


Рис. 2. Годовая динамика заболеваемости ГА за 2008—2009 гг.

40 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

ческого благополучия населения Республики Беларусь на 2007—2010 гг. (п.п. 12, 13). В 2009 г. против ГА с профилактической целью вакцинировано 95 925 из 97 388 детей в возрасте 6 лет, что составило 98,5% (в 2008 г. — 89 829 детей, или 96%, подлежащих вакцинации детей). В эпидемических очагах с целью их локализации и ликвидации вакцинировано 5024 из 5057 человек, что составило 99,3% (в 2008 г. вакцинировано 3807 человек, или 86%, подлежащих вакцинации лиц).

Несмотря на стабильную эпидемиологическую ситуацию по ГА в последние 5 лет в Республике Беларусь, существует реальный риск активизации ЭП и быстрого роста заболеваемости как среди взрослого населения, так и среди не привитых детей. Этому может способствовать активная миграция населения из других стран, где заболеваемость значительно выше (Россия, Эстония, Литва, Украина и др.), а также формирование значительной прослойки не иммунного к ВГА населения в нашей стране. По данным Роспотребнадзора, в 2009 г. в РФ было зарегистрировано 59 вспышек ГА, в том числе 6 крупных, в которых пострадало 786 человек. В 2010 г. в РФ также произошли крупные вспышки ГА. Основной причиной водной передачи инфекции явилось неудовлетворительное состояние коммунальных систем водоснабжения.

В первые 5 мес 2010 г. по сравнению с аналогичным периодом прошлого года заболеваемость ГА в нашей стране возросла в 2,3 раза (с 0,46 до 1,09 на 100 тыс. населения). Некоторое увеличение числа спорадических случаев заболеваний отмечается на всех территориях республики за исключением Минской области. Достоверный четырехкратный рост (с 0,65 до 2,59 на 100 тыс.) отмечен в Минске. В столице в ЭП вовлекалось преимущественно взрослое население (18 лет и старше), составившее 92,3% от всех заболевших. Среди них доминировали лица в возрасте 20—29 и 30—39 лет (29,7% и 23,0% соответственно), что, вероятно, связано с отсутствием у них естественного иммунитета из-за снижения интенсивности циркуляции ВГА на протяжении последних 10 лет. Почти все заболевшие (46 человек, или 96%) не были привиты против ГА, двое заболели в первые 5 дней после вакцинации, что, наверное, свидетельствует о том, что они прививались в период инкубации.

Таким образом, получена эпидемиологическая характеристика ЭП ГА в республике в последние годы. Установлена высокая эффективность вакцинации про-

тив ГА, однако даже на фоне относительного эпидемиологического благополучия в условиях неполного охвата населения вакцинацией при наличии высокой доли не иммунного населения и его интенсивной миграции сохраняется риск возникновения вспышек инфекции и роста заболеваемости.

Результаты молекулярно-эпидемиологического мониторинга. РНК ВГА была обнаружена в 980 сыворотках и 3 фекальных пробах при исследовании 140 образцов клинического материала, полученного в 2006 и 2008—2010 гг. Нуклеотидная последовательность соединения VP1-P2A была установлена для 54 образцов. Нуклеотидные последовательности фрагмента генома VP1-P2A вариантов ВГА, полученных из Минска (август—декабрь 2006 г., январь 2008 г.—май 2010 г.) и различных областей республики (январь 2008 г.—февраль 2009 г.), анализировали путем сравнения с прототипными последовательностями генома ВГА, депонированными в международной базе данных GenBank.

В результате показано, что циркулирующие в стране варианты ВГА характеризуются значительным генетическим разнообразием и представлены двумя генотипами: I и III. При этом 27 (50%) из 54 изолятов, включенных в исследование, принадлежат к субгенотипу IA, 7 (13%) — к субгенотипу IB и 20 (37%) — к субгенотипу IIIA (табл. 2).

Все случаи инфицирования ВГА субгенотипа IB, имевшие место в 2008—2009 гг., носили завозной характер, причем страной происхождения вируса являлся Египет. В общей сложности Египет с туристической целью посетили 5 заболевших (из Витебска и Бреста). При этом один из них, видимо, заразился от заболевшего супруга (симптомы появились через 3 мес после приезда из Египта), поскольку обнаруженные варианты вируса имели идентичные нуклеотидные последовательности. Один заболевший (из Минска) контактировал с вернувшимися из этой страны лицами. Важно отметить, что анализируемый участок генома полностью совпал у 3 заболевших из Минска, Бреста и Витебска, что может свидетельствовать об общем источнике инфекции. Учитывая, что все случаи ограничены периодом с октября 2008 г. по январь 2009 г., обращает на себя внимание тот факт, что с сентября по ноябрь 2008 г. в ряде стран Европы (Франции, Бельгии, Германии) были зарегистрированы случаи заболевания ГА лиц, посетивших Египет [8—10]. При этом наиболее вероятным мес-

Таблица 2

Результаты генотипирования ВГА

Город (область)	2006 г.		2008 г.		2009 г.		2010 г.	
	генотип	количество	генотип	количество	генотип	количество	генотип	количество
Минск	IA IB	10 1	IA IB IIIA	2 2 2	IA IIIA	4 6	IA IIIA	1 12
Брест (Брестская обл.)	-	0	IA	1	IB	1	-	0
Витебск (Витебская обл.)	-	0	IA IB	2 3	-	0	-	0
Гомель (Гомельская обл.)	-	0	IA	5	-	0	-	0
Гродно (Гродненская обл.)	-	0	IA	1	-	0	-	0
Могилев (Могилевская обл.)	-	0	IA	1	-	0	-	0

том инфицирования ВГА авторы публикаций называют крупные суда, курсирующие по Нилу. При сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей фрагмента VP1-P2A генома вирусов длиной 315 нуклеотидов, выделенных от заболевших туристов из Франции, Бельгии и Республики Беларусь, выявлена высокая степень сходства между ними (98,7—99,4%). Тем не менее имеющиеся различия указывают на разные источники инфицирования отечественных и иностранных туристов.

Завозной характер заболевания предполагается и у больного с выявленным в Минске в октябре 2008 г. вирусом субгенотипа IA, со значительно отличающейся от преобладающих в республике вирусов последовательностью фрагмента VP1-P2A генома. Результаты исследований согласуются с эпидемиологическими данными: за месяц до появления симптомов заболевший посещал Болгарию.

Обращает на себя внимание увеличение частоты выявляемости субгенотипа IIIA ВГА в Минске. Так, в 2006 г. этот субгенотип не обнаруживался вовсе. В ноябре и декабре 2008 г. были зарегистрированы два изолятов, причем принимая во внимание различия в нуклеотидной последовательности инфицирование из одного источника можно было исключить. Однако уже в январе 2009 г. вирус, аналогичный обнаруженному у больного ГА в декабре 2008 г., был выявлен еще у одного человека, работающего поваром на одном из промышленных предприятий Минска. В феврале вирус с той же нуклеотидной последовательностью уже обнаруживался у работников этого предприятия. Эпидемиологическое расследование подтвердило предположение о контактном заражении повара от заболевшего в декабре лица, несмотря на то, что последний первоначально отрицал даже факт знакомства с источником инфекции.

В сентябре 2009 г. у больного М. (6 лет) через 16 дней после прививки против ВГА появились симптомы ГА. Еще через 3 дня (19 дней после введения вакцины) в крови были выявлены антитела класса M к ВГА. Исследование сыворотки крови методом ПЦР подтвердило наличие РНК ВГА. Анализ фрагмента VP1-P2A генома показал, что вирус относится к субгенотипу IIIA и наиболее близок к штамму ВГА, вызвавшему в 2007 г. вспышку в Южной Корее (совпадение 388 нуклеотидов из 390), а не к вакциальному варианту вируса. Это позволило исключить связь заболевания с вакцинацией. В ходе дальнейшего эпидемиологического расследования было установлено, что ребенок за месяц до начала заболевания вернулся из Таджикистана. Несколько позже, в декабре 2009 г. и январе 2010 г., у больных, госпитализированных в инфекционную больницу Минска, были детектированы вирусы субгенотипа IIIA, достоверно группирующиеся в одном кластере с возбудителем, выявленным у больного М., хотя и различающиеся несколькими заменами в нуклеотидной последовательности генома. Последнее указывает на высокую вероятность происхождения возбудителей из одного региона, несмотря на то, что при эпидемиологическом расследовании источник инфицирования в этих случаях установить не удалось.

В январе 2010 г. были выявлены 3 случая ГА, вызванные вирусом субгенотипа IIIA с одинаковой анализируемой областью из 315 нуклеотидов. Все случаи зарегистрированы в северо-западной части столицы. В ходе эпидемиологического расследования был исключен как завозной характер заболеваний, так и контактно-бытовой путь заражения. Позже, в марте и апреле 2010 г., вирусы с отличными от предыдущих, но с полностью совпадающими между собой участками фрагмента VP1-P2A генома, были обнаружены у двух лиц, проживающих в противоположных районах столицы и отрицающих факт знакомства. Еще 6 случаев заражения ВГА субгенотипа IIIA в 2010 г. характеризуются уникальными последовательностями анализируемой области.

В 2010 г. к настоящему моменту лишь в одном случае выявлен вирус субгенотипа IA. Результаты анализа его генома показали, что он на 3,4% отличается от штаммов, циркулировавших в 2006 и 2008—2009 гг., а при сравнении с последовательностями, депонированными в международной базе данных GenBank, выявлена высокая степень сходства (99%) с ВГА, циркулировавшим в Москве в 1999 г.

Таким образом, можно считать установленным, что наблюдавшийся в Минске в первые 5 мес 2010 г. четырехкратный по сравнению с аналогичным периодом 2009 г. рост заболеваемости ГА обусловлен распространением различных штаммов вируса. Полученные данные свидетельствуют о постоянном притоке новых для Республики Беларусь вариантов ВГА и указывают на необходимость систематического молекулярно-эпидемиологического мониторинга за возбудителем.

При анализе эпидемиологической ситуации в отношении ГА в Беларуси во временном аспекте выявляются 4 периода с существенно различающимися уровнями базового потенциала ЭП. Наиболее неблагоприятная эпидемическая ситуация по ГА складывалась в первом и особенно во втором периоде, в третьем же и особенно в последнем, четвертом, периоде она последовательно и достаточно динамично улучшалась. В последние годы ЭП ГА в Беларуси обладает самым низким за все время наблюдения и объективно весьма невысоким базовым потенциалом, удержание и даже дальнейшее снижение уровня которого является реальной задачей на фоне массовой плановой вакцинации населения и совершенствования системы ЭН за инфекцией.

Проведен pilotный молекулярно-биологический мониторинг за популяцией ВГА в республике. В последние годы он получает все большее распространение в европейских странах и некоторых регионах РФ, при этом с целью эффективного обмена и анализа полученной информации формируются соответствующие региональные сети. Сеть по согласованному типированию ВГА и предупреждению вспышек ГА (Network for harmonizing HAV typing and for alerting on hepatitis A outbreaks) — под эгидой Шведского института по контролю инфекционных заболеваний охватывает Швецию, Нидерланды, Францию, Венгрию и ряд других стран [11]. В последнее время к ней подключились страны Балтии, Россия и Беларусь (на начальной стадии со-

42 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

трудничества). В республике созданы предпосылки для активизации сотрудничества с международными сетями по надзору за ГА и типированию возбудителя. Полноценное и взаимовыгодное сотрудничество с сетью станет возможным после включения в систему ЭН за ГА в республике подсистемы молекулярно-эпидемиологического мониторинга за возбудителем.

Результаты таких исследований имеют большую практическую значимость и востребованы санитарно-эпидемиологической службой республики. В этой связи письмом заместителя министра главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 1 марта 2010 г. № 10-27/17-190 «О молекулярно-эпидемиологическом мониторинге вирусов гепатита А в Республике Беларусь» в целях совершенствования ЭН за ГА предложено осуществлять молекулярно-эпидемиологический мониторинг популяции ВГА в республике и использовать его результаты в системе ЭН при проведении эпидемиологических расследований и планировании противоэпидемических мероприятий. Для решения этой задачи необходимо оптимизировать научные подходы, разработать и утвердить соответствующие инструктивно-методические документы.

Авторы выражают благодарность докторам Anne Marie Roque-Afonso из Национального референс-центра по надзору за гепатитом А Франции и Isabelle Thomas из Бельгийского научного института общественного здоровья за предоставление нуклеотидных последовательностей штаммов ВГА, вызвавших вспышки во Франции и Бельгии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гудков В. Г., Мороз А. Г., Борткевич В. С. // Материалы первой международной конференции по вирусным гепатитам «Эпидемиология, диагностика, профилактика, лечение». — Минск, 1997. — С. 20—21.
2. Гудков В. Г. // Проблемы бактериологии и иммунологии: Материалы юбил. науч. конф.— Минск, 2005.— С. 82—92.
3. Гудков В. Г. // Материалы Рос. науч.-практ. конф., посвящ. 110-летию кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова. — СПб., 2006.— С. 86.

4. Гудков В. Г., Мороз А. Г. // Материалы науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию санитарно-эпидемиологической службы Республики Беларусь.— Минск, 2006.— С. 400—405.

5. Hutin Y. J., Pool V., Cramer E. H., et. al. // N. Engl. J. Med.— 1999.— Vol. 340, № 8.— P. 595—602.

6. Nainan O. V., Armstrong G. L., Han X. H., et. al. // J. Infect. Dis.— 2005.— Vol. 191.— P. 957—963.

7. Плотникова К. Ю., Гудков В. Г. // Здравоохранение.— 2009.— № 11.— С. 8—13.

8. Robesyn E., Micalessi M. I., Quoilin S., et. al. // Eurosurveillance.— 2009.— Vol. 14, № 3.— P. 173—178.

9. Couturier E., Roque-Afonso A. M., Letort M. J., et. al. // Ibid.— P. 55.

10. Bernard H., Frank C. // Ibid.— P. 81—90.

11. Norder H. // Viral Hepatitis Prevention Board / http://www.vhpb.org/files/html/Meetings_and_publications/Presentations/ANTS3C1.pdf.

DESCRIPTION OF EPIDEMIC PROCESS OF VIRAL HEPATITIS B IN BELARUS

V. G. Gudkov, K. Yu. Plotnikova, V. L. Zueva

Objective. To characterize the epidemic process (EP) of hepatitis A (HA) in Belarus, to perform a pathogenic agent pilot molecular-epidemiological monitoring.

Material and methods. The medical statistical data on HA morbidity, general methods for the epidemiological variables calculation and statistical treatment were used. The EP periods were determined applying the methods developed and basing on the principles concerning the HA EP basic potential and periodicity that had been offered earlier. One hundred and forty samples of the HA virus (HAV) RNA separated from Minsk HA patients as well as from those from other republic regions were studied. The HAV genome VP1-P2A fragment was sequenced and PCRs were performed. The nucleotide sequences were analyzed using MEG4, BLAST programs.

Results. Four periods were separated having different basic potentials were determined in the HA EP. The incidence reduction had been 41.8% in the last decade, the disease incidence in 2009 was 0.88 per 100 hundred residents. The employed population (50.7% in 2009) and young people studying at colleges (15.3%) dominated in the socio-professional structure of the fallen ill persons. The incidence values in the vaccinated contingent (children aged 7 – 14) had reduced by 142 times for five years. The VP1-P2A nucleotide sequence was determined for 54 samples: 27 of them referred to IA subgenotype, 7 – to IB, and 20 – to IIIA. All cases of the HAV IB subgenotype infecting in 2008 – 2009 were imported, the country of origin being Egypt. The cases of HAV infecting by IA and IIIA genotypes were considered imported, too. In 2009 a growth of the HAV IIIA subgenotype various variants separation was registered in Minsk.

Conclusion. HA EP was characterized in the time aspect and considering the epidemiological well-being lately. HAV population monitoring is an obligatory unit of the HA epidemiological survey.

Key words: hepatitis A virus, epidemic process, periodicity, basic potential, epidemiological survey, genotyping.

Медицинская литература России

- Дмитриев Г. А., Доля О. В., Василенко Т. И. **Сифилис: Феномен, эволюция, новации**.— М., 2010.
 Евсеев М. А. **Уход за больными в хирургической клинике: Учеб. пособие для вузов**.— М., 2010.
Заболевания органов дыхания при беременности / Под ред. А. Г. Чучалина, Р. С. Фассахова.— М., 2010.
Заболевания периферических артерий / Под ред. Э. Р. Молера III, М. Р. Джффа.— М., 2010.
 Заславская Р. М. и др. **Эффективность метаболической терапии пожилых больных ишемической болезнью сердца**.— М., 2010.
 Истомин Н. П. и др. **Диагностика и комплексное лечение панкреонекроза**.— М., 2009.
Квалификационные тесты по неврологии / Под ред. В. Н. Штока.— М., 2010.
 Кишкун А. А. **Клиническая лабораторная диагностика: Учеб. пособие**.— М., 2010.
 Ковалев А. И. **Общая хирургия: Курс лекций: Учеб. пособие для вузов**.— М., 2009.
Кожные и венерические болезни: Учебник для вузов / Под ред. О. Л. Иванова.— М., 2010.

П. А. СЕМИЖОН, Е. Г. ФОМИНА, Е. П. СЧЕСЛЕНOK,
Т. В. ШКОЛИНА, Н. В. ПОКЛОНСКАЯ, К. Л. ДЕДЮЛЯ,
Е. В. БАРКОВСКИЙ, А. С. ВЛАДЫКО

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ И ПРИРОДА ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО НУКЛЕОКАПСИДНОГО ПОЛИПЕПТИДА ВИРУСА ГЕПАТИТА С

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь,
Белорусский государственный медицинский университет

Цель исследования. Установить возможные причины получения двух белковых форм при экспрессии рекомбинантного нуклеокапсидного белка в клетках *E. coli*, штамм BL21 (DE3).

Материал и методы. В настоящем исследовании использованы стандартные молекулярно-биологические методы: полимеразная цепная реакция (ПЦР), агарозный гель-электрофорез, реакция термоциклического секвенирования.

Результаты. В последовательности *Core*-гена, кодирующей нуклеокапсидный белок ВГС, введенной в структуру плазмидного вектора pJC40, выявлено 24 нуклеотидные замены, 6 из которых приводят к замене 5 аминокислот. Полученный в дополнение к полноразмерному (21 кДа) нуклеокапсидному белку продукт с молекулярной массой 16 кДа может быть результатом особенностей используемой экспрессирующей системы, ведущих к нарушению процессов трансляции и, как следствие, преждевременной терминации белкового синтеза. В то же время нельзя исключить, что полученный белковый продукт с молекулярной массой 16 кДа может являться белком с совершенно другой структурой и свойствами, отличными от нуклеокапсидного белка ВГС.

Заключение. Обобщенные в работе данные свидетельствуют о недостаточной изученности нуклеокапсидного белка ВГС и особенностей процессов его экспрессии в различных клеточных системах, что делает актуальным дальнейшее исследование полученных рекомбинантных полипептидов.

Ключевые слова: вирус гепатита С, рекомбинантные полипептиды, экспрессия белка.

Нуклеокапсидный белок вируса гепатита С (ВГС) является неизменным компонентом всех производимых в настоящее время иммуноферментных тест-систем для диагностики вирусного гепатита С. Особенностью данного белка являются выраженная антигенная и иммуногенная активность, что обеспечивает высокую (до 98%) чувствительность и специфичность современных иммуноферментных диагностических тест-систем, а специфические антитела, вырабатываемые к данному антигену, выявляются на самых ранних стадиях ВГС-инфекции, что позволяет диагностировать заболевание в максимально короткие сроки с момента инфицирования [1].

Одним из приоритетных направлений в области разработки современных диагностикумов вирусных инфекций является использование методов генетической инженерии — так называемых технологий рекомбинантных ДНК, позволяющих создавать искусственные вирусные антигены, составляющие основу при разработке иммуноферментных тест-систем. Несомненным достоинством данной технологии является то, что появляет-

ся возможность получения специфических антигенов для выявления тех инфекций, этиологические агенты которых слабо либо вообще не культивируются в питательной среде. Использование рекомбинантных технологий позволило путем амплификации и клонирования фрагмента ДНК, кодирующего нуклеокапсидный белок ВГС в составе плазмиды pJC40, и последующей трансформацией в пермиссивные клетки *E. coli*, штамм BL21 (DE3), получить рекомбинантный антиген ВГС, представленный в виде двух форм с молекулярной массой 21 кДа и 16 кДа. Обе формы белка обладают высокой антигенной активностью [2].

Целью настоящего исследования является установление возможных причин получения двух белковых форм при экспрессии рекомбинантного нуклеокапсидного белка в клетках *E. coli*, штамм BL21 (DE3).

Материал и методы

Амплификацию фрагмента ДНК, кодирующего нуклеокапсидный белок в составе гибридной плазмиды pJC40/HCV1-190, осуществляли при помощи пары праймеров (SeqSense HCV: 5'-AAGGAGATACCATGGGC-3'; SeqAntis HCV: 5'-CCCAAGGGGTTATGCTAGT-3'). В состав ПЦР-смеси входили: 5 мкл 10xTaq-буфера (50 ммоль KCl, 10 ммоль трипл-НCl, 15 ммоль MgCl₂, 0,1% Triton X100); 1 мкл дНТФ («Fermentas», Литва); по 15 пмолов праймеров SeqSense HCV и SeqAntis HCV; 2,5 ед. Таq-полимеразы («Fermentas», Литва); 0,015 нг гибридной плазмиды pJC40/HCV1-190; денионизованной воды до конечного объема 50 мкл. Пробирки помещали в аппарат для амплификации («Corbett CG1-96», США) и проводили реакцию по следующей программе: 2 мин при 94°C — 1 цикл; 45 с при 94°C; 45 с при 45°C; 1 мин при 72°C — 25 циклов.

Анализ полученного фрагмента ДНК осуществляли гель-электрофорезом в 1,5% агарозном геле по общепринятой методике [3].

Очистку амплифицированного фрагмента ДНК проводили с использованием коммерческого набора «QIAquick Gel Extraction Kit» (Cat. № 28704, Qiagen) согласно прилагаемой инструкции.

Для проведения реакции термоциклического секвенирования применяли набор реагентов «GenomeLab DTS Quick Start Kit» («Beckman Coulter», США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Электрофорез и анализ продуктов реакции осуществляли на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе «SEQ 8000» («Beckman Coulter», США).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы MEGA 4.0 (Molecular evolutionary genetics analysis) [4].

Результаты и обсуждение

По данным литературы, в клетках млекопитающих экспрессируются три формы нуклеокапсидного белка ВГС: p21, включающий 191 аминокислотный остаток (а. о.) с молекулярной массой 21 кДа, p19 — 173 а. о. (19 кДа), p16 — 151 а. о. (16 кДа) [5]. Клонирование и экспрессия рекомбинантного полноразмерного нуклео-

44 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

капсидного полипептида с использованием сконструированной плазмиды pJC40/HCV1-190, включающей в качестве вставки последовательность Сore-гена ВГС, позволили получить рекомбинантный белок в прокариотических клетках *E. coli*, штамм BL21(DE3). Он представлен двумя формами с молекулярной массой 21 кДа и 16 кДа, обладающими выраженными антигенными свойствами. Получение двух форм белка может быть объяснено особенностями использованной экспрессирующей системы. Авторы некоторых исследований, связанных с клонированием и экспрессией рекомбинантных белков различной природы в бактериальных клетках *E. coli*, приводят данные о возникновении ряда проблем при трансляции гетерологичного белка [6—9]. Одна из них — присутствие в транслируемой последовательности кодонов аминокислот **Arg/AGG, AGA, CGA; Leu/CUA; Ile/AUA; Pro/CCC**, уровень частоты встречаемости которых в генах *E. coli* является критически низким, что, в свою очередь, ведет к возникновению ошибок при трансляции и преждевременной терминации белкового синтеза.

Для подтверждения наличия редко встречающихся кодонов в Сore-гене, клонированном в экспрессирующем векторе pJC40, осуществляли его секвенирование в составе гибридной плазмиды pJC40/HCV1-190. Для этого была подобрана и искусственно синтезирована пара праймеров (прямой — SeqSense HCV и обратный — SeqAntisense HCV), ограничивающая фрагмент плазмидной ДНК размером 760 пар оснований (рис. 1). Выделенный и очищенный полученный фрагмент из геля использовали как матрицу для реакции термоциклического секвенирования. После окончания реакции осуществляли выравнивание нуклеотидной последовательности, в качестве контрольной использо-

зовали последовательность D13558.1 из международной базы данных GenBank. В результате было выявлено, что клонированная в экспрессирующем векторе последовательность включала 24 нуклеотидные замены, при этом 6 из них приводили к замене 5 аминокислот.

Для поиска редко встречающихся кодонов в генах *E. coli* была использована электронная база данных «Codon-Usage Database», содержащая 3 027 973 полные кодирующие последовательности (CDS's) для 35 799 организмов [10]. В результате было установлено, что некоторые аминокислоты из состава нуклеокапсидного белка ВГС имеют низкий уровень частоты встречаемости в генах *E. coli* — менее 5 на 1000. Результаты секвенирования последовательности, встроенной в экспрессирующий вектор pJC40 и кодирующую нуклеокапсидный белок ВГС, позволили подтвердить наличие редко встречающихся в генах *E. coli* кодонов аминокислот **Arg/CGA, AGA, AGG; Leu/CUA** в последовательности Сore-гена, клонированного в экспрессирующий вектор. Для сравнения использовали референс-последовательности D13558.1 и AY522097.1, представленные в международной базе данных GenBank. Принимая во внимание тот факт, что присутствие в транслируемой последовательности кодонов аминокислот с низким уровнем частоты встречаемости может приводить к преждевременной терминации белкового синтеза, то для получения в дополнение к полноразмерному нуклеокапсидному белку (21 кДа) полипептида с молекулярной массой 16 кДа, терминация должна осуществляться в промежутке 140—150 а. о. нуклеокапсидного белка.

Как видно из рис. 2, в промежутке с 130 по 160 а. о. нуклеокапсидного белка ВГС присутствуют редко встречающиеся в *E. coli* кодоны аминокислот **Leu/CUA** — 144 а. о. и **Arg/AGG** — 149 а. о., **CGG** — 156 а. о. Если предположить, что терминация происходит по **Leu/CUA**, встречающемуся только в положении, соответствующем 144 а. о. из всей последовательности нуклеокапсидного белка ВГС, то в дополнение к полноразмерно-

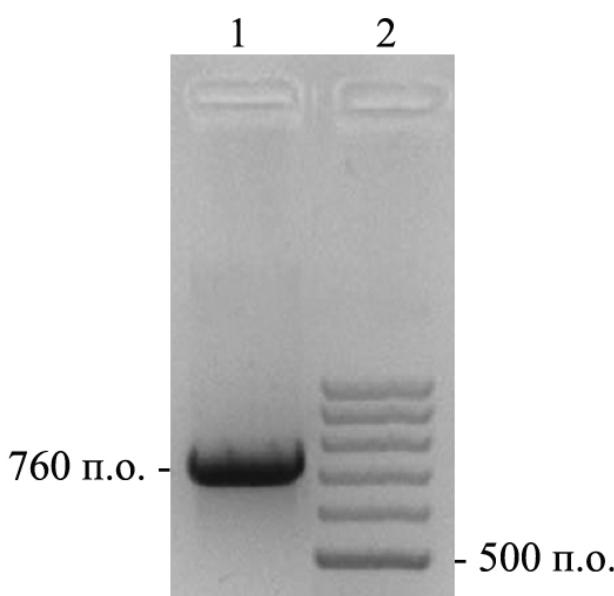


Рис. 1. Электрофоретический анализ в 1,5% агарозном геле амплифицированного фрагмента ДНК, включающего фрагмент плазмидной ДНК и последовательность, кодирующую нуклеокапсидный белок ВГС: 1 — амплифицированный фрагмент ДНК; 2 — ДНК-маркер GeneRuler 50bp DNA Ladder

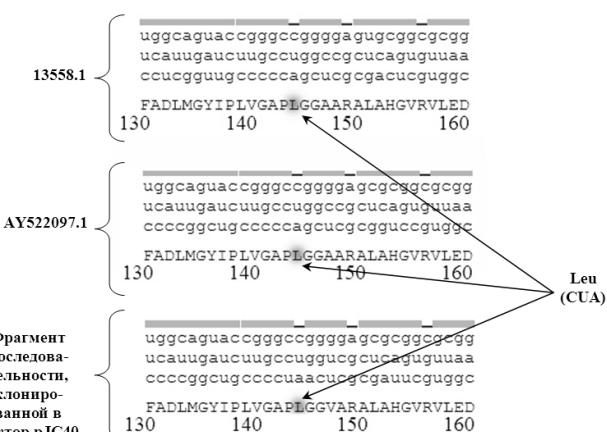


Рис. 2. Анализ фрагмента ДНК из последовательности, кодирующей нуклеокапсидный белок ВГС, и соответствующих аминокислот с 130 по 160 а. о.: стрелками указано расположение аминокислотного остатка Leu(CUA), по которому предположительно может осуществляться терминация белкового синтеза

му нуклеокапсидному белку (21 кДа) экспрессируется укороченный полипептид с молекулярной массой в пределах 16 кДа.

Высокая диагностическая роль нуклеокапсидного белка ВГС обусловливает всестороннее его изучение различными независимыми исследователями, в результате чего в последнее время появляется большое количество публикаций, в которых приводятся сведения о протеине F с молекулярной массой в пределах 16—17 кДа, синтез которого осуществляется одновременно с нуклеокапсидным белком, но с другой рамки считывания одного кодирующего участка [11—13]. Авторы этих исследований приводят данные о том, что образование полипротеина F/ARFP (англ. frameshift/alternative reading frame protein) является результатом сдвига рамки считывания в области 27—31 нуклеотидного основания, где находится участок, включающий 5 следующих подряд оснований аденина. До настоящего времени функциональная роль полипротеина F, отличного по структуре и свойствам от нуклеокапсидного белка ВГС, остается до конца невыясненной, а его синтез описывается для эукариотических экспрессирующих систем.

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что в последовательности Core-гена, кодирующей нуклеокапсидный белок ВГС, введенной в структуру плазмидного вектора pJC40, выявлено 24 нуклеотидные замены, 6 из них приводили к замене 5 аминокислот. Полученный в дополнение к полноразмерному (21 кДа) нуклеокапсидному белку продукт с молекулярной массой 16 кДа может являться результатом особенностей используемой экспрессирующей системы, ведущих к нарушению процессов трансляции и, как следствие, преждевременной терминации белкового синтеза. В то же время нельзя исключить тот факт, что полученный белковый продукт с молекулярной массой 16 кДа может иметь совершенно другую структуру и свойства, отличные от нуклеокапсидного белка ВГС. Обобщенные в работе данные свидетельствуют о недостаточной изученности нуклеокапсидного белка ВГС и особенностей процессов его экспрессии в различных клеточных системах. Это делает актуальным дальнейшее исследование полученных рекомбинантных полипептидов с помощью современных методов, в том числе и масс-спектрометрии, для более детального изучения их структуры и свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chiba J., Ohba H., Matsuura Y., et al. // Med. Sci.— 1991.— Vol. 80.— P. 4641—4645.
2. Семижон П. А., Фомина Е. Г., Школина Т. В. и др. // Мед. новости.— 2008.— № 10.— С. 66—68.
3. Маниатис Т. и др. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М., 1984.
4. Kumar S., Nei M., Dudley J., et al. // Bref. Bioinformatics.— 2008.— Vol. 9, № 4.— P. 299—306.
5. Lo S. Y., Selby M. J., Ou J. H. // J. Virol.— 1996.— Vol. 70, № 8.— P. 5177—5182.
6. Grosjean H., Fiers W. // Gene.— 1982.— Vol. 18.— P. 199—209.
7. Laine S., Thouard A., Komar A. A., et al. // Gene.— 2008.— Vol. 42.— P. 95—101.
8. Kane J. F. // Curr. Opin. Biotechnol.— 1995.— Vol. 6, № 5.— P. 494—500.
9. Acosta-Rivero N., Sanchez J.C., Morales J. // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 2002.— Vol. 296.— P. 1303—1309.
10. Nakamura Y. et al. // Nucl. Acids Res.— 2000.— Vol. 28.— P. 292.
11. Xu Z., Choi1 J., Benedict Yen T. S., et al. // EMBO.— 2001.— Vol. 20.— P. 3840—3848.
12. Branch A. D., Stump D. D., Gutierrez J. A., et al. // Semin. Liver Dis.— 2005.— Vol. 25, № 1.— P. 105—117.
13. Vassilaki N., Mavromara P. // IUBMB Life.— 2009.— Vol. 61, № 7.— P. 739—752.

CHARACTERISTIC FEATURES EXPRESSION AND NATURE OF HETEROLOGOUS RECOMBINANT NUCLEOCAPSID POLYPEPTIDE OF HEPATITIS C VIRUS

P. A. Semizhon, E. G. Fomina, E. P. Scheslenok, T. V. Shkolina, N. V. Poklonskaya, K. L. Dzidziulia, E. V. Barkovsky, A. S. Vladyko

Objective. To identify possible reasons of obtaining two protein forms in recombinant nucleocapsid protein expression in *E. coli* cells, strain BL21 (DE3).

Material and methods. Standard molecular-biological methods such as polymerase chain reaction (PCR), agarose gel electrophoresis, reaction of thermocyclic sequencing were used in the study.

Results. Twenty four nucleotide substitutions six of which led to five amino acids substitution were revealed in the Core gene sequence coding HCV nucleocapsid protein introduced into the pJC40 plasmid vector structure. The protein product having the molecular mass of 16 kDa obtained in addition to a full-size (21 kDa) nucleocapsid protein might be the result of the expressing system features leading to the translation process disruption and consequently to the protein synthesis premature termination. At the same time we cannot exclude that the protein product with the molecular mass of 16 kDa may be a protein having an absolutely different structure and properties distinct from the HCV nucleocapsid protein.

Conclusion. The data summarized in the article evidence that the HCV nucleocapsid protein and the processes of its expression in different cellular systems have been studied insufficiently thus making the recombinant polypeptides further study actual.

Key words: hepatitis C virus, recombinant polypeptides, protein expression.

46 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

Н. П. ШМЕЛЕВА, Н. В. ГРИБКОВА

ВЛИЯНИЕ АРПЕТОЛА НА РЕПРОДУКЦИЮ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА А(H1N1) И СЕЗОННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А И В В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК MDCK

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

Цель исследования. Изучение активности препарата «Арпетол» в отношении циркулирующих сезонных вирусов гриппа и пандемического вируса гриппа А(H1N1).

Материал и методы. Противогриппозную активность препарата оценивали путем титрования вирусов гриппа в 96-луночных панелях с монослоем культуры клеток MDCK в присутствии препарата и без внесения препарата. Исследования проводили по двум схемам: препарат вносили за 24 ч до инфицирования культуры клеток (профилактическая схема), а также непосредственно после инфицирования (лечебная схема).

Результаты. Арпетолоказал ингибирующее влияние на репродукцию всех исследованных штаммов вирусов гриппа А и В. Ингибирующий эффект препарата усиливается при увеличении концентрации препарата. Сравнительное изучение двух схем внесения препарата показало, что арпетол угнетает репродукцию вирусов гриппа как при внесении препарата по лечебной схеме, так и по профилактической. Ингибирующий эффект препарата при профилактическом применении был максимальным.

Заключение. Исследованный препарат «Арпетол» активен в нетоксических концентрациях в отношении сезонных вирусов гриппа А и В и штамма пандемического вируса гриппа А(H1N1) — 2009 и обладает выраженным ингибирующим влиянием при использовании по профилактической схеме.

Ключевые слова: вирус гриппа, противогриппозная активность, арпетол, лечение, профилактика.

В настоящее время грипп является глобальной проблемой. Появление и широкое распространение нового штамма вируса гриппа А(H1N1) стало основанием для объявления Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) пандемии гриппа—2009 [1]. Наиболее эффективным средством защиты от гриппа, согласно рекомендациям ВОЗ, является вакцинация. Однако известно, что для создания и производства вакцины необходимо не менее 3—6 мес. Поэтому во время первой волны пандемии гриппа основным средством для специфической защиты считаются химиотерапевтические противогриппозные препараты.

Ингибиторы M2 белка и нейраминидазы вируса гриппа являются основными группами противогриппозных препаратов, получивших международное признание. Однако развитие лекарственной устойчивости у вирусов гриппа обусловливает актуальность постоянного продолжения поиска специфических ингибиторов, блокирующих функциональную активность вируса на разных этапах репликативного цикла.

В последние годы получил распространение новый препарат — арбидола гидрохлорид, зарегистрированный в Республике Беларусь под торговым названием «Арпетол». Препарат влияет на ранние стадии вирус-

ной репродукции. Мишенью действия арбидола гидрохлорид является поверхностный белок вируса гриппа — гемагглютинин (НА). Препарат, взаимодействуя с НА, стабилизирует его пространственную структуру. Это приводит к угнетению процесса слияния оболочки вируса с мембранными эндосом и предотвращает проникновение вируса внутрь клетки [2, 3]. Вирусы гриппа, резистентные к препаратуре, получены только в культуре клеток после многократных пассажей в присутствии увеличивающихся концентраций препарата [3]. Помимо специфического действия на репродукцию вируса препарат обладает иммуностимулирующим эффектом, способностью индуцировать выработку эндогенного интерферона, антиоксидантной активностью [4]. Под влиянием арбидола гидрохлорида стимулируется также фагоцитарное звено иммунитета, обеспечивающее повышение устойчивости организма к инфекции [2]. Важным преимуществом препарата является его широкий спектр действия: показано ингибирующее влияние на репродукцию резистентных к ремантадину вирусов гриппа А человека, а также вирусов гриппа типа В [5, 6]. Ввиду разнообразия биологической активности арбидола гидрохлорид рекомендован в качестве лечебного и профилактического средства не только при гриппе А и В, но также при ОРВИ негриппозной этиологии [6, 7]. Иммуномодулирующая активность препарата делает его перспективным препаратом для применения у пациентов с вторичным иммунодефицитом.

Материал и методы

В работе использованы 25 эпидемических штаммов сезонных вирусов гриппа, в том числе 10 — гриппа А(H1N1): А/Гродно/161/08(H1N1), А/Гродно/163/08(H1N1), А/Гродно/108/08(H1N1), А/Минск/125/08(H1N1), А/Минск/124/08(H1N1), А/Минск/118/08(H1N1), А/Минск/179/08(H1N1), А/Минск/142/08(H1N1), А/Минск/156/08(H1N1), А/Минск/132/08(H1N1); 10 — гриппа А(H3N2): А/Минск/108/09(H3N2), А/Минск/134/09(H3N2), А/Минск/135/09(H3N2), А/Могилев/186/09(H3N2), А/Минск/25/09(H3N2), А/Гродно/103/09(H3N2), А/Минск/113/09(H3N2), А/Минск/127/09(H3N2), А/Минск/131/09(H3N2), А/Минск/127/09(H3N2); 5 — гриппа В: В/Минск/10/09, В/Минск/121/09, В/Минск/110/09, В/Минск/209/08, В/Минск/119/09) и 1 штамм пандемического вируса гриппа А(H1N1)-2009: А/Осиповичи/30/09(H1N1-p). Вирусы культивировали в культуре клеток MDCK в среде ДМЕМ, содержащей 2 мкг/мл ТРСК-трипсина («Sigma», США).

Препарат «Арпетол» в виде химической субстанции арбидола гидрохлорид представлен для исследования СОО «Лекфарм». Цитотокическое действие и противогриппозную активность препарата изучали на 96-луночных панелях фирмы «Sarsted» со сформированным монослоем культуры клеток MDCK, выращенной с добавлением 7—10% эмбриональной бычьей сыворотки («Sigma», США).

Цитотокическое действие препарата оценивали визуально по состоянию клеточного монослоя. За максимально переносимую концентрацию (МПК) принимали

1/2 дозы препарата, которая не оказывала цитотоксического действия после инкубации в течение 72 ч [8].

Противовирусный эффект оценивали по снижению инфекционного титра вируса в присутствии препарата по сравнению с контролем. Разведения препарата и вирусов для проведения исследования готовили на среде ДМЕМ, содержащей 2 мкг/мл ТРСК-трипсина («Sigma», США). Препарат в концентрациях 5, 10 и 20 мкг/мл вносили на клеточный монослой по двум схемам: за 24 ч до инфицирования культуры клеток и непосредственно после инфицирования. Цитопатогенное действие вируса определяли с помощью инвертированного микроскопа «Nikon» (Япония) через 72 ч инкубирования в термостате зараженного монослоя с 5% CO₂ при 37°C. Инфекционный титр вирусов рассчитывали по методу Рида и Менча [9].

За минимально активную концентрацию (МАК) принимали концентрацию препарата, в присутствии которой инфекционный титр вируса снижался не менее чем на 1,25 Ig ТЦИД50/0,2 мл по сравнению с контролем [8].

Результаты и обсуждение

Согласно проведенным ранее исследованиям, в Республике Беларусь, как и в мире в целом, выявлено распространение вирусов гриппа А, резистентных к ингибиторам M2 белка (ремантадин) и нейраминидазы (озелтамивир) [10—13]. В этой связи изучение активности препарата «Арпетол» в отношении циркулирующих сезонных вирусов гриппа и пандемического вируса гриппа А(H1N1) представляло определенный интерес.

Изучение цитотоксического действия арпетола при добавлении в культуру клеток MDCK в концентрациях 80, 40, 20, 10, 5 мкг/мл на протяжении 72 ч (период наблюдения) выявило цитотоксический эффект (на 4+ при оценке по 4-крестной системе) в концентрации 80 мкг/мл, в концентрации 40 мкг/мл — цитотоксический эффект препарата незначительный (+/2+ по 4-крестной системе оценки). При добавлении препарата в концентрациях 20 мкг/мл и ниже цитотоксический эффект отсутствовал. Таким образом, МПК препарата составила 20 мкг/мл.

При изучении действия различных концентраций арпетола на репродукцию вирусов гриппа было установлено, что препарат оказывал ингибирующее влияние на репродукцию всех исследованных штаммов вирусов гриппа А и В. Ингибирующий эффект препарата усиливался при увеличении концентрации препарата.

Сравнительное изучение двух схем внесения препарата показало, что арпетол угнетает репродукцию вирусов гриппа как при внесении препарата непосредственно после инфицирования культуры клеток вирусом гриппа (лечебная схема), так и при предварительной обработке культуры клеток (профилактическая схема). Причем при профилактическом применении ингибирующий эффект препарата был максимальным. Так, из 10 изученных штаммов вируса гриппа А(H3N2) 3 штамма — А/Гродно/103/09, А/Минск/113/09 и А/Минск/131/09 — проявили наиболее высокую чувствительность к препарату. МАК для данных штаммов состави-

ла 5 мкг/мл. Для 7 из 10 изученных штаммов вируса гриппа субтипа А(H3N2) МАК составила 10 мкг/мл.

Штаммы вируса гриппа А(H1N1) в зависимости от величины МАК распределились следующим образом: для штамма А/Минск/124/08 МАК составила 5 мкг/мл, для 5 из 10 изученных штаммов — 10 мкг/мл, для 2 штаммов МАК составила 20 мкг/мл. Ингибирование арпетолом репродукции штаммов А/Минск/142/09 и А/Минск/156/09 составило менее 1 Ig ТЦИД50.

Изучение действия арпетола на репродукцию вирусов гриппа В показало, что изученные штаммы вируса гриппа данного типа чувствительны к действию препарата. При профилактической схеме применения арпетол в концентрации 10 мкг/мл вызывал снижение инфекционных титров на 1,25—2,3 Ig ТЦИД50. При внесении препарата после инфицирования монослоя культуры МАК для штамма В/Минск/209/08 составила 10 мкг/мл, для штаммов В/Минск/10/09, В/Минск/110/09 и В/Минск/119/09 — 20 мкг/мл. Ингибирование арпетолом репродукции штамма В/Минск/121/09 составило менее 1 Ig ТЦИД50.

Таким образом, изучение влияния арпетола на репродукцию сезонных вирусов гриппа показало эффективность данного препарата в отношении как вирусов гриппа А, так и вирусов гриппа В. Появление нового вируса гриппа А(H1N1), вызвавшего пандемию 2009 г., диктует необходимость определения чувствительности пандемического штамма к существующим противогриппозным препаратам. Согласно данным ВОЗ, устойчивость штаммов пандемического вируса к ремантадину близка к 100%. В то же время в мире выявлены единичные резистентные к озелтамивиру пандемические штаммы, что указывает на несомненную эффективность препарата. Однако появление штаммов вирусов гриппа, устойчивых к применяющимся химиопрепаратам, является постоянным стимулом для поиска новых противогриппозных препаратов, действующих на различных этапах репродукции вируса. В этой связи представляет практический интерес изучение эффективности отечественного препарата «Арпетол» в отношении пандемического вируса гриппа. Изучено влияние арпетола на репродукцию штамма вируса гриппа А/Осиповичи/30/09 (H1N1-p), выделенного от больного, у которого инфицирование пандемическим вирусом гриппа подтверждено методом ПЦР в режиме реального времени (рис. 1).

Проведенные исследования показали, что арпетол обладает ингибирующим влиянием на репродукцию штамма пандемического вируса гриппа, причем более выраженное действие препарата наблюдается при профилактической схеме использования. Увеличение концентрации препарата приводит к более выраженному ингибирующему влиянию (рис. 2).

Согласно фармакокинетическим исследованиям, однократная терапевтическая доза арбидола гидрохлорида составляет 200 мг, а токсикологические исследования показали хорошую переносимость и безопасность при однократном применении препарата в дозе 1000 мг [14]. Следовательно, возможно увеличение

48 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

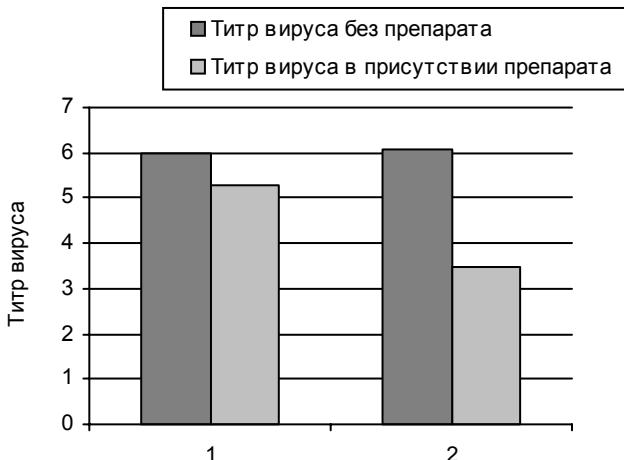


Рис. 1. Влияние арпетола в концентрации 10 мкг/мл на репродукцию пандемического штамма вируса гриппа А/Осиовичи/30/09 (H1N1-p): 1 — титры вируса при одновременном внесении вируса и препарата; 2 — титры вируса при предобработке культуры клеток препаратом в течение 24 ч

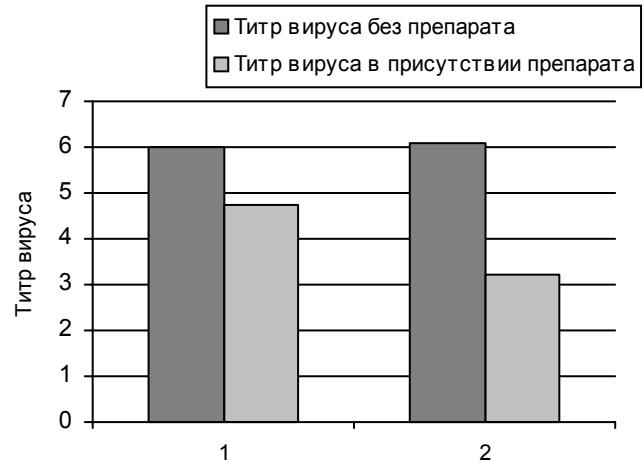


Рис. 2. Влияние арпетола в концентрации 20 мкг/мл на репродукцию пандемического штамма вируса гриппа А/Осиовичи/30/09 (H1N1-p): 1 — титры вируса при одновременном внесении вируса и препарата; 2 — титры вируса при предобработке культуры клеток препаратом в течение 24 ч

дозы препарата для усиления противовирусного действия. Кроме того, арбидола гидрохлорид, в отличие от ингибиторов нейраминидазы, проникает через гематоэнцефалический барьер, что делает возможным применение препарата при явлениях нейротоксикоза, которые могут наблюдаться при тяжелом течении гриппа [14]. Отсутствие тератогенного и эмбриотоксического действия позволяет использовать препарат для лечения и профилактики гриппа у беременных [15]. Поскольку препарат влияет на ранние стадии репродукции вирусов гриппа, лечение должно быть начато в первые дни заболевания.

В заключение следует отметить, что изучение чувствительности/резистентности циркулирующих вирусов гриппа к противогриппозным препаратам имеет важное практическое значение, является обязательным условием адекватной химиотерапии и химиопрофилактики гриппа, а также позволяет снизить вред здоровью, наносимый ежегодными эпидемиями.

ЛИТЕРАТУРА

1. ВОЗ // http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/phase_ru/index.html
2. Глушков Р. Г., Фадеева Н. И., Ленева И. А. и др. // Хим.-фармацевт. журн.— 1992.— № 2.— С. 8—15.
3. Leneva I., Hay A. // 12th International Congress of Virology.— Paris, 2002.— Abst. 1077.
4. Глушков Р. Г., Гуськова Т. А., Крылова Л. Ю., Николаева И. С. // Вестн. РАМН.— 1999.— № 3.— С. 36—39.
5. Ленева И. А., Фадеева Н. И., Федякина И. Т. // Хим.-фармацевт. журн.— 1994.— № 9.— С. 4—8.
6. Ленева И. А. // Рос. мед. журн.— 2005.— Т. 13, № 1.— С. 72—75.
7. Ленева И. А., Соколова М. Б., Федякина И. Т. и др. // Вопр. вирусологии.— 2002.— № 2.— С. 42—45.

8. Первичное изучение антивирусных свойств синтетических и природных соединений: Метод. рекомендации.— Минск, 1986.

9. Шубладзе А. К., Гайдамович С. Я. Краткий курс практической вирусологии.— М., 1954.— С. 66—69.

10. Шмелева Н. П., Грибкова Н. В., Язышина С. Б., Миненко А. Н. // Военная медицина.— 2008.— № 4.— С. 95—98.

11. Шмелева Н. П., Грибкова Н. В., Сорокин С. Б. и др. // Современные проблемы инфекционной патологии человека: Сб. науч. трудов / Под ред. Л. П. Титова и др.— Минск, 2008.— С. 58—60.

12. WHO: http://www.who.int/csr/disease/influenza/oseltamivir_summary/en_index.html

13. CDC // MMWR.— 2006.— Vol. 55.— P. 44—46.

14. Ленева И. А., Шустер А. М. // Вопр. вирусологии.— 2006.— № 5.— С. 4—7.

15. Ленева И. А., Глушков Р. Г., Гуськова Т. А. // Хим.-фармацевт. журн.— 2004.— Т. 38, № 11.— С. 8—14.

EFFECT OF ARPETOL ON PANDEMIC INFLUENZA A(H1N1) VIRUS AND ON SEASONAL INFLUENZA A AND B VIRUSES REPRODUCTION IN MDCK CELL CULTURE

N. P. Shmelyova, N. V. Gribkova

Objective. To study the Arpetol efficiency for circulating seasonal influenza viruses and for pandemic influenza A(H1N1) virus.

Material and methods. The preparation anti-influenza activity was assessed in titrating the influenza viruses in 96 hole panels with MDCK cell culture single layers both in the preparation presence and in the preparation absence. Two schemes were used: the preparation was introduced 24 hours before the cell culture infecting (prophylaxis scheme) and immediately after infection (treatment scheme).

Results. Arpetol was shown to inhibit reproduction of influenza viruses A and B each strain. The inhibiting effect increased the preparation concentration was larger. The two schemes comparison showed that Arpetol suppressed the influenza viruses suppression in both cases — when the preparation was introduced in accordance with treatment scheme and in accordance with the prophylaxis scheme. In case of applying the prophylaxis scheme the preparation inhibiting effect was the maximal one.

Conclusion. The studied preparation Arpetol is active when administered in non-toxic concentrations for seasonal influenza A and B viruses and for pandemic influenza virus A(H1N1)-2009 and has a marked inhibiting action when administered in accordance with the prophylaxis scheme.

Key words: Influenza virus, antiinfluenza activity, Arpetol, treatment, prophylaxis.

Е. П. СЧЕСЛЕНOK, Т. В. ШКОЛИНА, Г. А. КЛАВСТЬ,
А. Л. ЛЕШКЕВИЧ, А. В. ЧАЙКА, Н. В. ВИНОКУРОВА,
А. Г. КРАСЬКО, Ф. М. ФИДАРОВ, Е. М. АРТЕМЕНКОВА,
А. С. ВЛАДЫКО

СПОРАДИЧЕСКИЕ СЛУЧАИ ЗАБОЛЕВАНИЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В МОГИЛЕВСКОЙ ОБЛАСТИ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь, Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья Минздрава Республики Беларусь, Могилевский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья

Цель исследования. Анализ спорадических случаев заболевания геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС) в Могилеве и Могилевской области.

Материал и методы. Исследовали клинические пробы сыворотки крови от больных ГЛПС с использованием непрямого метода иммунофлюoresценции, метод иммунного блоттинга.

Результаты. В январе—апреле 2010 г. в Могилеве и Могилевской области зарегистрировано 10 случаев заболевания ГЛПС, что в 5 раз больше, чем в 2009 г., когда было выявлено 2 случая данного заболевания. В настоящее время в Могилевской области установлено 87 природных очагов ГЛПС.

Заключение. Учитывая, что в Республике Беларусь отмечается естественный рост количества грызунов, потепление климата, а также близость к регионам Российской Федерации с относительно высоким уровнем заболеваемости ГЛПС, необходимо активизировать мониторинг природных очагов ГЛПС и проводить своевременный анализ эпидемической и эпизоотической ситуации по данной инфекции.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, заболеваемость, природные очаги, метод флюoresцирующих антител, иммуноблоттинг.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — острая вирусная природно-очаговая зоонозная инфекция человека, характеризующаяся интоксикацией, лихорадкой, почечными и геморрагическими проявлениями. Природные очаги ГЛПС выявлены в различных районах земного шара. ГЛПС занимает ведущее место в Европе и Азии среди регистрируемых случаев природно-очаговых инфекций. Возбудители ГЛПС относятся к роду *Hantavirus* семейства *Bunyaviridae*. В различных регионах мира в настоящее время циркулирует 8 серотипов хантавирусов: *Hantaan*; *Seoul*, *Puumala*, *Prospect Hill*, *Leaky*, *Thottapalayam*, *Dobrava-Belgrade*, *Maaji*. Наиболее значимыми в этиологии заболеваний человека являются четыре основных ГЛПС-ассоциированных хантавируса, вызывающих у человека заболевание различной тяжести: вирусы Хантаан и Добрава/Белград, вызывающие тяжелую форму ГЛПС с летальностью 5—35%; вирус Сеул, вызывающий заболевание средней тяжести с летальностью 2—5%; вирус Пuumала, являющийся этиологическим агентом эпидемической нефропатии и вызывающий легкую форму ГЛПС с летальностью 0,3—1,0% [1—3]. Вирус Пuumала циркулирует в Скандинавских

странах, Западной России, Балканском регионе, а также в некоторых странах Центральной Европы, включая Республику Беларусь. Ежегодно в республике регистрируются единичные случаи заболевания ГЛПС. В Республике Беларусь с начала официальной регистрации (с 1991 г. по апрель 2010 г.) зарегистрировано 59 случаев инфекции (отмечались летальные исходы). Основным природным резервуаром вируса ГЛПС являются мышевидные грызуны, с особенностями жизнедеятельности которых связывают сезонность заболевания. При постановке диагноза ГЛПС учитывается пребывание человека в лесистой местности (работа на нефтепромыслах, отдых на турбазах, охотничьи или рыбакские базы) либо работа или проживание в жилищах, расположенных на близком расстоянии (25—100 м) от леса или кустарника [4]. В сложившейся практике основанием для постановки диагноза ГЛПС является сочетание картины острого лихорадочного заболевания с признаками нарастающей острой почечной недостаточности и обязательное лабораторное подтверждение предварительного диагноза. За период с января по апрель 2010 г. зарегистрировано 10 случаев заболевания ГЛПС, что составляет 0,1 на 100 тыс. населения республики. Все случаи заболевания ГЛПС отмечены в Могилевской области.

Целью настоящей работы являлся анализ спорадических случаев заболевания ГЛПС в Могилеве и в Могилевской области.

М а т е р и а л и м е т о д ы

Исследовали клинические пробы — сыворотки крови от больных ГЛПС, полученные из нефрологических отделений Могилевской инфекционной больницы и Могилевской областной больницы.

Для серологического подтверждения диагноза исследовали парные сыворотки крови от больных с помощью непрямого метода иммунофлюoresценции (МФА), применяя коммерческий культуральный поливалентный диагностик ГЛПС для непрямого МФА (Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН, Россия).

Метод иммунного блоттинга использовали для подтверждения результатов серологического исследования проб сывороток от больных с подозрением на ГЛПС, полученных методом МФА. Для постановки иммуноблоттинга электроперенос белков, разделенных в 15% поликариламидном геле, на нитроцеллюлозную мембрану («Sigma») с размером пор 0,2 мкм осуществляли полу-сухим способом в течение 1 ч при силе тока 150 мА. Полоски нитроцеллюлозной мембранны с иммобилизованными белками (стрипами) выдерживали 2 ч в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) с pH 7,4, содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), для блокирования неспецифических мест связывания. Затем инкубировали с первичными антителами и со специфическими антителами, разведенными в 100 раз ФСБ, содержащим 0,05% твин-20 и 1% БСА (ФСБ-Т-БСА), в течение 2 ч при постоянном покачивании. После чего

50 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

отмывали стрипы буфером ФСБ, содержащим 0,05% твин-20 (ФСБ-Т), 3 раза по 5 мин, и погружали в раствор антивидового пероксидазного конъюгата, приготовленного на ФСБ-Т-БСА, на 1 ч. После отмычки 2 раза раствором ФСБ-Т и один раз — ФСБ стрипы помещали в раствор субстрата, в качестве которого использовали диаминонензидин, растворенный в ФСБ (рН 7,4), содержащем 0,3% перекись водорода. После развития окраски реакцию останавливали, отмывая стрипы трижды дистиллированной водой.

Результаты и обсуждение

В 2009 г. в Могилевской области было официально зарегистрировано 2 случая заболевания ГЛПС. Показатель заболеваемости составил 0,18 на 100 тыс. населения республики. За январь—апрель 2010 г. показатель заболеваемости ГЛПС для области увеличился и составил уже 0,89 на 100 тыс. населения, что является достаточно высоким даже по сравнению со средним показателем заболеваемости ГЛПС для Российской Федерации — 0,57. Возросшая заболеваемость ГЛПС в Могилевской области свидетельствует об активизации природных очагов хантавирусной инфекции, что может быть связано с увеличением численности и пораженности мышевидных грызунов возбудителем ГЛПС: численность мышевидных грызунов в 2009 г. по сравнению с 2008 г. увеличилась на 17%, а пораженность мышевидных грызунов ГЛПС составила 1,6%, то есть в 2 раза выше по сравнению с 2008 г. (0,8%). Имеет значение и тот факт, что на сопредельных с Могилевской областью территориях Российской Федерации заболеваемость ГЛПС регистрируется ежегодно. По официальной статистике в Брянской области в 2007 г. зарегистрировано 47 случаев заболевания, в 2008 г. — 35; в Смоленской области: в 2007 г. — 16 случаев ГЛПС, в 2008 г. — 9, в 2009 г. — 11.

Шестеро заболевших ГЛПС были жители Могилева, трое — Могилевского района, один пациент был из Мстиславского района Могилевской области. Все заболевшие госпитализированы в лечебные учреждения с признаками лихорадочного состояния и нарастающей острой почечной недостаточности. На основании эпидемиологического анализа и клиничес-

ких данных всем заболевшим выставлен предварительный диагноз ГЛПС. Во всех случаях заболевания проведен лабораторный анализ проб сывороток крови с целью подтверждения диагноза. Лабораторная диагностика клинических проб проводилась специалистами лаборатории Могилевского областного центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья. Анализ сывороток крови от больных ГЛПС (забор проб производили на 5—14-й день от начала заболевания) проводили с использованием коммерческого диагностикума «Культуральный поливалентный диагностикум ГЛПС для непрямого МФА» непрямым методом флюoresцирующих антител по общепринятой методике. Во всех тестируемых сыворотках было подтверждено наличие специфических антител к вирусу ГЛПС. Для большинства проб сывороток крови при исследовании парных сывороток показано диагностическое нарастание титра антител в повторной пробе. Таким образом, во всех случаях заболевания ГЛПС предварительный диагноз был подтвержден серологически. На рис. 1 представлен результат анализа сыворотки крови от больного К. методом флюoresцирующих антител.

С целью подтверждения результатов серологического исследования проб сывороток крови от больных ГЛПС, полученных в МФА, пробы сывороток крови от семи больных (К., П., Т., Г., А., М. и Ф.) были исследованы на наличие специфических антител методом иммуноблоттинга. Рекомбинантный полипептид, представляющий N-концевую часть нуклеокапсидного белка вируса ГЛПС, серотип Пуумала, с молекуллярной массой 17 kDa, использовали в качестве специфического антигена, иммобилизованного на нитроцеллюлозную мембрану [5]. При постановке эксперимента в качестве положительной контрольной сыворотки (K^+) использовали референс-сыворотку, содержащую антитела класса M и G к вирусу ГЛПС (Пуумала). Референс-сыворотка получена в Центре Минздрава России по борьбе с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом. В качестве отрицательного контроля (K^-) применяли сыворотку крови человека, не содержащую антител к вирусу ГЛПС. В результате исследований во всех анализируемых пробах под-

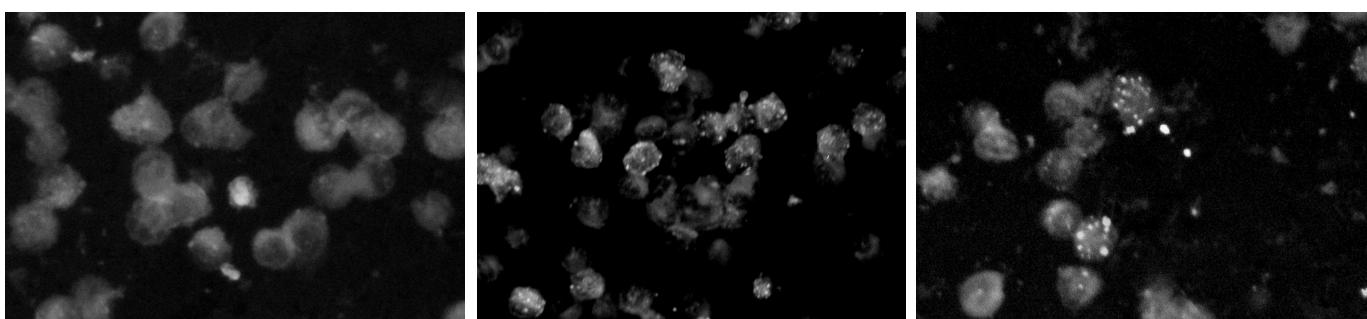


Рис.1 Исследование сыворотки крови больного К. на наличие специфических антител к вирусу ГЛПС непрямым методом флюoresцирующих антител: а — инфицированные вирусом ГЛПС клетки, обработанные отрицательным контролем (K^-); б — инфицированные вирусом ГЛПС клетки, обработанные положительным контролем (K^+); в — инфицированные вирусом ГЛПС клетки, обработанные исследуемой сывороткой крови больного

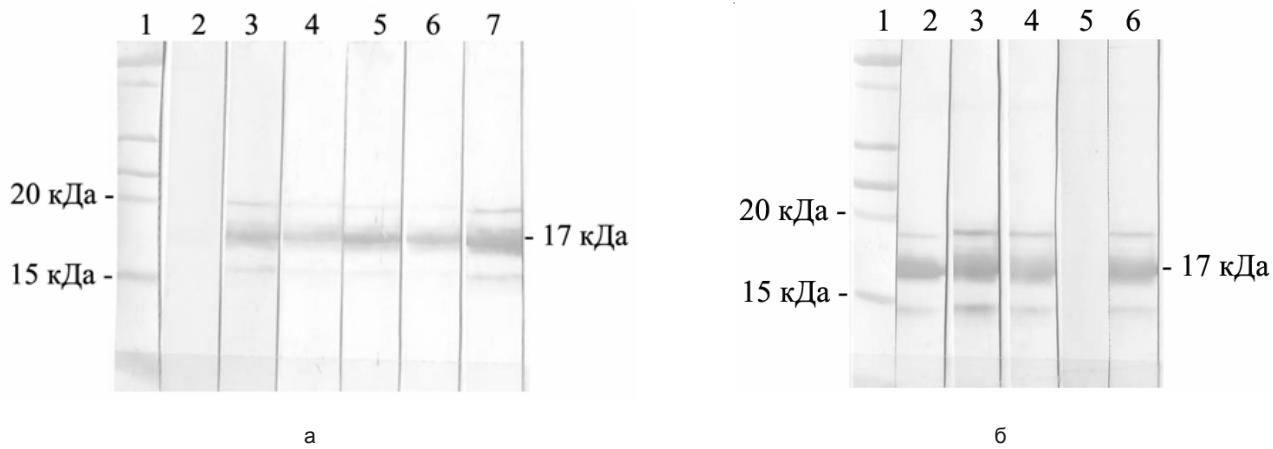


Рис. 2. Анализ сывороток крови от больных ГЛПС методом иммуноблоттинга: а) 1 — маркерные белки (Fermentas); 2 — антиген ГЛПС, обработанный сывороткой К⁺; 3 — антиген ГЛПС, обработанный референс-сывороткой (К⁺); 4, 5, 6, 7 — антиген ГЛПС, обработанный сыворотками крови от больных ГЛПС (К., П., Т., Г.); б) 1 — маркерные белки (Fermentas); 2, 3, 4 — антиген ГЛПС, обработанный сыворотками крови от больных ГЛПС (А., М. и Ф.); 5, 6 — антиген ГЛПС, обработанный сыворотками К⁺ и К⁺ соответственно

тврждено наличие специфических антител к вирусу ГЛПС (рис. 2).

Таким образом, все 10 случаев заболевания ГЛПС в Могилеве и Могилевской области были подтверждены лабораторно 2 методами исследования и представлены для официальной регистрации в Республике Беларусь. Результаты эпидемиологического расследования показали, что все случаи заболевания были спорадическими: не связанными между собой по месту инфицирования и времени заболевания.

В настоящее время на территории Могилевской области зарегистрировано 87 природных очагов ГЛПС, причем в 2009 г. выявлены новые для области природные очаги ГЛПС, наибольшее количество которых установлено в Могилевском районе.

Учитывая то, что в Республике Беларусь отмечается естественный рост количества мышевидных грызунов, потепление климата, достаточно высокая занятость населения на сельскохозяйственных работах (садово-дачные участки, шефская помощь сельским предприятиям), а также нахождение территории Республики Беларусь в непосредственной близости к регионам Российской Федерации с относительно высоким уровнем заболеваемости ГЛПС, необходимо активизировать работу по мониторингу природных очагов ГЛПС и проводить своевременный анализ эпидемической и эпизоотической ситуации по данной инфекции в каждом регионе республики.

ЛИТЕРАТУРА

- Lee P. W., Gibbs C. J., Jr. Gaudusek D. S., Yanagihara R. // *Clin. Microbiol.* — 1989. — Vol. 22. — P. 940—944.
- Сиротин Б. З., Клебанов Ю. А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. — М., 1987.
- Plusnin A., Vapalahti O., Vaheri A. // *J. Virol.* — 1996. — Vol. 77. — P. 2677—2687.
- Суздальцев А. А., Морозов В. Г., Роцупкин В. И. // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2003. — № 4. — С. 52—54.
- Счесленок Е. П., Владыко А. С., Фомина Е. Г. и др. // Здравоохранение. — 2006. — № 11. — С. 29—32.

SPORADIC CASES OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME IN MOGILYOV AND MOGILYOV REGION

E. P. Scheslenok, T. V. Shkolina, G. A. Klavsuit, A. L. Leshkevich, A. V. Tchaika, N. V. Vinokurova, A. G. Krasko, F. M. Fidarov, E. M. Artemenкова, A. S. Vladyko

Objective. Analysis of sporadic cases of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Mogilyov and Mogilyov region.

Material and methods. The serum clinical samples taken from patients with HFRS were studied applying the indirect method of immune fluorescence assay, the immune blotting method.

Results. In January—April 2010 ten cases of HFRS were registered in Mogilyov and Mogilyov region being 5 times more than in 2009 when only two cases of the disease were revealed. By nowadays 87 natural foci of HFRS had been stated in Mogilyov region.

Conclusion. Taking into consideration the rodent number natural growth in the Republic of Belarus, the climate becoming warmer as well as the Republic situation close to the regions of the Russian Federation known as having a relatively high HFRS rate it is necessary to activate the natural foci of HFRS monitoring and to perform timely epidemic and epizootic situation analysis for that infection.

Key words: hemorrhagic fever with renal syndrome, morbidity, natural foci, immune fluorescence assay, immune blotting.

Л. П. ТИТОВ, А. Е. ГОНЧАРОВ, Л. А. ПУТЫРСКИЙ,
С. В. КОШЕЛЕВ, М. И. КОШЕЛЕВА, Ю. Л. ПУТЫРСКИЙ

ИММУНОФЕНОТИП И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МОНОЦИТАРНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава
Республики Беларусь, РНПЦ онкологии и медицинской
радиологии им. Н. Н. Александрова

Цель исследования. Исследование иммунофенотипа и функциональных свойств моноцитарных дендритных клеток у больных раком молочной железы.

Материал и методы. Исследование представляет собой серию экспериментов *in vitro*. Были взяты образцы периферической крови доноров и больных раком молочной железы II стадии. Объектом исследования стали моноцитарные дендритные клетки (мДК), которые выделяли методом адгезии. Изучали их фенотип, определяли способность дендритных клеток больных РМЖ к созреванию, оценивали их влияние на пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов и продукцию внутриклеточных цитокинов ИЛ-4 и ИНФ- γ .

Результаты. Данные, полученные в ходе проведенных исследований, свидетельствуют о нарушении процессов дифференциации моноцитов в дендритные клетки под действием цитокинов у больных РМЖ. Изучая влияние различных индукторов созревания, установили, что использование комбинации α -ФНО и дб-цАМФ у больных РМЖ дает возможность получить более 90% зрелых дендритных клеток.

Заключение. Способ индукции созревания мДК больных РМЖ с использованием комбинации α -ФНО и дб-цАМФ адаптирован к клинической практике.

Ключевые слова: рак молочной железы, дендритные клетки.

В последние два десятилетия отмечен значительный рост заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) в Беларуси и в большинстве развитых стран мира. РМЖ занимает первое место в структуре причин заболеваемости и смертности женщин от злокачественных опухолей. За 15 лет достигнуты успехи в исследовании молекулярно-клеточных механизмов развития онкологических заболеваний и их иммунологии, в том числе РМЖ. Установлена взаимосвязь возникновения опухолей молочной железы и выраженных нарушений иммунной системы. Эти данные, равно как и сведения о более благоприятном течении заболевания при сохраненном иммунном ответе, побуждают многих исследователей к дальнейшему изучению клеточных и молекулярно-генетических особенностей состояния иммунной системы и к разработке более эффективных способов диагностики и лечения больных РМЖ с использованием иммунотерапии.

Известно, что антигенпредставляющие клетки (АПК) — макрофаги и дендритные клетки (ДК) — являются важнейшим звеном противоопухолевого иммунитета. Они выполняют эффекторные и регуляторные функции, оказывают прямую цитотоксичность в активированном состоянии, антителозависимую цитотоксичность, отвечают за секрецию цитокинов (ИЛ-1, ФНО), процессинг и презентацию опухолеспецифичных антигенов клонам Т-лимфоцитов [1].

Исследования в области использования ДК в клинической практике как еще одного инструмента в лечении злокачественных новообразований с целью обеспечения противоцедивного эффекта проводят во многих онкологических центрах мира. Применение аутологичных ДК совместно с антигенами опухоли в качестве мощного эндогенного адьюванта оценено при различных формах рака и считается перспективным направлением современной иммуноонкологии [2—4]. Ожидается, что специфическая клеточная иммунотерапия может стать частью комплексного лечения при злокачественных новообразованиях. Разработка и внедрение в онкологическую практику метода аутоиммунотерапии с использованием праймированных антигенами опухоли ДК предполагает стимулирование опухоле-специфического иммунного ответа Т-лимфоцитов с последующей элиминацией рассеянных в организме больного атипичных клеток после проведения основных методов лечения. Целью настоящего исследования явилось изучение фенотипа и функциональных свойств ДК больных раком молочной железы.

Материал и методы

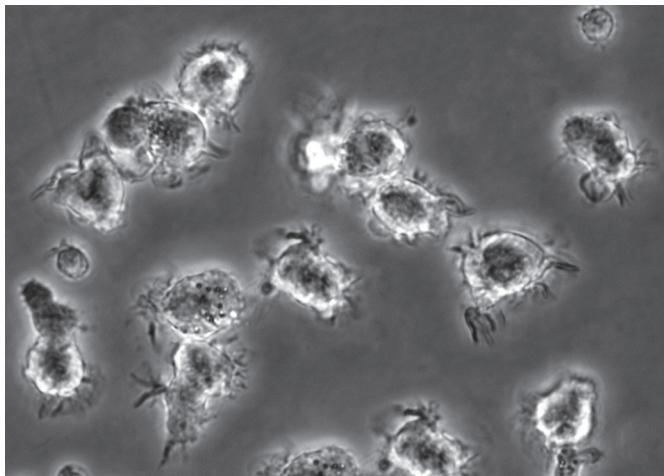
Исследование выполнено в серии экспериментов *in vitro*, в которых использовано 12 образцов периферической крови доноров (РНПЦ гематологии и трансфузиологии) и 12 образцов крови больных РМЖ II стадии. Исключали пациентов с сопутствующей ВИЧ-инфекцией, аутоиммунными заболеваниями в период обострения.

Объект исследования — моноцитарные ДК (мДК) больных РМЖ и доноров.

Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли центрифугированием крови на градиенте плотности фиколл-пака 1077 г/л («Amersham») с последующей отмычкой фосфатным буфером. Клетки помещали в полную питательную среду, состоящую из RPMI-1640 с телячьей эмбриональной термоинактивированной сывороткой (10%), 20 ммоль НЕРС, L-глутамином, пируватом натрия (все реагенты производства «Sigma-Aldrich», США) и доводили концентрацию клеток до 5·10⁶/мл.

Моноциты крови выделяли методом адгезии [5]. Их культивировали в полной питательной среде, содержащей рекомбинантные человеческие цитокины: 50 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колонистимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и 25 нг/мл интерлейкина-4 (ИЛ-4). Клетки инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 3 сут. На 4-е сутки вносили дополнительно в каждую лунку среду с цитокинами в той же концентрации. На 7-е сутки снимали свободные и слабо прикрепленные клетки [6—8]. При фазово-контрастной микроскопии незрелых ДК на 6-е сутки культивирования визуализируются в виде звездчатых клеточных форм с характерными цитоплазматическими отростками разной длины (рис.).

Для получения зрелых ДК в лунку с незрелыми ДК добавляли 25 нг/мл ГМ-КСФ, 12,5 нг/мл ИЛ-4 и индуктор созревания — α -фактор некроза опухолей (α -ФНО) (50 нг/мл) и дигидроцистеин-циАМФ (дб-циАМФ) (10⁻⁶М). Клетки инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с



Микрофотография первичных культур мДК.
6 суток культивирования, фазовый контраст. Ув. 400

5% CO₂ в течение суток, затем собирали, замораживали супернатанты и исследовали фенотип зрелых ДК.

Смешанная культура клеток. Для изучения влияния мДК на продукцию ИЛ-4 и ИНФ-γ аллогенными Т-лимфоцитами, аллогенные лимфоциты культивировали со зрелыми мДК в соотношении 1:20 в 1 мл питательной среды на протяжении 72 ч. По истечении 3 сут среду меняли на новую, содержащую активаторы (форбол-12-миристат-13-ацетат 25 нг/мл и иономицин 1 мкг/мл), и культивировали 48 ч. В последние 6 ч культивирования добавляли в среду БРДУ, монензин, иономицин и ФМА. По истечении времени культивирования определяли относительное число лимфоцитов, содержащих внутриклеточно цитокины, и пролиферацию клеток с использованием антител к БРДУ.

Поверхностные молекулы ДК, внутриклеточные цитокины лимфоцитов определяли по общепринятой методике с помощью моноклональных антител к антигенам человека: CD14, CD80, БРДУ, rat IgG2a («Becton Dickinson», США); CD1a, CD86, CD40, CD83, ИЛ-4, ИНФ-γ, mouse IgG1 и HLA-DR («Beckman-Coulter», США); ИЛ-2, α-ФНО («Sigma», США). Учет проводили на проточном цитофлюориметре «FACSCalibur» («Becton Dickinson», США) с использованием программного обеспечения «CellQuest».

Для статистической обработки полученных данных применяли программное обеспечение STATISTICA 8.0 («StatSoft», США) и StatPlus 4.9 («AnalystSoft», Канада). Значения показателей представлены в виде Me (25 — 75), где Me — медиана, а 25 и 75 — интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Для сравнения выборок использовали непараметрические тесты Манна—Уитни и Уилкоксона. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости P<0,05.

Результаты и обсуждение

1. Фенотип моноцитарных дендритных клеток больных раком молочной железы. Функциональное состояние клеток иммунной системы во многом определяется степенью экспрессии различных

молекул, опосредующих процессы адгезии, распознавания чужеродных структур, а также костимуляции и активации антигенспецифических Т-лимфоцитов. Для оценки фенотипа мДК больных РМЖ исследовали экспрессию:

1) корецептора к ЛПС — молекулы CD14, которая экспрессирована на моноцитах, макрофагах и гранулоцитах, но не на мДК, и может быть использована для контроля процесса дифференцировки моноцитов в мДК;

2) ГКС-подобной молекулы CD1a, одного из типичных маркеров мДК, функциональная роль которой предположительно состоит в презентации белковых антигенов;

3) HLA-DR — молекулы II класса ГКС, непосредственно осуществляющих антигенпрезентацию иммуногенных пептидов [9];

4) высокоспецифичного маркера зрелых ДК — молекулы CD83, участвующей в активации Т-лимфоцитов [10];

5) костимуляторных молекул CD40, CD80 и CD86, которые экспрессированы на всех АПК, включая ДК всех подтипов, моноциты/макрофаги и В-лимфоциты [2, 9].

Уменьшение экспрессии костимуляторных молекул на клетках негативно сказывается на процессе антигенпрезентации, способствует развитию состояния анергии. Учитывая, что в процессе дифференцировки моноцитов в ДК происходит утрата клетками молекулы CD14 и одновременно значительно, более чем на порядок, усиливается экспрессия молекулы CD1a, направленность изменения экспрессии этих молекул указывает на степень дифференцированности клеток.

В табл. 1 представлены данные о степени экспрессии различных CD-маркеров незрелыми ДК больных РМЖ.

В результате проведенных исследований установлено достоверное усиление экспрессии молекулы CD14 ($P=0,0005$) и снижение экспрессии молекулы CD1a ($P=0,00005$) мДК больных РМЖ по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о нарушении процессов дифференцировки моноцитов в ДК под действием цитокинов ГМ-КСФ и ИЛ-4 у больных РМЖ. Тем не менее, учитывая, что количество CD14⁺ клеток в культуре мДК составляло, как правило, не более 10%, данный факт указывает на принципиальную возможность получения мДК из моноцитов больных данной категории.

Таблица 1
Иммунофенотип незрелых мДК больных РМЖ

Молекула	Доноры (n=12), %	РМЖ (n=12), %	P
CD1a	95,40 (93,35—97,22)	58,14 (46,80—71,19)	0,00005
CD14	1,16 (0,37—2,49)	9,59 (4,79—13,08)	0,0005
CD80	47,63 (25,92—71,64)	49,55 (39,11—63,08)	0,908
CD86	85,93 (79,60—91,73)	87,85 (74,85—93,92)	0,954
CD83	4,79 (3,28—6,74)	2,40 (1,70—4,22)	0,090
HLA-DR	98,90 (97,34—99,59)	99,00 (95,39—99,97)	0,817

54 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

Таблица 2

Иммунофенотип мДК больных РМЖ под действием α -ФНО и дб-цАМФ

Молекула	1-я группа	2-я группа	3-я группа	P_{1-2}	P_{2-3}
	доноры, α -ФНО+дб-цАМФ (n=7), %	больные РМЖ, α -ФНО+дб-цАМФ (n=12), %	больные РМЖ, α -ФНО (n=12), %		
CD40	99,9 (99,2—100,0)	99,70 (98,80—100,00)	99,60 (99,50—99,70)	0,831	0,463
CD80	98,6 (97,2—99,5)	94,99 (92,32—95,73)	50,64 (45,66—61,04)	0,001	0,002
CD83	91,0 (86,2—93,8)	92,10 (90,73—94,95)	48,39 (41,95—62,63)	0,128	0,002
CD86	99,5 (98,0—99,8)	98,23 (96,60—99,58)	80,65 (74,18—87,37)	0,398	0,005
HLA-DR	99,6 (98,7—99,8)	99,12 (98,55—99,30)	98,40 (98,20—98,60)	0,427	0,678

Достоверных отличий в экспрессии костимуляторных молекул CD80, CD86 и молекулы ГКС HLA-DR ДК доноров и больных РМЖ выявлено не было, что свидетельствует об адекватной готовности ДК к антигенпрезентации. ДК больных РМЖ и доноров слабо экспрессировали молекулу CD83, что подтверждает «незрелость» фенотипа таких мДК.

2. Влияние на ДК различных индукторов созревания. Чтобы оценить способность ДК больных РМЖ к созреванию под действием различных активаторов, изучена экспрессия молекул костимуляции и активации на ДК больных РМЖ, культивированных на протяжении 24 ч в питательной среде с индукторами созревания.

Для индукции созревания ДК использовали α -ФНО и комбинацию α -ФНО и дб-цАМФ, преимущество последней (в относительном числе активированных клеток) было ранее показано на ДК больных вирусными гепатитами В и С [8]. Установлено, что относительное число $CD40^+$ ДК как в культурах ДК доноров, так и ДК больных РМЖ, культивированных с α -ФНО и α -ФНО+дб-цАМФ, статистически достоверно не отличалось (табл. 2).

Выявлено, что мДК больных РМЖ экспрессировали молекулу CD80 слабее по сравнению с контрольной группой ($P=0,001$). Экспрессия молекул CD80, CD86 и CD83 в культурах ДК больных РМЖ, культивированных в присутствии α -ФНО, была значительно ниже по сравнению с ДК больных РМЖ, культивированными с комбинацией α -ФНО и дб-цАМФ ($P<0,005$). При использовании данной комбинации относительное число $CD86^+CD83^+$ ДК не отличалось достоверно в культурах ДК доноров и больных РМЖ и составляло более 90%, что указывает на то, что комбинация α -ФНО+дб-цАМФ является высокоэффективным индуктором созревания мДК.

3. Влияние дендритных клеток больных РМЖ на пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов и продукцию ими внутриклеточных цитокинов ИЛ-4 и ИНФ- γ . ДК доноров и больных РМЖ сокультивировали с аллогенными донорскими Т-лимфоцитами в соотношении 1:20 и изучали эффект ДК на пролиферацию Т-лимфоцитов и продукцию ими цитокинов ИЛ-4 и ИНФ- γ .

Результаты исследования свидетельствуют о сравнимом эффекте ДК доноров и больных РМЖ на пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов. Так, относительное число пролиферирующих Т-лимфоцитов, культивированных в присутствии мДК больных РМЖ (11,6%),

не отличалось достоверно ($P=0,477$) от показателей контрольной группы (10,2%).

Относительное число Т-лимфоцитов во фракции МПК, содержащих внутриклеточно как ИЛ-4, так и ИНФ- γ , не отличалось статистически достоверно при сокультивировании МПК с ДК доноров и больных РМЖ (табл. 3).

Таким образом, полученные данные указывают на адекватные функциональные свойства ДК больных РМЖ.

Другие исследователи в работах, посвященных изучению функции ДК у больных РМЖ, приводят различные результаты. Так, показано, что количество ДК, получаемых из периферической крови больных РМЖ, было значительно меньше по сравнению с контрольной группой, что легко объяснимо, поскольку у больных РМЖ после химио- и лучевой терапии, как правило, выявляют лейкопению [11]. Вне зависимости от использованного индуктора созревания количество зрелых клеток в культурах ДК больных РМЖ было меньше, чем в культурах ДК доноров. ДК больных РМЖ характеризовались сниженной способностью стимулировать продукцию ИНФ- γ Т-лимфоцитами при их совместном сокультивировании.

В другом исследовании было установлено, что ДК, полученные от больных РМЖ, характеризовались зрелым фенотипом и повышенной экспрессией молекул CD40 и CD54 по сравнению с ДК доноров [12]. В то же время сокультивирование ДК и лимфоцитов выявило сниженную аллостимуляторную функцию ДК в отношении Т-лимфоцитов доноров.

В клинических испытаниях терапии РМЖ, результаты которых были опубликованы в ряде зарубежных изданий, использовали частично зрелые моноцитарные ДК [12—16]. Такой подход вряд ли может быть оправдан, исходя из знаний жизненного цикла ДК, поскольку представлять на мемbrane epitопы антигенов в комплексе с молекулой HLA-DR и инициировать «обучение» Т-лимфоцитов способны лишь зрелые ДК, которые

Таблица 3

Изменение содержания внутриклеточных цитокинов Т-лимфоцитов при сокультивировании с аллогенными ДК

Цитокин	Относительное число лимфоцитов, содержащих цитокин, %		P
	МПК+ДК доноров (n=5)	МПК+ДК больных РМЖ (n=5)	
ИЛ-4	2,2 (1,8—3,1)	2,7 (1,7—3,1)	0,960
ИНФ- γ	14,4 (8,7—19,9)	12,0 (8,1—12,8)	0,624

рые экспрессируют достаточное количество костимуляторных молекул.

Можно предположить, что использование недостаточно зрелых ДК (относительное число зрелых клеток около 50%) объясняется, с одной стороны, нарушенной способностью таких ДК к созреванию, с другой — несовершенством технологии индукции их созревания.

Данное исследование демонстрирует возможность получения более 90% зрелых ДК у больных РМЖ посредством использования комбинации α -ФНО и дб-цАМФ. Эти клетки, как и ДК доноров, экспрессировали костимуляторные и адгезивные молекулы, проявляли сравнимые аллостимуляторные свойства.

Выводы

1. Полученные данные свидетельствуют о нарушении процессов дифференцировки моноцитов в ДК у больных РМЖ.

2. Способ индукции созревания мДК больных РМЖ с применением комбинации α -ФНО и дб-цАМФ адаптирован к клинической практике. Экспрессия костимуляторных и активационных молекул дендритными клетками и их функциональные свойства при использовании данной комбинации индукторов созревания не отличалась от таковых у доноров.

ЛITERATURA

1. Титов Л. П. // Изв. НАН Беларуси.— 2002.— № 2.— С. 103—116.
2. Schuurhuis D. H. et al. // Int. Arch. Allergy Immunol.— 2006.— Vol. 140.— P. 53—72.
3. Lau R. et al. // J. Immunother.— 2001.— Vol. 24, № 1.— P. 66—78.
4. Ridgway D. // Cancer Invest.— 2003.— Vol. 21, № 6.— P. 873—886.
5. Elkord E. et al. // Immunology.— 2005.— Vol. 114.— P. 204—212.
6. Гончаров А. Е., Титов Л. П. // Доклады Национальной академии наук Беларуси.— 2008.— Т. 52, № 1.— С. 92—96.
7. Гончаров А. Е., Титов Л. П., Жмурковская Л. С. // Здравоохранение.— 2007.— № 11.— С. 28—32.

8. Гончаров А. Е., Титов Л. П. // Изв. НАН Беларуси.— 2008.— № 3.— С. 5—10.
9. Титов Л. П. Иммунология. Терминологический словарь.— М., 2008.
10. Lechmann M. et al. // Trends Immunol.— 2002.— Vol. 23, № 6.— P. 273—275.
11. Gervais A. et al. // Breast Cancer Res.— 2005.— Vol. 7, № 3.— P. R326—R335.
12. Pedersen A. E. et al. // Scand. J. Immunol.— 2005.— Vol. 61, № 2.— P. 147—156.
13. Svane I. M. et al. // Cancer Immunol. Immunother.— 2004.— Vol. 53.— P. 633—641.
14. Svane I. M. et al. // J. Clin. Oncol.— 2006.— Vol. 185, № 24.— P. 2577.
15. Svane I. M. et al. // Cancer Immunol. Immunother.— 2007.— Vol. 56.— P. 1485—1499.
16. Svane I. M. et al. // Vaccine.— 2008.— Vol. 26.— P. 4716—4724.

IMMUNOPHENOTYPE AND FUNCTION OF MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS OBTAINED FROM PATIENTS WITH BREAST CANCER

L. P. Titov, A. Y. Hancharou, L. A. Putyrska, S. V. Kosheleva, M. I. Kosheleva, Y. L. Putyrska

Objective. To study the immune phenotype and functional properties of dendritic cells of breast cancer patients.

Material and methods. A series of experiments *in vitro* was performed. Peripheral blood samples were taken from donors and patients with breast cancer stage II. Monocyte-derived dendritic cells obtained by adhesion method were the study object. The phenotype was studied, the breast cancer patients' dendritic cells capability to mature was determined, their influence on the allogenic T-lymphocytes proliferation and the intracellular cytokines IL-4 and TNF- α production was assessed.

Results. The data obtained while the experiments performance evidenced about disorders in the processes of monocytes differentiation into dendritic cells under cytokines effect in breast cancer patients. When studying the influence of maturation various inducers it was determined that appliance of TNF- α in combination with dibutiryl-cAMF in breast cancer patients allowed obtain more than 90% of mature dendritic cells.

Conclusion. The technique for inducing breast cancer patients' monocyte-derived dendritic cells to mature applying TNF- α in combination with dibutiryl-cAMF was adapted to clinical practice.

Key words: breast cancer, monocyte-derived dendritic cells.

Медицинская литература России

- Болевые синдромы в неврологической практике / Под ред. В. Л. Голубева.— М., 2010.**
- Боль: Руководство для врачей и студентов / Под ред. Н. Н. Яхно.— М., 2009.**
- Буланов Л. А. Позвоночник и суставы: Лечение и профилактика.— М., 2009.**
- Васильев А. Ю. и др. Лучевая диагностика в стоматологии: Учеб. пособие для вузов.— М., 2010.**
- Васильев А. Ю., Ольхова Е. Б. Лучевая диагностика: Учебник для вузов.— М., 2009.**
- Вейн А. М. Лекции по неврологии неспецифических систем мозга.— М., 2010.**
- Возрастная гастроэнтерология: В 3 т.: Т. 3 / Под общ. ред. Л. Б. Лазебника, П. Л. Щербакова.— М., 2009.**
- Воинов В. А. и др. Клиническое применение экстракорпоральных методов лечения: Учеб. пособие для вузов.— М., 2009.**
- Гигиена детей и подростков: Руководство к практическим занятиям: Учеб. пособие / Под ред. В. Р. Кучмы.— М., 2010.**
- Гигиена труда: Учебник для вузов / Под ред. В. Ф. Кириллова.— М., 2010.**
- Гигиена: Учебник / Под общ. ред. Г. И. Румянцева.— М., 2009.**
- Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких: Пересмотр 2008 г.— М., 2009.**
- Гребнев А. Л. Пропедевтика внутренних болезней: Учебник для вузов.— М., 2009.**

56 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

В. Ф. ЕРЕМИН, Е. Л. ГАСИЧ, С. В. СОСИНОВИЧ,
Г. В. ЛАПИЦКАЯ, О. Н. СУЕТНОВ, С. В. ЕРЕМИН,
В. С. ИЛЬЕНКОВА, И. А. КАРПОВ

МУТАЦИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ У ДЕТЕЙ, ПОЛУЧАВШИХ ВЫСОКОАКТИВНУЮ АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ

НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь, Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Белорусский государственный медицинский университет, Городская детская инфекционная клиническая больница Минска, Страновое Бюро Всемирной организации здравоохранения в Республике Беларусь

Цель исследования. Определить мутации резистентности к препаратам антиретровирусной терапии у ВИЧ-1, изолированного от детей, получавших высокоАктивную антиретровирусную терапию (ВААРТ) в Беларусь.

Материал и методы. Проанализированы данные обследования 5 девочек и 9 мальчиков с ВИЧ-инфекцией и СПИДом в возрасте от 6 до 10 лет. Для исследований применяли серологические (ИФА), молекулярно-биологические (ОТ-ПЦР, секвенирование), статистические методы.

Результаты. У ВИЧ-инфицированных детей, получавших ВААРТ и имевших перерывы в приеме антиретровирусных препаратов, определены резистентные штаммы ВИЧ-1, относящиеся к субтипу A, а также к рекомбинантной форме CRF02_A/G.

Заключение. На территории Беларуси впервые выявлена рекомбинантная форма CRF02_A/G ВИЧ-1 с мутациями резистентности высокого уровня к НИОТ и ННИОТ.

Ключевые слова: ВИЧ-1, антиретровирусная терапия, циркулирующая рекомбинантная форма ВИЧ-1, секвенирование, мутации резистентности.

На 1 мая 2010 г. в Республике Беларусь зарегистрировано 11 044 (116,5 на 100 тыс. населения) ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом, 2006 из них умерло. От ВИЧ-инфицированных матерей за период с 1987 г. по 1 мая 2010 г. родилось 1590 детей, у 159 (10%) из них подтвержден диагноз «ВИЧ-инфекция», 8 детей умерло (www.aids.by).

Все ВИЧ-инфицированные дети, нуждающиеся в антиретровирусной терапии, получают необходимое лечение. По разным причинам у некоторых детей в процессе лечения появляются резистентные штаммы ВИЧ, поэтому проводимая терапия оказывается неэффективной.

В статье приведены данные по определению мутаций резистентности ВИЧ у детей, находящихся на высокоАктивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) и не получающих антиретровирусные препараты, а также дана молекулярно-генетическая характеристика ВИЧ-1, изолированного от ВИЧ-инфицированных детей.

Материал и методы

В специальные пробирки с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) помещали 3—5 мл крови, взятой из локтевой вены ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом детей. Плазма крови была собрана после центрифугирования при 1000 об./мин в течение 20 мин.

Иммуноферментный анализ (ИФА) выполняли на тест-системах «КомбиБест-ВИЧ-1, 2 АГ/АТ» («Вектор-Бест», Россия).

Выделение РНК из плазмы проводили с использованием модуля для выделения, прилагаемого к набору для генотипирования ВИЧ-1, ViroSeq «HIV-1 Genotyping System v.2.0» Celera Diagnostics («ABBOTT», США), в соответствии с прилагаемой инструкцией. Вирус из плазмы осаждали при 23000г +4°C в течение 60 мин на высокоскоростной центрифуге «Avanti J 30i», («Beckman Coulter», США).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ), секвенирующую ПЦР проводили на амплификаторе «AB 2700» с использованием модуля для обратной транскрипции и ПЦР, прилагаемого к набору для генотипирования ВИЧ-1, ViroSeq «HIV-1 Genotyping System v.2.0» Celera Diagnostics («ABBOTT», США), в соответствии с инструкцией.

Очистку полученных в результате ОТ-ПЦР фрагментов проводили на колонках, прилагаемых к набору для генотипирования ВИЧ-1, ViroSeq «HIV-1 Genotyping System v.2.0» Celera Diagnostics («ABBOTT», США), в соответствии с инструкцией. Очистку фрагментов ДНК после секвенирующей ПЦР проводили методом спиртовой/ацетатной преципитации.

Электрофорез очищенных после секвенирующей ПЦР фрагментов участка гена *pol*/ДНК ВИЧ-1, кодирующего синтез протеазы и обратной транскриптазы (1800 п.н.), проводили на генетическом анализаторе «ABI PRISM 3100-Avant» («Applied Biosystems», США).

Анализ полученных фрагментов и определение мутаций резистентности ВИЧ к препаратам антиретровирусной терапии проводили с использованием коммерческой базы данных «ViroSeq HIV-1 genotyping system software v.2.6 analysis» Celera Diagnostics («ABBOTT», США), а также с применением программных продуктов «Sequencing Analysis Software v.5.1.1», «BioEdit», «SeqScape», базы данных Стенфордского университета.

Генотипирование вариантов ВИЧ-1 по участкам генов *env* и *gag* осуществляли при проведении анализа нуклеотидных последовательностей по ранее описанному методу [3].

Филогенетический анализ полученных фрагментов осуществляли с помощью программы «Mega 4.1» (деревья с корнем построены методом присоединения соседей — neighbor-joining method).

Результаты и обсуждение

С декабря 2009 г. по апрель 2010 г. в лабораторию поступило 14 образцов плазмы крови от детей на исследования по определению резистентных к препаратам антиретровирусной терапии (АРТ) штаммов ВИЧ-1. Пациенты были в возрасте от 6 до 10 лет: 5 девочек (возраст 6—10 лет) и 9 мальчиков (возраст 6—9 лет). По 5 больных было из Минска и Минской области, 2 из Могилевской области и по одному пациенту из Брестской и Гродненской областей. Шестеро детей получали препараты АРВТ, 3 не получали их, а у 5 детей данные о приеме препаратов отсутствовали (табл. 1).

Выделить РНК и провести исследования по определению мутаций резистентности ВИЧ удалось из 9 образцов. Из 5 образцов плазмы РНК вируса выделить не удалось.

У 3 пациентов были выявлены резистентные штаммы ВИЧ-1.

Пациент Ш., мальчик, 2002 г. р., рожден от ВИЧ-инфицированной матери. Лечится 3,5 года, принимал эпивир+ретровир+невимун и эпивир+ретровир+нелвир. Исследования по генотипированию показали, что больной инфицирован «светлогорским» вариантом ВИЧ-1 субтипа А, у вируса определяются мутации резистентности высокого уровня устойчивости к нуклеозидным и ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы: D67N, K70R, V118I, M184V, T215Y, K219E и V106I, Y188L (табл. 2).

Мутация в положении **D67N** содействует появлению резистентности к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ), за исключением ламикудина (3TC) и эмтрицитабина (FTC). Обычно данная мутация выявляется вместе с заменами в положениях 70 и/или 215. Мутация **K70R** ведет к появлению резистентности низкого уровня (low-level) к зидовудину (AZT), ставудину (d4T) и, возможно, к тенофовиру (TDF). Мутация в положении **V118I** встречается примерно у 2% больных без АРТ и частота встречаемости данной мутации увеличивается у пациентов, находящихся на ВААРТ. Данная мутация обеспечивает резистентность низкого уровня к 3TC и, вероятно, к дру-

гим НИОТ в присутствии мутации в положении **E44A/D**. Мутация **M184V/I** ведет к резистентности высокого уровня (high-level) к 3TC и FTC, вызывает низкий уровень устойчивости к диданозину (ddl) и абакавиру (ABC), а также повышает чувствительность к AZT, TDF и d4T. Мутация **T215Y** ведет к резистентности ВИЧ к AZT и d4T, а также в комбинации с мутациями в положении **M41L** и **L210W** снижает чувствительность вируса к ABC, ddl и TDF. Мутация **K219Q/E** в присутствии мутаций **K70R** или **T215Y/F** снижает чувствительность ВИЧ к AZT и, возможно, к d4T.

Мутация в положении **Y188L** вызывает у ВИЧ-1 резистентность высокого уровня к невирапину (NVP) и эфавиренцу (EFV), резистентность среднего уровня к делавирдину (DLV) и потенциально низкого уровня к этравирину (ETR).

Пациент М., мальчик, 2003 г. р., рожден от ВИЧ-инфицированной матери, данные по терапии отсутствуют. Как показали результаты секвенирования ВИЧ-1, изолированного из плазмы больного, пациент инфицирован «светлогорским» вариантом ВИЧ-1 субтипа А, вирус имеет мутации резистентности, определяющие высокий уровень устойчивости к НИОТ: M41L, E44DE, D67N, M184V, L210W, T215Y (табл. 3).

Мутация резистентности в положении **M41L** встречается в комбинации с мутацией в положении **T215Y** и вместе они ведут к резистентности высокого и среднего уровня к AZT и d4T, а также низкого уровня к ddl, ABC и TDF. Мутация **E44DE** определяется у пациентов на ВААРТ и в присутствии мутации в положении **V118I**, вызывает рези-

Характеристика образцов, поступивших для исследования

№/№ п/п	Пол	Год рождения	Место жительства	Антиретровирусная терапия	Субтип ВИЧ-1	Резистентность
1	Ж	2004	Минск	Не получ.	CRF03 A/B	Нет
2	М	2003	Минск	Не получ.	A	Нет
3	М	2003	Минск	Не получ.	A	Нет
4	Ж	2004	Слуцк	la (ZDV+3TC+NVP—2007—2008) b (ABC+ddl+LPV/r — с 2008)	A	Нет
5	Ж	2003	Минская обл.	Нет данных	A	Нет
6	Ж	2000	Брестская обл.	Нет данных	A	Нет
7	М	2003	Могилевская обл.	Эпивир+ретровир+невимун	CRF02 A/G	Есть
8	М	2003	Бобруйск	Нет данных		Есть
9	М	2002	Солигорск	Эпивир+ретровир+невимун Эпивир+ретровир+нелвир		Есть
10	М	2002	Минск	Эпивир+ретровир+невимун		
11	Ж	2003	Лида	Эпивир+ретровир+невимун—2004—2006 ZDV/3TC+EFZ — с 2006		
12	М	2003	Минская обл.	Нет данных		
13	М	2004	Минск	Нет данных		
14	М	2001	Минская обл.	Эпивир+ретровир+нелвир 2004—2007 Эпивир+ретровир+невимун — с 2007)		

Таблица 1

Определение мутаций резистентности ВИЧ-1 у пациента Ш.

Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы		Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы	
Ламивудин	Высокий уровень	Делавирдин	Средний уровень
Абакавир	Средний уровень	Эфавиренц	Высокий уровень
Зидовудин	Высокий уровень	Энтривирин	Низкий уровень
Ставудин	Средний уровень	Невирапин	Высокий уровень
Диданозин	Средний уровень		
Эмтрицитабин	Высокий уровень		
Тенофовир	Низкий уровень		

Таблица 2

58 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

стентность низкого уровня к ЗТС и другим НИОТ. Как указывалось выше, мутация в положении **D67N** содействует появлению резистентности к НИОТ, за исключением ЗТС и FTC. Обычно данная мутация выявляется вместе с заменами в положениях 70 и/или 215. Мутация **M184V/I** ведет к резистентности высокого уровня (high-level) к ЗТС и FTC, вызывает низкий уровень устойчивости к диданозину (ddI) и ABC, а также повышает чувствительность к AZT, TDF и d4T. Мутация в положении **L210W**, как и мутация в положении **D67N**, содействует появлению резистентности к НИОТ, за исключением ЗТС и FTC. Обычно данная мутация выявляется вместе с заменами в положениях **M41L** и/или **T215Y**. Мутация **T215Y** ведет к резистентности ВИЧ к AZT и d4T, а также в комбинации с мутациями в положении **M41L** и **L210W** снижает чувствительность вируса к ABC, ddI и TDF.

Уникальные данные были получены при изучении вируса, изолированного от пациента Ф., мальчика, 2003 г. р., рожденного от ВИЧ-инфицированной матери, ВААРТ получает с 2005 г. (эпивир+ретровир+нелимун), в июле 2007 г. прием препаратов был прерван на 1 мес. Исследования по определению генотипа вируса показали, что мальчик инфицирован рекомбинантной формой ВИЧ-1 — CRF02_A/G. Данный вариант вируса выявлен и описан впервые на территории Беларусь. У пациента был выявлен ВИЧ-1 с высоким уровнем резистентности к НИОТ и ННИОТ: M41L, D67N, T69Xi, K70R, V75M, M184V, T215F, K219Q и K101KQ, K103S, G190A (табл. 4).

Мутации резистентности к НИОТ в положении **M41L**, **D67N**, **K70R**, **M184V**, **T215F**, **K219Q** были описаны выше. Инсерция в положении **T69Xi** происходит примерно у 1—2% пациентов на ВААРТ. Вместе с мутациями резистентности к аналогам нуклеозидов (TAMs-thymidin analog) они ведут к резистентности высокого уровня к НИОТ. Мутация резистентности к ННИОТ в положении **K101KQ** не является существенной и слабо снижает чувствительность к ННИОТ. В отличие от **K101KQ**, за-

мена в положении **K103S** вызывает высокий уровень резистентности к нелимуну (NVP) и средний/высокий уровень резистентности к делавирдину (DLV) и эфавиренцу (EFV). Мутация в положении **G190A** вызывает высокий уровень резистентности к NVP, средний уровень резистентности к Efv и увеличивает чувствительность к DLV. Данная мутация не оказывает действия на чувствительность к этравирину (ETR).

У 6 пациентов мутации резистентности выявлены не были. У 5 из них определялся ВИЧ-1 субтипа А, а у одной больной М. геном имел мозаичную структуру и был отнесен к рекомбинантной форме A/B — CRF03_A/B (см. табл. 1). В то же время при проведении филогенетического анализа вирус, выделенный от больной М., кластрировался отдельно от образцов, отнесенных к субтипу А и от описанной ранее [4] рекомбинантной формы A/B из Калининграда (рис. 1).

Для подтверждения мозаичной структуры CRF02_A/G и CRF03_A/B были проведены амплификация, секвенирование и филогенетический анализ обоих изолятов по генам *gag* и *env* (рис. 2, 3). Исследования доказали рекомбинантную природу обоих вирусов. Так, CRF02_A/G, описанный у пациента Ф., по гену *gag* кластрировался с «африканским» вариантом субтипа А ВИЧ-1, а по участку гена *env* располагался между вариантами субтипа А «светлогорским» и «африканским». Таким образом, структуру генома вируса, изолированного от пациента Ф., можно представить следующим образом: A^{gag}/G^{pol}/A^{env}. Ранее такая рекомбинантная форма была описана в Голландии с образцами из Африки [5].

*Интересные результаты были получены при изучении изолята от больной М. По участку гена *rol* вирус располагался между ВИЧ-1 субтипа А «светлогорским» и «африканским» вариантами, а по участку гена *env* четко ложился в одном кластере с другими изолятами субтипа А, что было очень неожиданно, поскольку рекомбинантные формы A/B, «калининградский» вариант по данному участку генома располага-*

Таблица 3

Определение мутаций резистентности ВИЧ-1 у пациента М.

Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы		Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы	
Ламивудин	Высокий уровень	Делавирдин	Чувствительный
Абакавир	Высокий уровень	Эфавиренц	Чувствительный
Зидовудин	Высокий уровень	Этравирин	Чувствительный
Ставудин	Высокий уровень	Нелимун	Чувствительный
Диданозин	Средний уровень		
Эмтрицитабин	Высокий уровень		
Тенофовир	Средний уровень		

Таблица 4

Определение мутаций резистентности ВИЧ-1 у пациента Ф.

Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы		Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы	
Ламивудин	Высокий уровень	Делавирдин	Высокий уровень
Абакавир	Высокий уровень	Эфавиренц	Высокий уровень
Зидовудин	Высокий уровень	Этравирин	Средний уровень
Ставудин	Высокий уровень	Нелимун	Высокий уровень
Диданозин	Высокий уровень		
Эмтрицитабин	Высокий уровень		
Тенофовир	Высокий уровень		

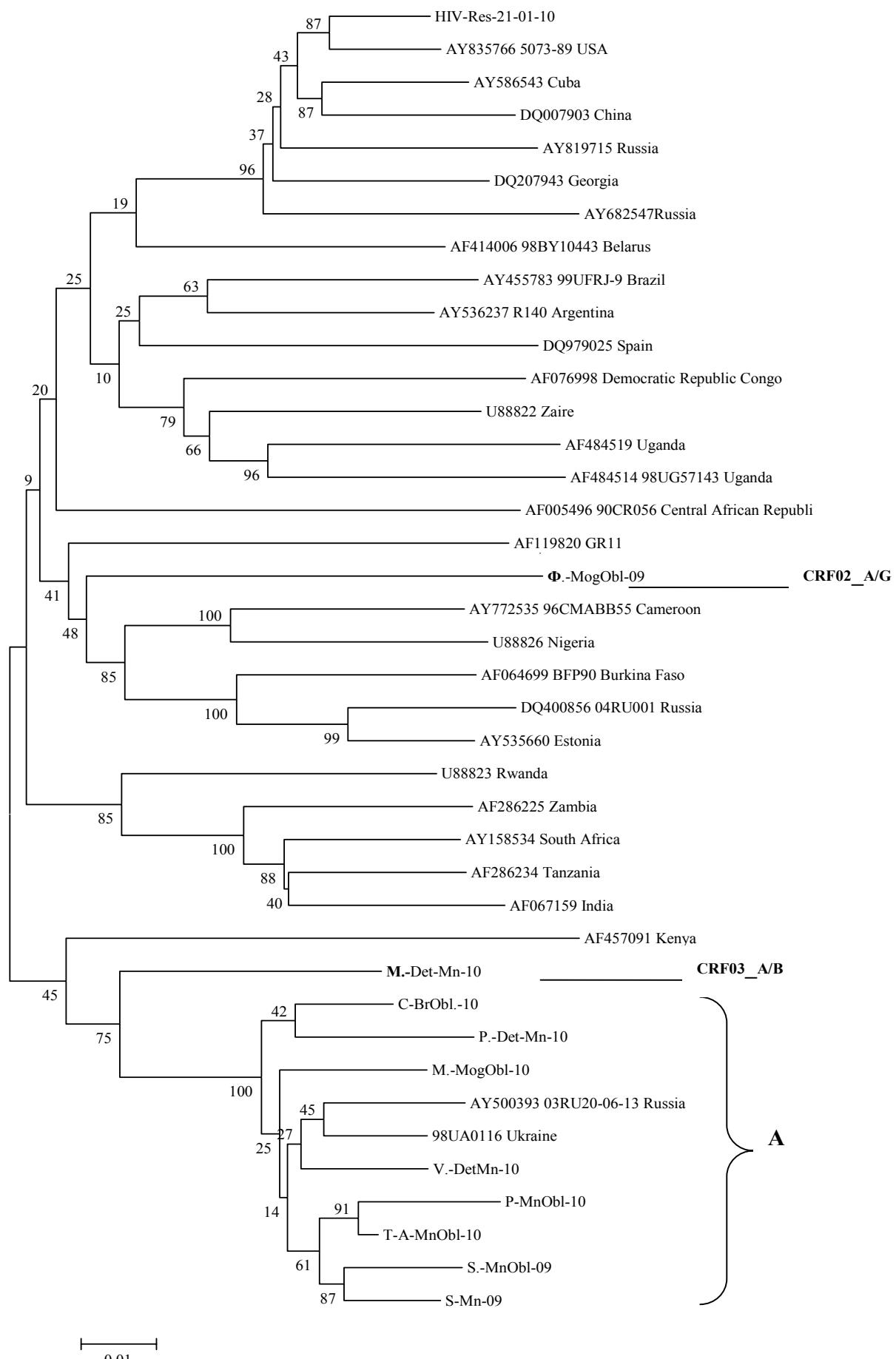


Рис. 1. Филогенетический анализ ВИЧ-1, изолированного от ВИЧ-инфицированных детей по участку гена *pol*

60 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

ются с субтиповом В ВИЧ-1. В то же время программа по генотипированию ВИЧ-1 «СОМЕТН/ВИЧ-1» определила изолят от пациентки М. как рекомбинантную форму А1/В. По гену *gag* секвенировать данный изолят не удалось, однако работа продолжается.

В результате исследования удалось секвенировать уникальный вирус, который не встречался до настоящего времени на территории Беларуси, в странах СНГ. Вирус внесен в международную базу данных GenBank.

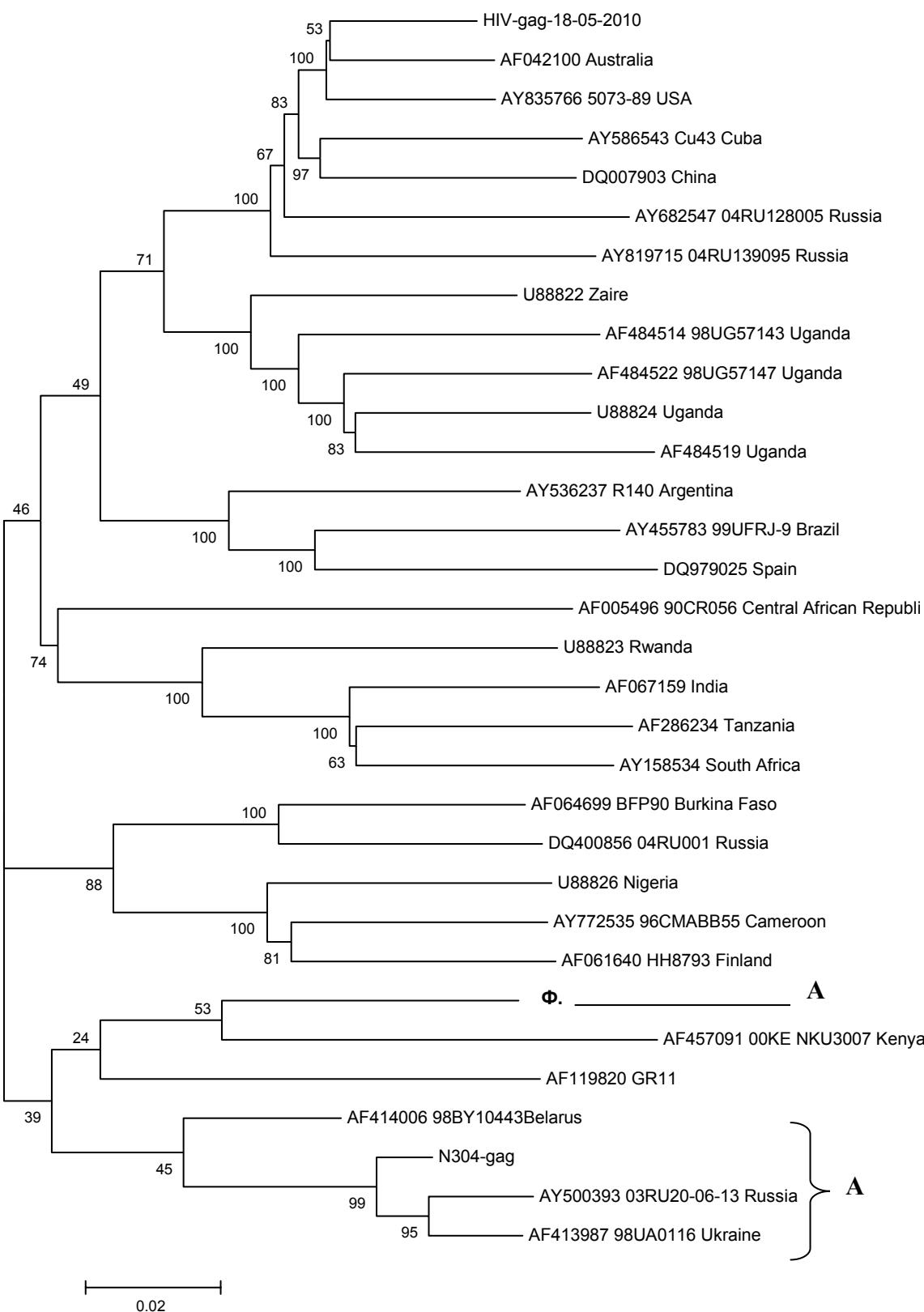
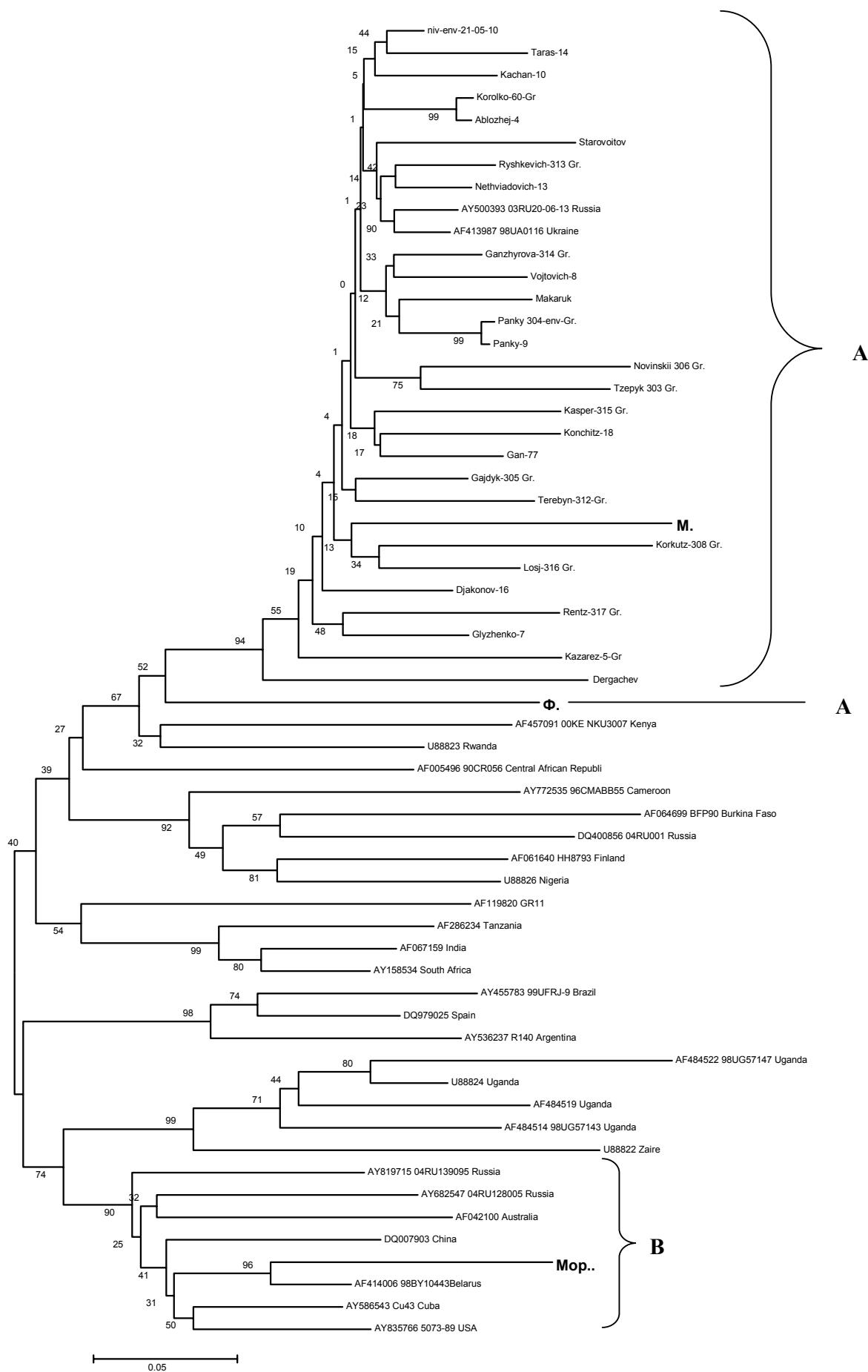


Рис. 2. Филогенетический анализ ВИЧ-1, изолированного от пациента Ф. по участку гена *gag*

Рис. 3. Филогенетический анализ ВИЧ-1, изолированного от пациента Ф. по участку гена *env*

62 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

Выводы

1. Определены мутации резистентности высокого уровня у 3 детей. Причинами появления таких мутаций являются, как правило, перерывы в приеме препаратов. В связи с этим необходим тщательный контроль родителей и медицинских работников за регулярностью приема препаратов данной группой пациентов.

2. Более 90% от всех случаев ВИЧ-инфицирования детей в Беларусь связано со «светлогорским» вариантом субтипа А ВИЧ-1. В то же время выявление рекомбинантных форм вируса свидетельствует о заносе вирусов из-за пределов страны и об изменении вируса у ВИЧ-инфицированных пациентов на территории страны. Об этом свидетельствует факт выделения новых вариантов ВИЧ-1 от пациентов Ф. и М. Для подтверждения этих предположений необходимо исследовать образцы плазмы от родителей детей.

Исследования проведены при финансовой поддержке Глобального Фонда в рамках реализации проекта программы ПРООН «Профилактика и лечение ВИЧ/СПИДа и туберкулеза в Республике Беларусь» и Странового Бюро Всемирной организации здравоохранения в Республике Беларусь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Panel of Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents.— Washington, 2008.
2. Hammer S. M., Saag M. S., Schechter M., et al. // JAMA.— 2006.— Vol. 296.— P. 827—843.
3. Лукашов В. В., Лазовская Н. В., Карамов Э. В. и др. // Вопр. вирусологии.— 2006.— № 6.— С. 22—26.
4. Masharsky A. E., Eremin V. F., Kozlov A. P.// XIV International AIDS Conference.— Barcelona, 2002.— P. 365.
5. Cornelissen M., R van den Burg., Zorgdrager F. Goudsmit J. // J. Gen. Virol.— 2000.— Vol. 81.— P. 515—523.

HIV RESISTANCE MUTATIONS IN CHILDREN ON HIGHLY EFFICIENT ANTIRETROVIRAL THERAPY

V. F. Eryomin, E. L. Gasich, S. V. Sosinovich, Lapitskaya G. V., O. N. Suetnov, S. V. Eryomin, V. S. Ilyenkov, I. A. Karpov

Objective. To determine mutations of the antiretroviral drugs resistance to HIV 1 isolated from children on highly efficient antiretroviral therapy (HEART) in Belarus.

Material and methods. The results of examining five girls and nine boys infected by HIV or suffering from AIDS aged 6 to 10 were analyzed. While examining the serological (IFA), molecular and biological (OT-PCR, sequencing), statistical methods were applied.

Results. Subtype A HIV 1 resistant strains as well as their recombinant forms CRF02_A/G were detected in the HIV infected children on HEART having intervals in the antiretroviral therapy.

Conclusion. The recombinant form CRF02_A/G of HIV 1 with resistance mutations of high levels was detected on Belarus territory for the first time.

Key words: HIV 1, antiretroviral therapy, circulating recombinant form CRF02_A/G of HIV 1, sequencing, resistance mutations.

О. О. ЯНОВИЧ, Е. С. НОСОВА, Л. П. ТИТОВ,
М. В. ДОРОШКО, Г. И. КОРОТКАЯ, Н. И. ТРУС

АНАЛИЗ ГЕНОТИПОВ ОСТРОВА ПАТОГЕННОСТИ *H. PYLORI* И ИХ СВЯЗЬ С ТЕЧЕНИЕМ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДКА

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь, Медицинский центр «Нордин», Республиканский консультативно-диагностический центр

Цель исследования. На основании оценки частоты выявления в слизистой оболочке желудка больных хроническими гастритами *H. pylori*, несущих гены острова патогенности *cagPAI*, установить связь с формой заболевания.

Материал и методы. Проведено обследование 68 *H. pylori*-положительных пациентов, обращавшихся в диагностические центры Минска для эндоскопического исследования желудочно-кишечного тракта, в том числе 52 пациентов с хроническим гастритом (ХГ), 16 — с язвой двенадцатиперстной кишки (ДПК). Определение *H. pylori* и демекцию генов *cagA*, *cagM*, *cagT* острова патогенности в биопсийном материале проводили методом ПЦР.

Результаты. Установлено, что частота встречаемости *cagA* была высокой вне зависимости от локализации патологического процесса (93,7% при язве ДПК и 78,8% при ХГ). Выявлено, что ген *cagT* встречается достоверно чаще у больных с

язвой ДПК, чем у пациентов с ХГ, — 87,5% и 50% соответственно. Установлено, что три изучаемых гена *cagPAI* встречаются гораздо чаще в биоптатах больных с язвой ДПК, чем у больных ХГ, — 52,3% и 28,8% соответственно. Статистический анализ показал, что риск развития язвы ДПК возрастает в 3,5 раза при наличии трех генов *cagPAI* — *cagA*, *cagM* и *cagT*. Сочетание двух генов острова патогенности *cagA* и *cagT* наблюдалось у 42,3% больных ХГ и 87,5% больных с язвой ДПК.

Заключение. Проведенное исследование показывает, что инфицирование индивидуумом хеликобактером, несущим гены *cagPAI*, ассоциируется с большей выраженностью воспалительных повреждений слизистой оболочки желудка, а также подтверждает важное значение для клинического развития заболевания, наличия в геноме возбудителя сочетания отдельных генов острова патогенности.

Ключевые слова: *H. pylori*, гены острова патогенности.

Helicobacter pylori на сегодняшний день является одной из широко распространенных бактерий на земле. Впервые *H. pylori* (Hp) была выделена в лаборатории в 1982 г. Маршаллом и Уорреном [1]. В 1989 г. установлена ассоциация данного микробы с хроническими воспалительными заболеваниями желудка — гастритами и дуоденальной язвой [2]. В середине 90-х годов прошлого века получены данные о связи хронических гастритов, вызванных Hp, с лимфомами и адено-карциномами желудка [3]. Инфекция характеризуется повсеместным распространением, поражает как взрослых, так и детей. У детей заболевание протекает бессимптомно. Язва желудка и двенадцатиперстной

кишки, ассоциированная с гастритом, обусловленным Нр, выявляется у взрослых и редко у детей. Рак желудка, включая лимфомы и аденокарциномы, диагностируется у взрослых. Наиболее часто инфекция встречается среди населения развивающихся стран с низким уровнем экономического развития. В развитых странах хеликобактериоз чаще характерен для лиц старших возрастных групп. Данные об инфицированности Нр в Республике Беларусь носят разрозненный характер (по результатам проведенного обследования — в некоторых областях 60—70%) [4].

Слизистая оболочка желудка является основным биотопом обитания Нр. Благодаря своему строению, продукции специфичных ферментов (уреаза, каталаза, фосфатаза, протеаза) и токсинов (липополисахарида, вакуолизирующий цитотоксин, цитотоксин ассоциированного антигена) Нр способны преодолевать защитные барьеры желудка, прикрепляясь к эпителиоцитам желудка, колонизировать слизистую оболочку, повреждать ее и вызывать развитие хронического воспалительного процесса.

Генетические детерминанты Нр, играющие роль в патогенезе заболеваний, можно разделить на две группы: 1) факторы колонизации, способствующие репродукции и нарушению физиологических процессов в желудке; 2) факторы вирулентности, обусловливающие взаимодействие с эпителиоцитами слизистой оболочки, макрофагами, дендритными клетками и Т-лимфоцитами пейкеровых бляшек, проникновение секретируемых белков в клетки эпителия и стимуляцию воспаления [5]. Наибольшая значимость среди факторов вирулентности отводится острову патогенности, содержащему гены цитотоксина ассоциированного антигена (*cag*, *cag-pathogenicity island* — *cagPAI*). *CagPAI* представляет геномный регион протяженностью 40 т.п.о., ограничен транспозируемыми элементами, содержит 31 ген, включая 6 генов *cag* (*cagA*, *cagM*, *cagT*, *cagE*, *cagP*, *cagH*). В некоторых штаммах присутствует транспозон *IS60*, разделяющий остров патогенности на два фрагмента — *cag I* и *cag II* [6].

Антигены, кодируемые *cagPAI*, принимают участие в ремоделировании структуры клеточной мембраны, проникают в цитоплазму и взаимодействуют с цитоскелетом клеток, активируют фактор транскрипции AP-1, экспрессиюprotoонкогенов *c-fos* и *c-jun* с активацией ERK/MAP-киназ, нарушают проведение внутриклеточных сигналов, индуцируют мутации гена супрессора опухолей *p53* и секрецию ИЛ-8 клетками желудка, являясь критическими этапами генеза рака [7]. Научные исследования последнего десятилетия существенно улучшили понимание иммунопатогенеза заболеваний желудка, обусловленных Нр, равно как и механизмы передачи возбудителя. Однако многие стороны генетического разнообразия возбудителя инфекции и роль полиморфизма генов вирулентности еще недостаточно изучены.

В работе была поставлена цель на основании оценки частоты выявления в слизистой оболочке желудка больных хроническими гастритами Нр, несущих гены острова патогенности *cagPAI*, установить связь с формой заболевания.

Материал и методы

Было проведено обследование 68 Нр-положительных пациентов (32 женщины и 36 мужчин, средний возраст $45,6 \pm 2,1$ года), обращавшихся в диагностические центры Минска с целью эндоскопического исследования желудочно-кишечного тракта, у 52 пациентов выявлены гистологические признаки хронического гастрита (ХГ), у 16 — язвы двенадцатиперстной кишки (ДПК). Материалом для исследования служили биоптаты из антрального отдела желудка, полученные при ФЭГДС.

Определение *H. pylori* в биопсийном материале методом ПЦР. Экстракцию ДНК Нр из биопсийного материала проводили с использованием набора «ДНК-сорбВ» («Амплисенс», Россия), в соответствии с инструкцией производителя.

Для амплификации фрагмента гена 23S рРНК Нр длиной 267 п.о. использовали последовательности: 52-AGGTTAACAGAGGATGCGTCAGTC-32 (F) и 52-CGCATGATATTCCCATTAGCAGT-32 (R) (GenBank №U27270). Объем реакционной смеси составлял 25 мкл, состоявшей из 1 мкл 10 пмоль/мкл раствора прямого праймера, 1 мкл 10 пмоль/мкл раствора обратного праймера, 2 мкл 10x ПЦР-буфера, 2 мкл 25 ммоль $MgCl_2$, 2 мкл раствора дНТФ и 0,2 мкл 5 ед./мкл Тақ-полимеразы, воды. Амплификацию проводили в автоматическом режиме по заданной программе: 94°C — 5 мин, затем 30 циклов — 94°C — 20 с, 57°C — 20 с, 72°C — 20 с. Анализ продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле (рис. 1).

Детекция генов *cagA*, *cagM*, *cagT* острова патогенности методом ПЦР. Для определения генов острова патогенности использовали последовательности, представленные в таблице.

Объем реакционной смеси составлял 25 мкл: 1 мкл 10 пмоль/мкл раствора прямого праймера, 1 мкл 10 пмоль/мкл раствора обратного праймера, 2 мкл 10x ПЦР-буфера, 2 мкл 25 ммоль $MgCl_2$, 2 мкл раствора дНТФ и 0,2 мкл 5 ед./мкл Тақ-полимеразы, вода до объема 25 мкл. Амплификация проводилась в автоматическом режиме по заданным программам. Анализ продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле.

Данные представлены в виде среднего±стандартное отклонение и доли от общего числа. Для сравне-

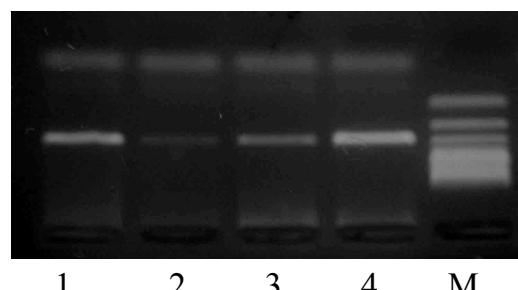


Рис. 1. Электрофорограмма результатов определения гена 23S рРНК *H. pylori*. Линии 1, 2, 3, 4 — *H. pylori* (267 п. о.); линия М — маркер молекулярного веса ДНК

Праймеры, использованные для амплификации фрагментов генов *cagPAI*

Ген	Последовательность праймеров	Размер фрагмента
cagA	F 5' - AATACACCAACGCCCTCCAAG - 3' R 5' - TTGTTGCCGCTTTGCTCTC - 3'	400 п. о.
cagM	F 5' -ACAAATACAAAAAGAAAAAGAGGC -3' R 5' -ATTTTCAACAAGTTAGAAAAGCC - 3'	586 п. о.
cagT	F 5' - CCATGTTTACGCCGTGT - 3' R 5' - CATCACCCACACCCCTTGAT - 3'	301 п. о.

ния долей применялся анализ таблиц сопряженности с вычислением статистик связи (с поправкой Йэтса) и точный критерий Фишера, ОШ — соотношение шансов (STATISTICA 8.0).

Результаты и обсуждение

Результаты определения генов *cagPAI* в биоптатах желудка больных хроническим гастритом и с дуоденальной язвой представлены на рис. 2. Установлено, что наибольшая частота встречаемости гена *cagA* выявлена в биоптатах больных с язвой ДПК — 93,7%. Частота данного гена в образцах больных ХГ также высока — 78,8%, но различия статистически не достоверны. Было установлено достоверное увеличение частоты встречаемости гена *cagT* у больных с язвой ДПК по сравнению с ХГ — 87,5% и 50% соответственно ($P<0,05$, ОШ=7, ДИ 1,3—49,8). Частота выявляемости гена *cagM* ниже по сравнению с другими генами *cagPAI* — 42,3% и 62,5% у больных ХГ и с язвой ДПК соответственно.

Важное значение в развитии заболевания имеют сочетания генов острова патогенности. Установлено, что три изучаемых гена *cagPAI* встречаются с наибольшей частотой в биоптатах больных язвой ДПК по сравнению с больными ХГ — 52,3% и 28,8% соответственно ($P<0,05$). Статистический анализ показал, что риск развития язвы ДПК возрастает в 3,5 раза при наличии трех генов *cagPAI* — *cagA*, *cagM* и *cagT* (ОШ=3,5). Частота сочетания генов острова патогенности в зависимости от заболевания представлена на рис. 3.

Полученные результаты показывают, что функционально важные элементы *cagPAI* области (*cagA*—*cagM*) присутствуют в большей части образцов биопсии у больных с язвой ДПК. Частота данного показателя у больных ХГ практически в два раза ниже и составляет 36,5% ($P>0,05$, ОШ=3,2).

Сочетание двух генов острова патогенности *cagA* и *cagT* наблюдалось у 42,3% больных ХГ и у 87,5% с язвой ДПК ($P<0,05$, ОШ=10).

Эволюция Нр идет по пути приобретения и изменения генетической информации, что увеличивает ее приспособляемость к среде обитания в организме хозяина, способность к формированию той или иной патологии. Горизонтальный трансфер генов, а также точечные мутации и селекция в результате воздействия антибактериальной терапии и иных факторов значительно расширяют возникновение и распространение штаммов с более высокой вирулентностью.

Профиль генов *cagPAI* Нр широко варьирует у штаммов, циркулирующих среди населения в разных регионах мира [6]. Ген *cagA*, который, вероятно, является наиболее значимым в патогенезе тяжелых форм заболевания, определяется примерно у 50—70% штаммов [8]. В патогенезе заболеваний, вызванных Нр, важную роль играют и другие гены острова патогенности. Установлено, что *cagE*, *cagH*, *cagL* и *cagM* активируют ядерный фактор NF-кB, *cagT* связывается с клеточными рецепторами с последующим выбросом ИЛ-8 и потенцирует таким образом проникновение в клетку *cagA* [9—11]. Вместе с тем некоторые исследования показывают, что ген *cagA* как маркер острова патогенности *cagPAI* не обладает достаточной значимостью по ряду причин: во-первых, инактивация *cagE*, а не *cagA* достоверно снижает секрецию ИЛ-8 эпителиальными клетками желудка; во-вторых, отсутствие гена *cagA* не всегда указывает на отсутствие острова патогенности *cagPAI* [12—14]. При этом большинство исследователей считают, что присутствие гена *cagA* ассоциировано с возникновением язвы желудка [15, 16]. Проведенный в 2003 г. J. Q. Huang и соавт. мета-анализ показал, что наличие гена *cagA* увеличивает риск заболевания раком в 2,87 раза [17]. В настоящем исследовании частота встречаемости гена *cagA* была

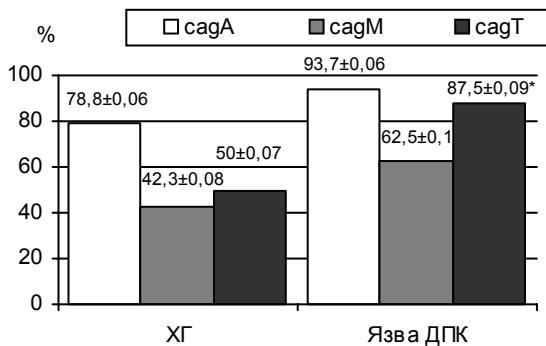


Рис. 2. Частота встречаемости генов *cagPAI* *H. pylori* в зависимости от диагноза. * Здесь и на рис. 3 различия показателей достоверны при сравнении с таковыми у больных ХГ

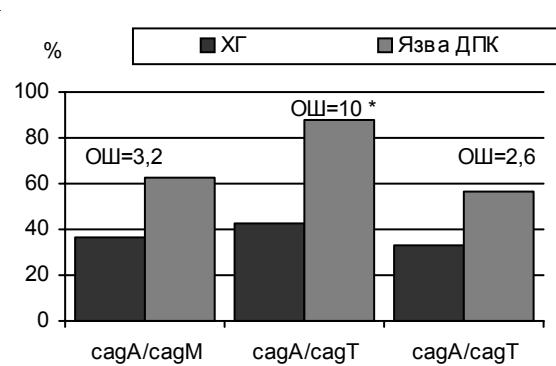


Рис. 3. Частота встречаемости генотипов *cagPAI* *H. pylori* в зависимости от диагноза

высокой вне зависимости от локализации патологического процесса (93,7% при язве ДПК и 78,8% при ХГ).

Выявлено, что другие гены *cagPAI* также связаны с риском неблагоприятного течения воспалительного заболевания желудка. По результатам исследования в Японии установлено, что штаммы, в которых отсутствовали гены *cagE* и *cagT*, выявлялись у пациентов с ХГ чаще, чем при язве желудка или раке [18]. В Англии большинство штаммов *H. pylori* у больных язвой желудка сохраняют гены *cagT* и *cagE*. Наличие гена *cagT* увеличивает риск заболевания язвой в 27 раз, а *cagM* в 8 раз [19]. В настоящем исследовании показано, что наличие гена *cagT* ассоциировано с увеличением риска развития язвы ДПК в 7 раз.

Известно, что делеции генов *cagA*, *cagE* и *cagT* наблюдаются с наибольшей частотой при доброкачественных заболеваниях, тогда как наличие *cagA*-промотора и левого конца *cagPAI* (LEC) наиболее часто встречается в тяжелых случаях [20]. Во Франции 32% штаммов не являются носителями этих генов, в Швеции и США — 9%, в Японии — 1% [18, 21–23]. В настоящем исследовании в 6,6% (n=5) биоптатов, содержащих ДНК Нр, отсутствовали три исследуемых гена острова патогенности. Установлено, что полное отсутствие генов *cagPAI* ассоциировано с низкой способностью микроорганизма индуцировать продукцию эпителиальными клетками ИЛ-8 *in vitro* [21].

P. J. Jenks и соавт. показали, что экспрессия хеликобактером *cagPAI* достоверно связано с развитием язвы, но клинический исход инфекции по отдельным генам трудно предсказать [24]. В настоящем исследовании установлено, что риск развития язвы достоверно возрастает при наличии гена *cagT* в 8 раз, а наличие сочетанного генотипа *cagA/cagT* увеличивает риск развития язвы ДПК уже в 10 раз.

Таким образом, проведенное исследование показывает, что инфицирование индивидуума хеликобактером, несущим гены *cagPAI*, ассоциируется с большей выраженностью воспалительных повреждений слизистой оболочки желудка, а также подтверждает важное значение для клинического развития заболевания наличия в геноме возбудителя сочетания отдельных генов острова патогенности. Для установления более точных механизмов патогенеза заболеваний, обусловленных продукцией хеликобактера, необходимы дальнейшие молекулярно-генетические исследования взаимодействия патогена и факторов иммунной системы хозяина.

ЛИТЕРАТУРА

- Marshall B. J., Warren J. R. // Lancet. — 1984. — Vol. 1. — P. 1311.
 - Graham D. Y. // Gastroenterology. — 1989. — Vol. 96. — P. 615—625.
 - Correa P. // Cancer Res. — 1992. — Vol. 52. — P. 6735—6740.
 - Эмпирическая эрадикационная терапия при дуоденальных язвах: Инструкция по применению / Сост. Макаренко Е. В., Бородаева А. В., Пиманов С. И., Королева Ю. И. — Витебск, 2005.
 - Конорев М. Р., Литвяков А. М., Титов Л. П. // Мед. новости. — 1998. — № 7. — С. 15—20.
 - Covacci A., Telford J. L., Del Giudice G., et al. // Science. — 1994. — Vol. 284. — P. 1328—1333.
 - Segal E. D., Falkow S., Tompkins L. S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1996. — Vol. 93, № 3. — P. 1259—1264.
 - Tsutsumi R., Higashi H., Higuchi M., et al. // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 3664—3670.
 - Maeda S., Akanuma M., Mitsuno Y., et al. // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — P. 44856—44864.
 - Fischer W., Pu J., Buhrdorf R., et al. // Mol. Microbiol. — 2001. — Vol. 42. — P. 1337—1348.
 - Rohde M., Pu Is J., Buhrdorf R., et al. // Mol. Microbiol. — 2003. — Vol. 49. — P. 219—234.
 - Ogura K., Takahashi M., Maeda S., et al. // Dig. Dis. Sci. — 1998. — Vol. 43. — P. 2738—2743.
 - Akopyants N. S., Clifton S. W., Kersulyte D., et al. // Mol. Microbiol. — 1998. — Vol. 28. — P. 37—53.
 - Maeda S., Yoshida H., Ikenoue T., et al. // Gut. — 1998. — Vol. 44. — P. 336—341.
 - Covacci A., Censini S., Bugnoli M., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — Vol. 90. — P. 5791—5795.
 - Xiang Z., Censini S., Bayeli P. F., et al. // Infect. Immun. — 1995. — Vol. 63. — P. 94—98.
 - Huang J. Q., Zheng G. F., Sumanac K., et al. // Gastroenterology. — 2003. — Vol. 125. — P. 1636—1644.
 - Ikenoue T., Maeda S., Ogura K., et al. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2001. — Vol. 8. — P. 181—186.
 - Kauser F., Hussain M. A., Ahmed I., et al. // BMC Microbiol. — 2005. — Vol. 5. — P. 32.
 - Matte M. J., Granado G., Püre C. V. // J. Med. Microbiol. — 2007. — Vol. 56. — P. 664—669.
 - Audibert C., Burucoa C., Janvier B. // Infect. Immun. — 2001. — Vol. 69. — P. 1625—1629.
 - Nilsson C., Sille N. A., Eriksson L., et al. // Infect. Immun. — 2003. — Vol. 71. — P. 6573—6581.
 - Hsu P.-I., Hwang I., Cittelly D., et al. // Am. J. Gastroenterol. — 2002. — Vol. 97. — P. 2231—2238.
 - Jenks P. J., Megraud F., Labigne A. // Gut. — 1998. — Vol. 43. — P. 752—758.
- ANALYSIS OF *H. PYLORI* PATHOGENICITY ISLAND GENOTYPES AND THEIR ASSOCIATION WITH GASTRIC CHRONIC DISEASES COURSE**
- O. O. Yanovich, E. S. Nosova, L. P. Titov, M. V. Doroshko, G. I. Korotkaya, N. I. Trus
- Objective.** Basing on assessing the frequency of revealing *H. pylori* bearing pathogenicity island *cagPAI* genes in the gastric mucous membrane in patients with *H. pylori* chronic gastritis to determine their relation with the disease form.
- Materials and methods.** Sixty eight *H. pylori* positive patients addressed to Minsk diagnostic centers for gastro-intestinal tract endoscopic examinations including 52 subjects with chronic gastritis (CG0 and 16 — with duodenal ulcers (DUs) were examined. *H. pylori* and pathogenicity island *cagA*, *cagM*, *cagT* genes were detected in the biopsy material by PCR.
- Results.** It was determined that the *cagA* frequency was high independent on the pathological process localization (93.7% in case of DU and 78.8% in case of CG). It was stated that frequency of *cagT* gene revealing was reliably higher in patients suffering from DU as compared with those with CG — 87.5% vs. 50% respectively. It was found that the three *cagPAI* genes studied were met much more often in biopsies of patients with DUs than in patients with CG — 52.3% vs. 27.8% respectively. The statistical analysis showed that the risk for DU development grew 3.5 times in case of three *cagPAI* genes — *cagA*, *cagM* and *cagT* — presence. Combination of two pathogenicity island *cagA* and *cagT* genes was observed in 42.3% of patients with CH and in 87.5% of patients with DUs.
- Conclusion.** Thus, the study performed showed that the subject infection with *Helicobacter* bearing *cagPAI* genes is associated with a larger severity of the gastric mucous membrane inflammation and confirmed the significance of revealing the combination of certain pathogenicity island *cagPAI* genes for the disease clinical course.
- Key words:** *H. pylori*, pathogenicity island genes.

66 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

В. Л. КОЛОДКИНА, Т. Н. ДЕНИСЕВИЧ, П. Г. СТРАХ,
О. В. ТРУХАН

ВЫЯВЛЕНИЕ *BORDETELLA PERTUSSIS* И *BORDETELLA PARAPERTUSSIS* В МАЗКАХ ИЗ НОСОГЛОТКИ МЕТОДОМ ПЦР

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

Цель исследования. Разработка и оценка молекулярного метода диагностики коклюша и паракоклюша на основе ПЦР.

Материал и методы. В качестве стандартных штаммов использовали типовые штаммы *B. pertussis* Tohama I, *B. parapertussis* 285 и *B. bronchiseptica* W2, полученные в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского (Москва). Подобраны праймеры для амплификации нуклеотидных последовательностей. Материалом для исследования в ПЦР являлись 112 мазков из носоглотки госпитализированных и амбулаторных больных с подозрением на коклюшную инфекцию.

Результаты. Позитивные результаты получены в 25% случаев, что в 27,8 раза выше по сравнению с результатами, полученными бактериологическим методом (0,9%).

Заключение. Разработанный и описанный метод ПЦР позволяет не только выявлять наличие ДНК *B. pertussis*, но и дифференцировать возбудителя коклюша от других представителей рода *Bordetella*.

Ключевые слова: ПЦР, *B. pertussis*, *B. parapertussis*.

Эпидемиологический надзор за коклюшной инфекцией, а также оценка эффективности вакцинации основываются на результатах бактериологического и серологического методов [1, 2]. Однако бактериологический метод, несмотря на высокую специфичность, обладает низкой чувствительностью, и окончательный результат получают через 7 дней и более. Применение этого метода в конечном итоге приводит к низкой диагностической эффективности [3]. Серологические тесты помогают в диагностике коклюша и чаще используются на практике. Однако, несмотря на более высокую чувствительность в сравнении с бактериологическим методом, они обеспечивают только ретроспективную диагностику инфекции, так как основываются главным образом на нарастании титров антител в парных сыворотках [4]. Эти два метода обеспечивают диагностику инфекции, дополняя друг друга, но и при использовании обоих методов не все случаи клинически диагностированного коклюша могут быть лабораторно подтверждены. Для преодоления этих ограничений разрабатывается молекулярная диагностика коклюша на основе ПЦР. Преимуществом ПЦР является ее высокая чувствительность и специфичность, а также получение результатов в короткие сроки. Однако в настоящее время стандартный метод ПЦР для выявления обоих патогенных для человека представителей рода *Bordetella* *B. pertussis* и *B. parapertussis* находится на стадии разработки. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о существующих различиях в выборе генов-мишеней, праймеров для амплификации, систем для детекции и методологиях постановки реакции, что не позволяет

прийти к единому мнению об оптимальной схеме проведения ПЦР для подтверждения и дифференциации коклюша. Целью данного исследования была разработка и оценка молекулярного метода диагностики коклюша и паракоклюша на основе ПЦР.

Материал и методы

В качестве стандартных штаммов использовали типовые штаммы *B. pertussis* Tohama I, *B. parapertussis* 285 и *B. bronchiseptica* W2, полученные в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского (Москва).

Материалом для исследования в ПЦР являлись мазки из носоглотки госпитализированных и амбулаторных больных с подозрением на коклюшную инфекцию. Мазки у каждого обследуемого брали двумя сухими ватными тампонами, один из которых помещали в стерильную пробирку для последующего исследования в ПЦР, другой — в транспортную среду Amies для исследования бактериологическим методом. Носоглоточные мазки хранили при +4°C и доставляли в лабораторию в течение 48 ч.

Выявление штаммов рода *Bordetella* бактериологическим методом. Носоглоточные мазки в транспортной среде Amies культивировали на кровяно-угольном агаре с добавлением цефалексина (40 мкг/мл) в течение 3—7 сут при +37°C. Чашки с посевом анализировали ежедневно, подозрительные колонии отсеивали и идентифицировали в реакции агглютинации с использованием адсорбированных поливалентных и монорецепторных диагностических сывороток, коклюшных к агглютиногенам 1, 2, 3 и паракоклюшных к агглютиногену 14. Морфологию клеток исследовали микроскопически, используя окраску по Граму. В качестве биохимических тестов, позволяющих идентифицировать штаммы рода *Bordetella* фенотипически, использовали способность изолятов к утилизации мочевины (тест на уреазу), цитратов на среде Симмонса, редукции нитратов и подвижность в полужидком агаре.

Выделение тотальной ДНК штаммов рода *Bordetella*. Геномную ДНК экстрагировали с использованием набора «QIAamp DNAmini» в соответствии с руководством производителя. Полную петлю бактериальной культуры ресусPENDировали в 180 мкл буфера ATL. Затем добавляли 20 мкл протеиназы K и после перемешивания на воротке продолжали инкубировать при +56°C в течение 2 ч, затем добавляли 200 мкл буфера AL и снова продолжали инкубировать при +56°C в течение 10 мин. После инкубации к пробе добавляли 200 мкл 96% этианола, тщательно перемешивали и переносили содержимое пробирки в колонку с последующим центрифугированием при 8000 об./мин в течение 1 мин. Колонку с содержимым дважды промывали буферами AW1 и AW2 в объеме 500 мкл. После промывки колонку помещали в чистую пробирку и ДНК элюировали в 100 мкл буфера AE при центрифугировании при 8000 об./мин в течение 1 мин.

Подготовка материала для ПЦР. Мазки из носоглотки, взятые сухим ватным тампоном и помещен-

ные в стерильную 1,5 мл пробирку эппендорф, после доставки в лабораторию суспендировали в 300 мкл стерильной бидистиллированной воды, тщательно перемешивая на вортексе. Стерильным пинцетом аккуратно удаляли тампон, отжимая его о стенки пробирки. Аликвоту образца в объеме 30 мкл прогревали при +95°C в течение 15 мин для разрушения клеток и по 5 мкл использовали в ПЦР. Оставшийся исходный материал замораживали при -20°C для последующего анализа.

ПЦР для выявления *B. pertussis*. Присутствие или отсутствие ДНК *B. pertussis* в клинических образцах определяли проведением двух ПЦР, специфичных на выявление независимых регионов генома: повторяющихся инсерционных последовательностей IS481 и консервативной области генома, находящейся внутри тиолазного гена.

Подобраны праймеры для амплификации нуклеотидной последовательности длиной 408 н. п. (нуклеотиды с 529 по 919), расположенные в мобильном элементе 481. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал 10 мкл смеси «АмплиСенс», 200 мкмоль каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, по 10 пмоль каждого праймера — 5'-CATCAAGAAGCTGG GACG и 5'-TCGGTGTTGGAGTTCTG. Амплификацию, включавшую 35 автоматических циклов, проводили с использованием амплификатора (Eppendorf): 30 с — денатурация при 94°C; 20 с — отжиг при 53°C; 30 с — элонгация при 72°C. В последнем цикле амплификации элонгация продолжалась 5 мин при 72°C. Продукт амплификации анализировали в 1,5% агарозном геле в трис-богатом ЭДТА-буфере, pH 8,4 (0,05М трис-борат, 0,005М ЭДТА). Гель окрашивали в течение 5 мин в растворе этидия бромистого (5 мкг/мл) и ДНК-фрагменты идентифицировали в ультрафиолетовом излучении с использованием трансиллюминатора (λ 310 нм).

Праймеры BP637F1 (5'-AACCCGATGACTCGTATGCT-3') и BP637R1 (5'-GTGACGATTACCAGCGA GATTA-3') были подобраны и использованы для амплификации фрагмента длиной 637 п.н., расположенного внутри тиолазного гена (locus tagged BP0026). Реакционная смесь в конечном объеме 25 мкл содержала 10 мкл смеси «АмплиСенс», 200 мкмоль каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, по 15 пмоль каждого праймера. Условия амплификации были следующие: предденатурацию проводили при 95°C 5 мин с последующими 40 циклами, состоящими из денатурации при 94°C в течение 30 с, отжига при 65°C в течение 20 с, элонгации при 72°C в течение 30 с. В последнем цикле амплификации элонгация продолжалась 5 мин при 72°C.

Подобранные праймеры к IS481 и консервативной области генома *B. pertussis* были проверены на способность связываться с геномами микроорганизмов, составляющих нормальную и транзитную микрофлору ротовой полости. Для этого праймеры анализировали в Международном генетическом банке данных через поиск в BLAST Nucleotide Collection (nr/nt) и в Reference genomic sequences (refseq_genomic) на способность связываться с ДНК стрептококков, стафилококков, клеб-

сиелл, кишечной палочки, лактобактерий и других обитателей ротовой полости. Анализ показал, что праймеры IS481 не имели перекрестного реагирования с выше перечисленными микроорганизмами. Обратный праймер BP637R1 способен перекрестно реагировать с геномами *Escherichia coli* str. K-12 и *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Однако этой особенностью обратного праймера можно пренебречь, учитывая, что ПЦР с данной парой праймеров используется в качестве подтверждающей и проводится после предварительного анализа материала в ПЦР с праймерами к IS-элементам.

В каждой реакции в качестве негативного контроля использовали деионизированную H₂O. В качестве позитивного контроля — очищенную хромосомальную ДНК *B. pertussis* (штамм Tohama I) в разведении 1 пг на реакцию в ПЦР с праймерами к IS481 и 10 пг на реакцию с праймерами к консервативной области генома.

Аналитическую чувствительность ПЦР определяли по амплификации последовательных разведений ДНК *B. pertussis* Tohama I. Результаты анализировали электрофорезом в агарозном геле, как описано выше.

ПЦР для выявления *B. parapertussis*. При проведении ПЦР с парой праймеров получали фрагмент длиной 493 н.п. (локализация в IS1001 с 735 по 1208 н.п.). В каждой реакции использовали в качестве положительного контроля ДНК типового штамма *B. parapertussis* № 1560 или № 285 (1 пг/реакция), в качестве отрицательного — H₂O. Назофарингеальные образцы в объеме 5 мкл добавляли к ПЦР-смеси, содержащей 10 мкл смеси «АмплиСенс», 200 мкм каждого дезоксинуклеотидтрифосфата и по 10 пмоль каждого праймера (5'-CCGCCTACGAGTTGGAGA-3' и 5'-CCGCTTGATGACC TTGATAG-3'). Конечный объем ПЦР-смеси — 25 мкл. Амплификация состояла из 35 циклов, каждый из которых включал температурные шаги 94, 52 и 72°C. Продукт амплификации анализировали в 1,5% агарозном геле в трис-богатом ЭДТА-буфере, pH 8,4 (0,05М трис-борат, 0,005 М ЭДТА). Гель окрашивали в течение 5 мин в растворе этидия бромистого (5 мкг/мл) и ДНК-фрагменты идентифицировали в ультрафиолетовом излучении с использованием трансиллюминатора (λ 310 нм).

Результаты и обсуждение

В качестве генов-мишеней, позволяющих в ПЦР выявлять и дифференцировать патогенные для человека представители рода *Bordetella*, разработчики использовали различные области генома — промоторная область гена коклюшного токсина, ген порина, аденилат-циклазный ген (cuaA), повторяющиеся мобильные элементы IS481 и IS1001, ген пертактина [5—12]. Однако в последнее время выявлена дивергенция между вакцинными и циркулирующими в настоящее время штаммами *B. pertussis*, что согласуется с представлениями об эволюции патогенов в условиях пресса иммунологических факторов. Синонимичные и несинонимичные мутации выявлены в таких генах патогенности, как *ptxA*, *prn*, *fim2*, *fim3*, в то же время в структуре гена *tcfA*, кодиру-

68 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

ющего фактор колонизации трахеи, мутации отсутствовали. В соответствии с данными литературы для разработки диагностической ПЦР коклюша не рекомендуется использование в качестве мишени генов, у которых показана мутационная изменчивость [13].

Таким образом, в качестве первых двух мишеней для разрабатываемой ПЦР были выбраны повторяющиеся инсерционные последовательности в связи с их высокой копийностью на клетку и видовой специфичностью (IS481 присутствует в геноме *B. pertussis*, а IS1001 специфичен для *B. parapertussis*) [14]. Однако IS481 в небольшом количестве копий встречается в геномах близкородственных возбудителей *B. bronchiseptica* и *B. holmesii* [15, 16]. Мобильные элементы IS481 в геномах *B. holmesii* и *B. pertussis* полностью идентичны [17]. Поэтому для подтверждения *B. pertussis* необходимо использование других геномов мишеней, что увеличивает диагностическую значимость ПЦР [18]. В связи с этим в качестве второй мишени была выбрана консервативная область генома *B. pertussis*, находящаяся внутри тиолазного гена. Эта область генома уникальна для *B. pertussis* и характеризуется высокой консервативностью [16]. Нуклеотидная последовательность праймеров, используемых в ПЦР, представлена в табл. 1.

Аналитическая чувствительность и специфичность. Минимальное количество ДНК, выявляемое в ПЦР с праймерами к IS481 и с праймерами к консервативной области, анализировали с помощью разведений очищенной хромосомной ДНК штамма *B. pertussis* Tohama I. Как видно из рис. 1, в ПЦР с праймерами к IS481 выявлялось 0,1 пг ДНК на реакцию, а с праймерами к консервативной области генома — 0,5 пг на реакцию (рис. 2).

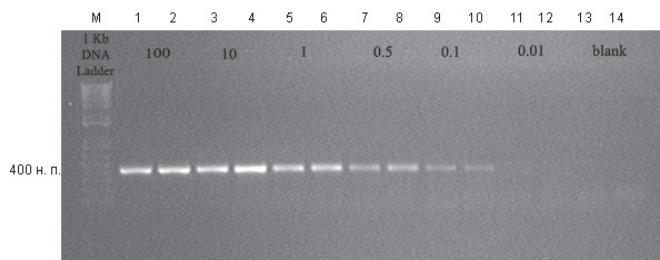


Рис. 1. Аналитическая чувствительность ПЦР с праймерами IS481, установленная на разведениях ДНК *B. pertussis* Tohama I: дорожки 1—2 — 100 пг/реакция; дорожки 3—4 — 10 пг/реакция; дорожки 5—6 — 1 пг/реакция; дорожки 7—8 — 0,5 пг/реакция; дорожки 9—10 — 0,1 пг/реакция; дорожки 11—12 — 0,01 пг/реакция; дорожки 13—14 — негативный контроль ПЦР

Минимальное количество ДНК, выявляемое в ПЦР с праймерами к IS1001, анализировали с помощью разведений очищенной хромосомной ДНК штамма *B. parapertussis* 285. Как видно на рис. 3, это количество составило 0,5 пг на реакцию.

Визуализация амплифицированной ДНК в ПЦР с праймерами к консервативной области генома штамма *B. pertussis* и близкородственных штаммов рода *Bordetella* (*B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*) показала специфичность выбранной части генома для штаммов *B. pertussis*. Как видно из рис. 4, фрагмент ДНК длиной 637 п. н. амплифицировался только на ДНК, принадлежащей штамму *B. pertussis*, и отсутствовал при использовании лизатов штаммов *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*.

Выявление *B. pertussis* и *B. parapertussis* в мазках из носоглотки. Параллельно были исследованы

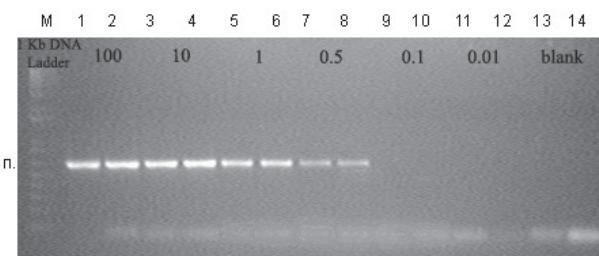


Рис. 2. Аналитическая чувствительность ПЦР с праймерами к консервативной области, установленная на разведениях ДНК *B. pertussis* Tohama I: дорожки 1—2 — 100 пг/реакция; дорожки 3—4 — 10 пг/реакция; дорожки 5—6 — 1 пг/реакция; дорожки 7—8 — 0,5 пг/реакция; дорожки 9—10 — 0,1 пг/реакция; дорожки 11—12 — 0,01 пг/реакция; дорожки 13—14 — негативный контроль ПЦР

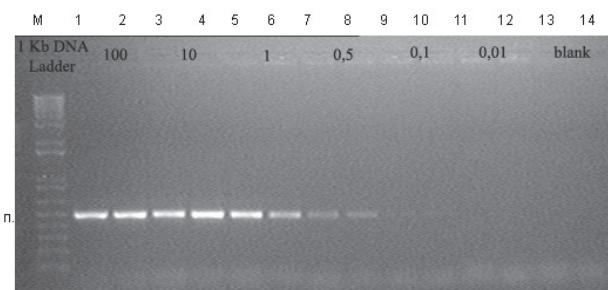


Рис. 3. Аналитическая чувствительность ПЦР с праймерами к IS 1001, установленная на разведениях ДНК *B. parapertussis* 285: дорожки 1—2 — 100 пг/реакция; дорожки 3—4 — 10 пг/реакция; дорожки 5—6 — 1 пг/реакция; дорожки 7—8 — 0,5 пг/реакция; дорожки 9—10 — 0,1 пг/реакция; дорожки 11—12 — 0,01 пг/реакция; дорожки 13—14 — негативный контроль ПЦР

Праймеры, используемые для выявления фрагментов ДНК *B. pertussis* и *B. parapertussis*

Таблица 1

Возбудитель	Праймеры	Последовательность	Длина ПЦР-продукта
<i>B. pertussis</i> (мишень IS481)	ISBPF1 ISBPR1	5'-CATCAAGAACGCTGGGACG-3' 5'-TCGGTGTGGAGTTCTG-3'	408 п.н.
<i>B. pertussis</i> (мишень — специфичный для <i>B. pertussis</i> сегмент, расположенный с 28315 по 32100 нуклеотид)	BP637F1 BP637R1	5'-AACCCGATGACTCGTATGCT-3' 5'-GTGACGATTACCAGCGAGATTA-3'	637 п.н.
<i>B. parapertussis</i> (мишень IS1001)	ISBPAF1 ISBPAR1	5'-CCGCCTACGAGTTGGAGA-3' 5'-CCGCTTGATGACCTTGATAG-3'	493 п.н.

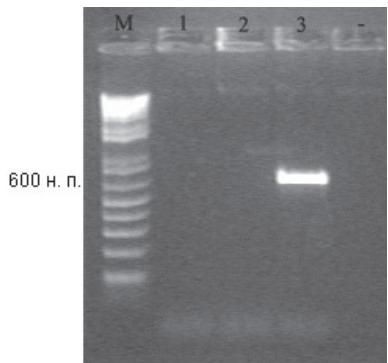


Рис. 4. Электрофоретический анализ ПЦР продукта, полученный амплификацией ДНК, принадлежащей штамму *B. pertussis* и близкородственным штаммам рода *Bordetella* с праймерами BP637F1 и BP637R1: дорожка 1 — *B. parapertussis* штамм 285; дорожка 2 — *B. bronchiseptica* штамм W2; дорожка 3 — *B. pertussis* Tohama I

в разработанной ПЦР для выявления *B. pertussis* и *B. parapertussis* и бактериологическим методом всего 112 носоглоточных мазков, полученных от больных с подозрением на коклюш. В обоих тестах позитивные результаты, подтверждающие наличие возбудителя коклюша, были получены для 1 образца, негативные — для 84 образцов. Позитивными в ПЦР и негативными в бактериологическом методе были 27 образцов. В целом доля позитивных результатов в ПЦР составила 25% (28 из 112 мазков), что в 27,8 раза выше в сравнении с результатами, полученными бактериологическим методом (0,9%, или 1 из 112 мазков). В отношении возбудителя паракоклюша все 112 носоглоточных мазков были негативными в обоих тестах.

Позитивные результаты были получены в двух независимых ПЦР, направленных на 2 разные мишени генома *B. pertussis*: IS481 и консервативную область, расположенную внутри тиолазного гена. При амплификации фрагмента с праймерами ко второй мишени в 3 случаях была выполнена бустерная реамплификация. Для этого продукт амплификации был разведен в 20 раз, и 5 мкл разведенного продукта было использовано в ПЦР при тех же условиях. С учетом реамплификации все позитивные пробы к IS481 были подтверждены ПЦР к консервативной, специфичной для *B. pertussis*, области генома.

В процессе исследования не было получено бактериологически позитивных образцов, которые при исследовании в ПЦР оказались негативными, что обеспечило ПЦР 100% чувствительность (табл. 2).

Таблица 2

Сравнение чувствительности и специфичности ПЦР и бактериологического метода

Результат теста	Количество образцов		Чувствительность, %	Специфичность, %
ПЦР: позитивный негативный	27 0	0 84	100	100
Бактериологический: позитивный негативный	1 27	0 84	3,6	100

Однако большое количество образцов, позитивных в ПЦР, оказались негативными при бактериологическом исследовании. Для определения значимости позитивных результатов ПЦР были проанализированы сведения о больных с целью получения клинических данных, подтверждающих результаты ПЦР. Позитивные в ПЦР результаты считали истинно позитивными, если они в соответствии с определением случая коклюша сопровождались выделением *B. pertussis* из образца или нарастанием титров антител в парных сыворотках либо высокими титрами антител в одной сыворотке, взятой не ранее 21-го дня от начала заболевания, или если у длительно кашляющего (более 2 нед) больного отмечался один из следующих симптомов: спазматический кашель, «лающий» кашель на вдохе, посткашлевая рвота [19, 20]. Анализ клинических данных о 28 больных, у которых результат ПЦР был позитивным, показал, что 19 (67,9%) из них соответствовали одному из критериев диагноза коклюша. Среди этих 19 больных 10 детей не было привито в возрасте до года. Остальные больные относились к возрастной группе от года до 37 лет и за исключением 2 больных были ранее привиты. У 9 больных, у которых отсутствовали клинические критерии инфекции, результаты серологического подтверждения диагноза коклюша, к сожалению, отсутствовали. Однако вероятность наличия инфекции у них в соответствии с данными ПЦР-диагностики была высока. Высокая вероятность инфицирования *B. pertussis* подтверждалась и тем, что все они не были привиты против коклюша. Кроме того, высокая вероятность инфекции у 2 из 9 больных, у которых результаты ПЦР были позитивными и отсутствовали четко выраженные клинические критерии инфекции, подтверждалось и тем, что контактные с ними лица также оказались позитивными при исследовании их мазков из носоглотки в ПЦР.

Таким образом, разработанный и описанный в данном исследовании метод ПЦР позволяет не только выявлять наличие ДНК *B. pertussis*, но и дифференцировать возбудителя коклюша от других представителей рода *Bordetella*. Инсерционные элементы, представленные в геноме несколькими копиями, увеличивают чувствительность ПЦР. Однако в связи с присутствием IS481 и в геномах *B. bronchiseptica*, *B. holmesii*, *B. parapertussis*, вызывающих коклюшеподобные заболевания, а также в некоторых штаммах *B. avium* и *B. petrii*, требуется проведение мониторинга специфичности этой мишени [6, 21, 22]. Существует ряд доказательств, что ПЦР с инсерционными элементами в качестве мишени являются более чувствительными, когда в реакции используется низкое число (20—25) циклов амплификации. Однако в случае с генами-мишениями, представленными в геноме одной копией (аденилатциклазный токсин, ген порина, промоторная область гена токсигенности), сопоставимые по чувствительности результаты достигаются при использовании 35 и более циклов амплификации [23]. В данном исследовании чувствительность ПЦР с праймерами к IS481 была практически сопоставима с чувствительностью

70 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

ПЦР со второй мишенью при использовании 40 циклов амплификации. Более половины полученных позитивных в ПЦР и негативных в бактериологическом исследовании результатов подтверждались клиническими и серологическими признаками коклюша. Вместе с тем при накоплении большого числа исследований больных с сопоставлением данных ПЦР, клинической картины, результатов серологического тестирования и эпидемиологических данных можно будет установить диагностическую чувствительность и специфичность разработанной ПЦР. Исследования в данном направлении продолжаются. Тем не менее разработанный метод ПЦР-диагностики коклюша и паракоклюша в настоящее время уже может быть использован в лабораториях практического здравоохранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Onorato I. M., Wassilak S. G. // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 1987.— Vol. 6.— P. 145—151.
2. Long S. S., Welkon C. J., Clark J. L. // *J. Infect. Dis.* — 1990.— Vol. 161.— P. 480—486.
3. Anonymous // *Health Protection Agency Standard Operating Procedure (BSOP 6i5. 1.)*.— London, 2003.
4. Kerr J. R., Matthews R. C. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* — 2000.— Vol. 19.— P. 77—88.
5. Reizenstein E., Johansson B., Mardin L., et al. // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* — 1993.— Vol. 17.— P. 185—191.
6. Reizenstein E., Lindberg L., Mollby R., Hallander H. O. // *J. Clin. Microbiol.* — 1996.— Vol. 34.— P. 810—815.
7. Stark M., Reizenstein E., Uhlen M., Lundeberg J. // *J. Clin. Microbiol.* — 1996.— Vol. 34.— P. 778—784.
8. Nygren M., Reizenstein E., Ronaghi M., Lundeberg J. // *J. Clin. Microbiol.* — 2000.— Vol. 38.— P. 55—60.
9. Fry N. K., Tzivra O., Ting Li Y., et al. // *J. Med. Microbiol.* — 2004.— Vol. 53.— P. 519—525.
10. Farrell J. D., M. McKeon, D. Daggard M. J., et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2000.— Vol. 38.— P. 4499—4502.
11. Farrell D. J., Daggard G., Mukkur T. K. // *J. Clin. Microbiol.* — 1999.— Vol. 37.— P. 606—610.
12. Register K., Nicholson T. L. // *J. Med. Microbiol.* — 2007.— Vol. 56.— P. 1608—1610.
13. Douglas E., Coote J. G., Parton and R., McPheat W. // *J. Med. Microbiol.* — 1993.— Vol. 38.— P. 140—144.
14. Parkhill J., Sebaihia M., Preston A., et al. // *Nat. Genet.* — 2003.— Vol. 35.— P. 32—40.
15. van der Zee A., Agterberg C., Peeters M., et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1993.— Vol. 31.— P. 2134—2140.
16. Probert W. S., Ely J., Schrader K., et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2008.— Vol. 46.— P. 3228—3231.
17. Reischl U., Lehn N., Sanden G. N., Loeffelholz M. J. // *J. Clin. Microbiol.* — 2001.— Vol. 39.— P. 1963—1966.
18. Qin X., Galanakis E., Martin E. T., et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2007.— Vol. 45.— P. 506—511.
19. WHO // WHO recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. — 2003.
20. International Bordetella pertussis assay standardization harmonization meeting report // *Vaccine*. — 2009.— Vol. 27.— P. 803—814.
21. Muyldermans, G., Soetens, O., Antoine M., et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2005.— Vol. 43.— P. 30—35.
22. Riffelmann M., Wirsing von König C. H., et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2005.— Vol. 43.— P. 4925—4929.
23. Meade B. D., Bollen A. // *J. Med. Microbiol.* — 1994.— Vol. 41.— P. 51—55.

BORDETELLA PERTUSSIS AND BORDETELLA PARAPERTUSSIS PCR DETECTION IN NASOPHARENGEAL SWAB SPECIMENS

V. L. Kolodkina, T. N. Denisevich, P. G. Strakh, O. V. Trukhan

Objective. Development and assessment of molecular method for pertussis and parapertussis diagnosis.

Material and methods. The type strains *B. pertussis* Tohama I, *B. parapertussis* 285 and *B. bronchiseptica* W2 received from SRI of Epidemiology and microbiology (Moscow) were used as the standard strains. Primers for the nucleotide sequences amplification were selected. One hundred and twelve nasopharyngeal swab specimens taken in hospitalized and ambulatory patients pertussis infection was suspected in served the material for the PCR assays.

Results. Positive results were obtained in 25% of cases being 27.8 times higher than the results obtained in the bacteriological study (0.9%).

Conclusion. The PCR assay developed and described allows in addition to detecting *B. pertussis* DNA presence differentiate the pertussis causing agent from the other *Bordetella* species.

Key words: PCR, *B. pertussis*, *B. parapertussis*.

Н. Л. БОГДАНОВА, А. С. ПЕТКЕВИЧ, Л. М. РУСТАМОВА,
В. М. САБЫНИН, С. Ф. СЕМЕНОВ, А. Г. ШУТОВА,
А. С. ВЛАДЫКО

ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА АЛЛОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИРОДНОГО ГЕНЕЗА И РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТАНЦИЙ ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ ЛАССА IN VIVO

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

Цель исследования. Выявление ингибитирующей активности у аллотропных препаратов природного генеза и растительных субстанций при геморрагической лихорадке Ласса у лабораторных животных.

Материал и методы. В работе использовали вирус Ласса, штамм Съера-Леоне, вызывающий одноименную лихорадку. Исследования выполнены на мышах линии Balb/c, которых инфицировали интракраниально в дозе до 1000 БОЕ/мышь (объем 0,03 мл), что обеспечивало гибель 80% контрольных мышей.

Результаты. Установлены противовирусные свойства у названных препаратов и растительных субстанций, которые применяли в нетоксичных для животных дозах, при сравнении исходов в контрольной группе мышей, не получавших лечения.

Заключение. Показана высокая защитная эффективность препаратов природного генеза и растительных субстанций, обосновано продолжение поиска ингибиторов среди растений с целью создания новых лекарственных средств и разработки оригинальных композиций для терапии геморрагических лихорадок, вызываемых аренавирусами, и оптимизации лечения.

Ключевые слова: аренавирусы, вирус Ласса, аллотропные препараты, протективные свойства, биологически активные вещества, рибамидил, Untom, Bawal, Vincristine, малавит, растительные субстанции Vior, Colcum, Chelios и Rhodiola q.

Лихорадка Ласса — высококонтагиозное ареноавирусное заболевание, вызывающее геморрагическую лихорадку с повреждением паренхиматозных органов. Вирус переносится разновидностью крыс, обитающих в Африке. Распространение инфекции происходит при заражении запасов пищи мочой грызунов, далее — от человека к человеку. Инкубационный период — 7—18 сут. На фоне нарастающей лихорадки, озноба, головной боли, миалгии на 4—9-й день появляется анорексия, тошнота, рвота, иногда непродуктивный кашель и фарингит. Наблюдается изъязвление слизистой оболочки полости рта (у 50%) и генерализованная безболезненная лимфаденопатия (у 50%). При благоприятном течении болезни лихорадка прекращается на 2-й неделе болезни. Симптоматика шока, помрачение сознания, хрипы в легких, плеврит, возбуждение, значительные судороги — признаки неблагоприятного прогноза. Летальность достигает 50% и более [1, 2]. Высокая заболеваемость и смертность при лихорадке Ласса, равно как и при многих других опасных вирусных инфекциях, распространенных в человеческой популяции, сопровождается поражением практически всех органов и систем организма хозяина, вызывая разные формы инфекции. Эти факты позволяют рассматривать их как общее системное заболевание организма. Кроме того, при нарастании заболевания в организме человека развивается иммунологическая недостаточность. В геноме вириона возможны мутации, рекомбинации и формирование резистентности вирусов к базовым химиопрепаратам, что сопряжено с определенными трудностями при терапии. В связи с этим необходимы новые отечественные лекарственные препараты, обладающие противовирусной и иммуномодулирующей активностью, которые повышают иммунобиологическую устойчивость организма и улучшают качество жизни пациентов [3, 4]. В числе таких претендентов на новое назначение — аллотропные препараты, применяемые при различных соматических патологиях, а также препараты природного генеза (фито- и органопрепараты, оригинальные вытяжки из растительного сырья), содержащие различные активные биокомплексы (алкалоиды, гликозиды, лектины, металлы и т. п.), антигомотоксические препараты, нутрицевтики, парафармацевтические композиции и пр. Одним из достижений молекулярной биологии, фитохимии, биохимии и др. является изучение действия фитолектинов — белков, обладающих свойствами обратимо и избирательно связывать углеводы, не вызывая их химического превращения. Лектины связаны со структурой и функцией клеточных мембран, что важно при течении патологического процесса — агглютинации вирусов и микроорганизмов в их присутствии. Этот фактор важен при формировании устойчивых штаммов патогенов к действию различных химиопрепаратов [5, 6]. Известно, что биотрансформация нутриентов, реализующихся в организме на конечном этапе в эссенциальные биоструктуры, активизирует взаимодействие базовых метаболических путей у живого организма как самонастраивающейся биологической системы. Такая система в тандеме с естественными интермедиатами эндогенного генеза способна с

помощью активных нутриентов щадяще корректировать метаболизм больного организма — устанавливать клеточные механизмы противовирусного и иного восстановительного действия, повышая его жизнеспособность и приближая выздоровление [7]. В предыдущих исследованиях была установлена и впервые показана противовирусная активность у препаратов на растительной основе и вытяжек из растительного сырья, содержащих дитерпеновые, индолевые алкалоиды и гликозиды разной структуры на модели вируса лимфоцитарного хориоменингита [8, 9]. В настоящей работе представлены результаты новой группы природных ингибиторов на растительной основе для подавления инфекции, вызываемой вирусом Ласса. Исходя из вышеизложенного целью исследования стало выявление ингибирующей активности у аллотропных препаратов природного генеза и растительных субстанций при геморрагической лихорадке Ласса на лабораторных животных.

М а т е р и а л и м е т о д ы

В работе использовали вирус Ласса, штамм Съера-Леоне, полученный из Центра по контролю за заболеваниями (США). Вирус хранится в Национальной коллекции вирусов РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Исследования выполнены на мышах линии Balb/c массой 4—6 г, полученных из НПЦ Института фармакологии и биохимии НАН Беларусь. Группы опыта и контроля состояли из 10 животных.

Препараты разводили на бидистиллированной воде.

Препараты природного происхождения

Малавит — комплексный натуропатический парофармацевтический препарат, содержащий более 36 растительных компонентов, минерал малахит, серебро и пр., изготовлен на структурированной омагниченной воде с образованием микрокластеров, стабилизирующих структуру препарата (ООО «Малавит», Россия). На применение этого препарата в качестве средства, ингибирующего размножение вируса лимфоцитарного хориоменингита и Ласса в культуре клеток получен патент № 11653 от 12.08.2008 г.

Untom — иммуномодулятор на растительной основе, содержит комплекс уникальных оксиндольных алкалоидов, являющихся оптическими изомерами, катехины, полифенолы и проантоксианидины (природные кислоты). Алкалоиды оказывают разблокирующую воздействие на механизмы гомеостаза: противоположно направленное «переключение» процессов активизации или торможения нарушения образования иммунокомпетентных клеток и роста отдельных форменных элементов (Лаборатория Индукимика С.А., Перу);

Bawa/ — кардиопротектор растительного генеза, влияющий на сердечный ритм («ПЭЗ ВИЛАР», Россия).

Vincristine-Teva — раствор с концентрацией 1 мг/мл, на основе алкалоида винクリстина, выделенного из барвинка розового. Фармакологическая группа — противоопухолевое средство, цитостатик, который связывается с тубулином и препятствует возникновению митозного веретена — останавливает митотическое деление

72 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

ние клеток на стадии метафазы («Teva Pharmaceutical Industries Ltd.», Израиль, производство компании «Pharmachemie B.V.», Нидерланды).

Водноспиртовые вытяжки растений

Vior, сем. *Arcaceae L.*, содержит более 20 алкалоидов индольного ряда, близких по природе к резерпину, в том числе пубисцин, изомайдин, акуамичин и др., некоторые из них ядовиты. Комплекс биологически активных веществ (БАВ), входящих в состав растения, обладает успокаивающими, гипотензивными, сосудорасширяющими, кровоостанавливающими, противомикробными и вяжущими свойствами. В основе гипотензивного механизма действия лежит способность снижать сосудистый тонус и сопротивление периферических сосудов. Известно, что один из алкалоидов *Vior* ингибит фосфодиэстеразу, повышает содержание цАМФ в тканях мозга, снижает концентрацию интрацеллюлярного кальция в тромбоцитах. Усиливает поглощение и обмен глюкозы, улучшает оксигенацию ткани мозга, тормозит адгезию и агрегацию тромбоцитов.

Colcum, сем. *Liliaceae*, содержит более 20 алкалоидов, один из них при воспалительных процессах, связываясь с внутриклеточным белком тубулином, предотвращает его полимеризацию в микротрубулы, что приводит к угнетению миграции лейкоцитов и фагоцитоза, угнетает образование лейкотриена B₄, ингибирует полимеризацию тубулина и подавляет клеточный митоз на стадии метафазы, задерживает развитие злокачественных образований; расширяет капилляры, используется при некоторых заболеваниях крови и лечении подагры.

Chelios, сем. *Papaveraceae*, содержит алкалоиды, флавоноиды, сапонины, органические кислоты и др. БАВ.

Rhodiola quad., сем. *Crassulaceae*, содержит антра-гликозиды, комплекс металлов и др. БАВ. Лекарственные растения получены из ЦБС НАН Беларусь.

Матричные настойки получали методом макерации измельченного и тщательно перемешанного растительного сырья с дальнейшим настаиванием и получением фракций, которые затем объединяли. Подготовленное растительное сырье настаивали на очищенном 20% этиловом спирте в соотношении 1:10. Полученные матричные настойки были прозрачны, окрашены в характерный для каждого вида растения цвет и хранились в стеклянных флаконах при +4°C [10—15].

Препараты вводили внутривенно в объеме 0,2 мл по следующей лечебно-профилактической схеме: за

1 ч до заражения вирусом, через 24 ч после заражения и далее ежедневно однократно в течение 12 дней. В качестве положительного контроля использовали известный отечественный противовирусный препарат «Рибамидил» (Rbm), который внутриклеточно метаболизируется до трифосфата. Rbm — сильный конкурентный ингибитор инозинмоносфатдегидрогеназы, РНК-полимеразы некоторых ДНК/РНК-вирусов и гуанилтрансферазы информационной РНК. Последнее проявляется торможением процесса покрытия информационной РНК-оболочкой. По мере фосфорилирования рибамидил трифосфат конкурентно подавляет образование гуанозинтрифосфата, тем самым снижая синтез вирусных РНК [16]. При выборе лекарственных растений в качестве кандидатов — ингибиторов вируса Ласса учитывался механизм действия их БАВ в соотношении с особенностями патологического процесса при лихорадке Ласса. Все лечебные средства применяли в дозах, не вызывающих гибели лабораторных животных.

Животных заражали интракраниально в дозе до 1000 БОЕ/мышь (объем 0,03 мл). Это обеспечивало гибель 80% контрольных мышей, которым вводили плацебо (бидистиллированная вода). В опытной группе назначали один из вышеперечисленных выше растительных препаратов. Срок наблюдения составлял три инкубационных периода (21 день). Действие препаратов оценивали по увеличению выживаемости, средней продолжительности жизни (СПЖ) и удлинению срока жизни (УСЖ) у животных опытных групп по сравнению с контрольной.

При статической обработке экспериментальных данных вычисляли доверительные интервалы среднеарифметических величин и проводили оценку достоверности различий числовых результатов по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

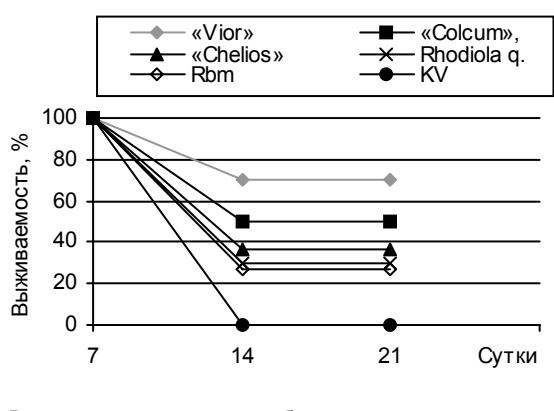
Установлено наличие противовирусных свойств у препаратов «Малавит», «Untom», «Bawal» и «Vincristine», обеспечивающих защиту у 32%, 24,0%, 22% и 10% животных соответственно ($P<0,05$). УСЖ животных составляла 1—2 сут, СПЖ — 8—9 дней. Животные, не получавшие лечения, гибли на 7-е сутки. Препарат на растительной основе «Untom» защищал на 30%, СПЖ составляла 9 дней, УСЖ — 2 дня. Защита мышей при использовании рибамидила составляла 33% (табл.).

Эффект защиты при применении препарата «Vincristine» невысок, однако при применении водно-

Влияние аллотропных препаратов на выживаемость мышей линии Balb/c, зараженных вирусом Ласса

Препарат	Доза	Смертность, %	Выживаемость, %	СПЖ, сут	УСЖ, сут
Малавит	0,001 АЕ/мл	50	30	8,0	2,0
Untom	50 мг/кг	56	24	9,0	2,0
Bawal	0,2 мг/кг	58	22	8,0	1,0
Vincristine	140 мкг/кг	70	10	8,5	1,5
Рибамидил	50 мг/кг	47	33	8,5	1,5
Плацебо	Н/о	80	0	7,0	0

спиртовой вытяжки «Vior», растения того же семейства, что и растение, из которого произведен препарат «Vincristine», защита животных при лихорадке Ласса составила до 70%. При исследовании противовирусных свойств растительного извлечения «Colcum», используемого в основном при заболевании суставов как в альтернативной, так и научной медицине, был зафиксирован защитный эффект в пределах 50%. При этом УСЖ составило 2 сут, а показатель СПЖ — 9 дней. Препарат, полученный из Chelios, защищал на 37%. УСЖ составляло 3 сут, показатель СПЖ — 9,5 сут (рис.).



Влияние растительных субстанций на выживаемость мышей линии Balb/c, зараженных вирусом Ласса

Таким образом, в проведенных экспериментах показана противовирусная эффективность разной степени исследованных препаратов «Малавит», «Untom», «Bawal» и «Vincristine»; извлечений из растений четырех семейств, содержащих комплекс биологически активных веществ (Vior, Colcum, Chelios и Rhodiola q.). Наибольшие протективные свойства в отношении инфекции Ласса у животных выявлены у препаратов «Малавит», «Bawal» и «Untom» и у двух растительных вытяжек — «Vior» и «Colcum».

В проведенных экспериментах показано, что различия эффектов при использовании препарата «Vincristine», содержащего только один компонент растения того же семейства, что и растительная вытяжка «Vior» (содержит весь естественный комплекс БАВ) и «Vior» существенны. Следует отметить также, что состояние животных — аппетит, увеличение массы тела, подвижность — практически не отличались от таких при применении «Vior». Таким образом, использование чистого действующего вещества не дало такого высокого лечебного эффекта, какой был получен при применении суммарной вытяжки из него.

Результаты исследования позволяют рекомендовать продолжение поиска ингибиторов вируса Ласса среди растений с целью создания новых лекарственных средств и разработки оригинальных композиций для терапии геморрагической лихорадки, вызываемой вирусом Ласса. В природе скрыт высокий потенциал целебных сил, которыми следует дополнять применение

синтетических препаратов. Используя и те, и другие разумно, можно достичь значительной степени защиты при заболевании вирусными инфекциями.

ЛИТЕРАТУРА

- Pfau C. J., Bergold J. H., Casals J., et al. // Intervirology.—1974.—Vol. 4.—P. 207—213.
- Богданова Н. Л., Рустамова Л. М., Петкевич А. С. // Бюл. Волгоградского науч. центра РАМН.—Волгоград, 2006.—С. 18—19.
- Богоявленский А. П., Березин В. Э., Огнева А. В. и др. // Вопр. вирусологии.—1999.—№ 5.—С. 229—231.
- Сабынин В. М., Богданова Н. Л., Семенов С. Ф. и др. // Современные проблемы инфекционной патологии человека: Материалы НИИЭМ по итогам выполнения ГНТП «Инфекции и медицинские биотехнологии».—Минск, 2005.—С. 468—475.
- Корсун В. Ф., Лахтин В. М., Корсун Е. В., Мицонас А. Фитолектины: Руководство по клинической фитотерапии.—М., 2007.
- Корсун В. Ф., Ситкевич А. Е., Ефимов В. В. Лечение препаратами растительного происхождения.—Минск, 1995.
- Мякишева Ю. В. // Вестн. РУДН. Сер. Медицина.—2008.—№ 7.—С. 368—372.
- Богданова Н. Л., Сабынин В. М., Рустамова Л. М. и др. // Материалы Междунар. науч.-практ. конф.—Минск, 2007.—С. 246—249.
- Богданова Н. Л., Рустамова Л. М., Сабынин В. М., Петкевич А. С. // Здравоохранение.—2008.—№ 11.—С. 76—79.
10. Государственная фармакопея Республики Беларусь / Под общ. ред. А. А. Шерякова.—Молодечно, 2008.—Т. 2.—С. 67.
11. Жукова О. Л. // Сб. Пятигорской государственной фармацевтической академии.—Пятигорск, 2006.—С. 201—203.
12. Орехов А. П. Химия алкалоидов.—М., 1995.
13. Пономарев В. Д. Экстрагирование лекарственного сырья.—М., 1976.
14. Улесов А. В., Тимченко В. Г., Гомон О. Н. и др. // Материалы IV Междунар. съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения».—Новгород, 2000.—С. 240—242.
15. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А. И. Ермакова.—Л., 1987.—С. 25—28.
16. Машковский М. Д. Лекарственные средства.—М., 2003.—С. 333—334.

PROTECTIVE PROPERTIES OF ALLOTROPIC PREPARATIONS OF NATURAL GENESIS AND OF HERBAL SUBSTANCES IN LASA HEMORRHAGIC FEVER IN VIVO

N. L. Bogdanova, A. S. Petkevich, L. M. Rustamova, V. M. Sabynin, S. F. Semenov, A. G. Shutova, A.S. Vladyko

Objective. Determination of inhibiting activity in allotropic preparations of natural genesis and in herbal substances in Lassa hemorrhagic fever on laboratory animals.

Material and methods. Sierra-Leone strain of Lassa virus causing Lassa fever was used in the study. The experiments were performed on Balb/c line mice infected intracerebral the dose being up to 1000 BFU/mouse (volume 0/03 mL) providing death of 80% of the control mice.

Results. The preparation of natural genesis and herbal substances administered in not toxic for animal doses were determined to possess antiviral properties when compared with the outcomes in the control group of mice not receiving any treatment.

Conclusion. It has been shown that preparation of natural genesis and herbal substances are highly efficient as protective preparations, the necessity to continue searching for inhibitors among plants for developing new drugs and new original compositions for managing hemorrhagic fevers caused by arenaviruses and therapy optimizing.

Key words: arenaviruses, Lassa virus, allotropic preparations, herbal substances, protective properties, biologically active substances, ribamidil, Untom, Bawal, Vincristine, Malavit, Vior, Colcum, Shelios, Rhodiola q.

74 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

Е. Л. ГАСИЧ, В. Ф. ЕРЕМИН, М. Г. ПИНЧУК,
С. В. СОСИНОВИЧ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГЕПАТИТА В, ВЫЯВЛЯЕМОГО В БЕЛАРУСИ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

Цель исследования. Определить, какой генотип вируса гепатита В обуславливает заболевание пациентов, проживающих в различных регионах Беларуси.

Материал и методы. Исследовано 28 образцов сыворотки/плазмы крови больных с диагнозом хронического вирусного гепатита В, полученных из различных регионов Беларуси, методом ИФА ПЦР.

Результаты. Проведенные исследование по генотипированию вируса гепатита В показали, что в Республике Беларусь 94,6% случаев гепатита В вызвано генотипом D и лишь 3,4% генотипом A. Причем в последние годы изменилась структура распределения субтипов генотипа D – отмечено увеличение доли случаев вирусного гепатита В, вызванных субтипами D1 и D3, по сравнению с субтипом D2.

Ключевые слова: гепатит В, вирус гепатита В, генотипирование, субтипы D1, D2, D3.

Вирусный гепатит В (ВГВ) — одна из самых актуальных проблем здравоохранения во всем мире в связи с непрерывно увеличивающейся заболеваемостью острым вирусным гепатитом, который нередко бывает источником развития хронического гепатита, цирроза печени и гепатокарциномы с летальным исходом как от острых, так и от хронических форм инфекции. По данным ВОЗ, ежегодно около 50 млн человек в мире заболевают ВГВ и насчитывается около 400 млн носителей вируса гепатита В, при этом ежегодно умирает не менее 1 млн человек, а в 33% случаев развивается гепатоциллюлярная карцинома терминальной стадии [1, 2].

Беларусь относится к странам с умеренным уровнем распространения вирусных гепатитов. В 2009 г. по сравнению с 2008 г. количество впервые выявленных носителей вируса гепатита В снизилось на 30% (с 17,88 до 12,54 на 100 тыс. населения). По данным Министерства здравоохранения Республики Беларусь, заболеваемость хроническим ВГВ снизилась на 11% (с 6,01 до 5,35 на 100 тыс. населения).

В последнее десятилетие возрос интерес к влиянию генетической вариабельности вируса гепатита В на течение и исход болезни. Генетическая вариабельность проявляется как в возникновении мутаций в вирусном геноме *«de novo»* у каждого инфицированного субъекта, так и в существовании различных генотипов вируса гепатита В, свойственных определенным популяциям носителей. Современная классификация включает девять генетических групп вируса гепатита В, обозначенных как генотипы A–H и w4B. Кроме генотипов на основании анализа полных геномов вируса гепатита В выявлены различные субгено-

нотипы вируса, которые обозначаются арабскими цифрами (A1, A2, D1, D2 и т. д.) и которые характеризуются различным географическим распределением. Генотипы вируса гепатита В также преобладают в различных географических зонах: генотип А — в Восточной Европе, Северной Америке, на юге и востоке Африки, генотипы В и С — в Азии, генотипы А и D являются общими для Европейского региона, генотип F — в южной и восточной Америке, генотип G обнаружен во Франции, Германии, Грузии, генотип H найден в Центральной Америке [3, 4]. В последнее время появляется все больше данных, указывающих на то, что генотипы вируса гепатита В могут влиять на скорость НВе-сероконверсии, тяжесть течения болезни, частоту хронизации и вероятность развития гепатокарциномы [5].

Корреляция между генотипами вируса гепатита В и ответом на антивирусную терапию до конца не ясна, однако установлено, что гепатоциллюлярная карцинома чаще развивается в случае ВГВ, обусловленного генотипом В [6]. При ВГВ, вызванном генотипом А, чаще отмечается нарастание уровня аланинаминотрансфераз (АЛТ), выявление соре-антитела, отсутствие анти-НВе-антител и более частое развитие цирроза печени по сравнению с ВГВ, вызванным генотипом D, а также появление мутаций в рецессивном регионе в ответ на противовирусную терапию [7].

В настоящей статье представлены впервые полученные данные по определению генотипа вируса гепатита В у пациентов, проживающих в различных регионах Беларуси.

М а т е р и а л и м е т о д ы

Было исследовано 28 образцов сывороток/плазмы крови от больных с диагнозом хронического ВГВ, полученных из различных регионов Беларуси.

Все образцы были протестированы на наличие HBsAg методом иммуноферментного анализа (ИФА) на тест-системе «Вектогеп В—HBs-антител-стрип» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия), на наличие антител к соре-антителу вируса гепатита В «ДС-ИФА-АНТИ-НВе» и антител класса G к соре-антителу вируса гепатита В «ДС-ИФА-АНТИ-НВе» на тест-системах производства ООО «НПО Диагностические Системы» (Россия).

Дизайн и синтез пар праймеров к участку генома вируса гепатита В осуществляли с использованием данных, предоставленных сотрудниками Каролинского университета (Швеция), и синтезатора нуклеиновых кислот Expedite 8900 (США).

Выделение ДНК вируса гепатита В проводили с использованием коммерческого набора «ДНК-сорб» производства Центрального НИИ эпидемиологии (Россия) согласно прилагаемой инструкции.

Для генотипирования вируса гепатита В использовали несколько комплектов пар праймеров, предназначенных для генотипирования preS-фрагмента.

Первый раунд:

fw Hep75 CCTGTAGGTGGCTCCAGTTC (56-75)

rw Hep73BAGCCAGTGGGGTTGCGTCAG (1187-1207)

Второй раунд:

fw Hep 33AGGACTGGGGACCCCTG (1-16)
 rw Hep 3 CTCAAGCTTCATCATCCATATA (573-594)
 fw Hep4 CTTGGATCCTATGGGAGTGG (489-509)
 rw Hep34 ACTTTCCAATCAATAGG (841-857)

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в гнездовом варианте проводили на амплификаторе «Corbet Research» (Австралия) в два этапа (объем 25 мкл) по следующей прописи.

Первый раунд: MgCl₂ — 2,5 мкл (25 ммоль), смесь трифосфатов — 0,4 мкл (10 ммоль), праймеры по 0,25 мкл (100 ммоль), 10xПЦР-буфер — 2,5 мкл, Таq-полимераза — 0,2 мкл, бидистиллированная вода — 16,9 мкл. Праймеры Нер75 и Нер73B.

Второй раунд: MgCl₂ — 2,5 мкл, смесь трифосфатов — 0,4 мкл, праймеры по 1 мкл, 10xПЦР-буфер — 2,5 мкл, Таq-полимераза — 0,2 мкл, бидистиллированная вода — 12,9 мкл. 1-я пара праймеров-Нер33 и Нер3, 2-я пара праймеров — Нер4 и Нер34.

Оба раунда ПЦР выполняли в следующем режиме: 95°C — 5 мин; 35 циклов 95°C — 20 с, 62°C — 20 с, 72°C — 90 с; 72°C — 10 мин.

Для проведения реакции секвенирования применяли набор «BigDye terminators v.3.1» производства «Applied Biosystems» (США) со следующим режимом амплификации: 1 мин при 96°C — 1 цикл; 10 с при 96°C, 5 с при 50°C, 2 мин при 60°C — 25 циклов.

Электрофорез очищенных фрагментов после секвенирующей ПЦР проводили на приборе «ABI PRISM 3100-AVANT» («Applied Biosystems», США).

Анализ полученных фрагментов генома вируса гепатита С осуществляли с использованием программных продуктов «Sequensing Analysis Softwere v.5.1.1», «BioEdit v.7.0.9.0», «SeqScape v.2.6».

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы «Mega 4» (деревья с корнем построены методом присоединения соседей (neighbor-joining methods). Для выравнивания генетических последовательностей использовали программу Clustal W.

Результаты и обсуждение

Образцы плазмы/сыворотки крови были доставлены из всех областей Республики Беларусь в течение 2008—2010 гг. 20 образцов было протестировано на наличие HBsAg, антител к core-антителу и антител класса G к e-антителу вируса гепатита В. Данные о возрасте, поле, вирусной нагрузке и выявляемому генотипу вируса гепатита В у обследованных пациентов представлены в таблице.

Как видно из таблицы, всего исследовано 28 образцов сыворотки/плазмы крови, полученных от пациентов с диагнозом хронического вирусного гепатита В (ХВГВ). По регионам они распределились следующим образом: 13 (46,4%) — из Минска, 7 (25,0%) — из Бреста, 5 (17,9%) — из Могилева, 2 (7,1%) — из Гомеля и 1 (3,6%) — из Витебска. Мужчин в исследуемой группе было в 4 раза больше, чем женщин. Средний возраст мужчин — 43,4±13,9 года, женщин — 43,0±11,5 года.

Характеристика образцов, взятых для генотипирования вируса гепатита В

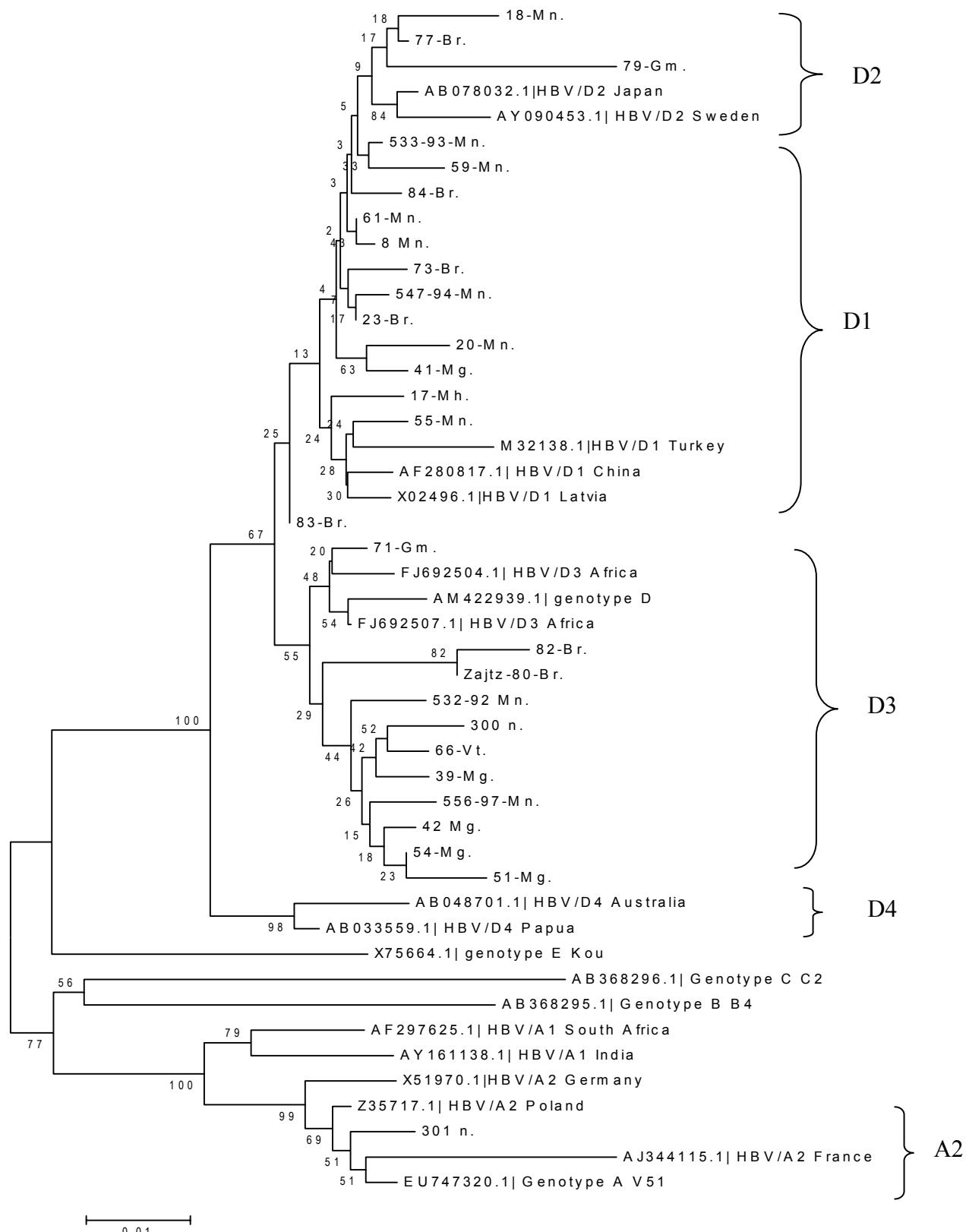
№ об-разца	Регион	Диагноз	Пол	Возраст, лет	Вирусная нагрузка, копии ДНК/мл	Генотип ВГВ	HBsAg	ИФА анти-HBc	ИФА анти-HBe
18	Минск	ХВГВ	М	Н.и.	Н.и.	D2	+	+	+
93	Минск	ХВГВ	М	24	1290000	D1	+	+	-
59	Минск	ХВГВ	Ж	46	Н.и.	D1	+	+	+
61	Минск	ХВГВ	М	46	Н.и.	D1	+	+	+
8	Минск	ХВГВ	Ж	Н.и.	Н.и.	D1	Н.и.	Н.и.	Н.и.
20	Минск	ХВГВ	М	Н.и.	Н.и.	D1	Н.и.	Н.и.	Н.и.
94	Минск	ХВГВ	М	26	Более 10 ⁸	D1	+	+	-
17	Минск	ХВГВ	Ж	59	Н.и.	D1	Н.и.	Н.и.	Н.и.
55	Минск	ХВГВ	М	Н.и.	Н.и.	D1	Н.и.	Н.и.	Н.и.
300	Минск	ХВГВ	Ж	39	3030	D3	+	+	+
97	Минск	ХВГВ	М	52	47000	D3	+	+	+
301	Минск	ХВГВ	М	35	102000	A2	+	+	+
92	Минск	ХВГВ	М	35	401000	D3	+	+	-
77	Брест	ХВГВ	Ж	42	Н.и.	D1	+	+	+
84	Брест	ХВГВ	М	46	Н.и.	D2	+	+	-
82	Брест	ХВГВ	М	34	Н.и.	D3	+	+	-
73	Брест	ХВГВ	Ж	63	Н.и.	D1	+	+	-
80	Брест	ХВГВ	М	73	Н.и.	D3	+	+	+
23	Брест	ХВГВ	М	Н.и.	Н.и.	D3	Н.и.	Н.и.	Н.и.
83	Брест	ХВГВ	М	64	Н.и.	D1	+	+	-
41	Могилев	ХВГВ	М	25	Н.и.	D1	+	+	-
51	Могилев	ХВГВ	М	24	Н.и.	D3	Н.и.	Н.и.	Н.и.
42	Могилев	ХВГВ	М	36	Н.и.	D3	Н.и.	Н.и.	Н.и.
54	Могилев	ХВГВ	М	44	Н.и.	D3	+	+	+
39	Могилев	ХВГВ	Ж	34	Н.и.	D3	+	+	+
71	Гомель	ХВГВ	М	32	Н.и.	D3	+	+	-
79	Гомель	ХВГВ	М	52	Н.и.	D2	Н.и.	Н.и.	Н.и.
66	Витебск	ХВГВ	Ж	37	Н.и.	D3	+	+	-

П р и м е ч а н и е. Н.и. — не исследовали, + — выявлены методом ИФА, - — не обнаружены методом ИФА.

76 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

Методом ИФА 20 образцов сыворотки/плазмы крови было протестировано на наличие HBsAg, анти-HBcore антител и антител к HBeAg. Во всех 20 образцах сыворотки/плазмы крови был выявлен HBsAg и анти-HBcore антитела, что подтверждает инфицирование

обследованных пациентов вирусом гепатита В. Наличие в крови антител к HBeAg является свидетельством перенесенного острого гепатита В, то есть показателем ремиссии. Синтез антител к HBeAg в организме начинается после элиминации HBeAg, что свидетель-



Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей специфического фрагмента генома вируса гепатита В, циркулирующего в Республике Беларусь

ствует о прекращении репликации вируса в организме, то есть о наступившей сероконверсии. Обычно к концу 9-й недели эти антитела обнаруживаются у 90% больных и циркулируют в крови в течение 2—5 лет, реже — несколько месяцев. Антитела к HBeAg были выявлены у 8 (44,4%) обследованных пациентов, при этом не было установлено взаимосвязи между выявлением антител к HBeAg и генотипом вируса гепатита В. Так, антитела к HBeAg были обнаружены у 3 (37,5%) из 8 обследованных пациентов с генотипом D1 вируса гепатита В, у 5 (55,5%) — с генотипом D3, у 1 (50,0%) с генотипом D2 и у 1 (100%) — с генотипом A2.

Филогенетический анализ preS-фрагмента генома вируса гепатита В показал в 27 (96,4%) образцах генотип D и лишь в 1 (3,6%) — генотип A. Результаты представлены на рисунке и в таблице. Средняя эволюционная р-дистанция внутри нуклеотидных последовательностей генотипа D составила 0,02, что свидетельствует о длительной циркуляции одних и тех же штаммов вируса на территории республики.

Данные анализа нуклеотидных последовательностей с использованием различных субтипов вируса гепатита В из GeneBank позволили установить, что в Беларусь циркулирует 3 субтипа D: D1 (44,4%), D2 (11,2%) и D3 (44,4%). В 1 (3,6%) случае выявлен субтип A2.

Данные анализа результатов исследований, выполненных в Минске, показали, что 61,5% (n=8) от всех исследованных образцов относилось к субтипу D1, в то время как субтипы D3 и D2 были выявлены в 23,1% (n=3) и 7,7% (n=1) случаев соответственно. Субтип A2 был определен только в 1 (7,7%) случае.

Частота выявления субтипов D1 и D3 в Бресте была одинаковой — по 42,9%. В 1 образце сыворотки/плазмы крови (14,2%) определен субтип D2 вируса гепатита В.

Филогенетический анализ распределения субтипов вируса гепатита В в Могилеве показал, что субтип D3 выявляется в 4 раза чаще, чем субтип D1 (80% и 20% соответственно).

Единичные исследования, выполненные в Гомеле и Витебске, позволили установить 2 случая ВГВ, вызванного субтипом D3, и 1 — субтипом D2.

Не было обнаружено взаимосвязи между вирусной нагрузкой, выявляемым генотипом и субтипом вируса: вирусная нагрузка варьировала от 3030 до 100 000 000 копий ДНК/мл в разных группах.

Аналогичная ситуация по распределению субтипов вируса гепатита В отмечается в России, Эстонии, Латвии, Венгрии, где также преобладает генотип D вируса гепатита В [8,9]. В этих странах до 85% всех случаев ВГВ вызвано субтипом D как в случае острых, так и в случае хронических гепатитов и циррозов печени. Частота выявления генотипа A значительно ниже и колеблется от 18 до 28%. В то же время необходимо отметить, что в последние годы генотип A становится доминирующим над генотипом D в таких странах, как Польша, Чехия, Сербия [10, 11].

Анализ данных, полученных в других странах по распределению субтипа D вируса гепатита В, показал, что в Европе субтип D3 встречается в 2 раза чаще, чем D2. В то же время субтип D1 более характерен для Швеции,

Франции и Германии. В Эстонии, Латвии и Венгрии субтип D2 вызывает 50,8—66,6% всех случаев ВГВ. Субтип D2 доминирует также в Польше и Чехии. В России 80,6% случаев ВГВ вызвано субтипом D2, значительно реже встречаются субтипы D3 (12,9%) и D1 (3,2%) [9].

Проведенные исследования показали, что частота выявления субтипов D1 и D3 была одинаковой (44,4%), в то время как субтип D2 выявлялся только в 11,2% случаях, что отличается от результатов, полученных ранее. Данные по распределению субтипов вируса гепатита В, полученные в 2006 г. при проведении исследований в Минске на базе Городской клинической инфекционной больницы, свидетельствовали о значительном преобладании субтипа D2: 58,3% случаев было обусловлено субтипом D2, субтипы D3, D2 и D4 выявлялись значительно реже (16,7%, 11,1% и 2,8% соответственно) [12].

Таким образом, первые исследования по генотипированию вируса гепатита В, проведенные в Республике Беларусь, показали, что 94,6% от всех случаев ВГВ вызвано генотипом D и только 3,4% — генотипом A. За последние годы изменилась структура распределения субтипов генотипа D — отмечено увеличение доли случаев ВГВ, вызванных субтипами D1 и D3 по сравнению с субтипом D2. Сделать заключительные выводы о причинах данных изменений можно будет только после проведения всех запланированных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- Lee W. // N. Engl. J. Med.— 1997.— Vol. 337.— P. 1733—1745.
- Beasley R. P. // Cancer.— 1988.— Vol. 61.— P. 1942—1956.
- Norder H., Courouce A., Coursaget P., et al. // Intervirology.— 2004.— Vol. 47.— P. 289—309.
- Bowyer S. M., van Staden L., Kew M. C., et al. // Gen. Virol.— 1997.— Vol. 78.— P. 1719—1729.
- Kramvis A., Kew M., Francois G. // Vaccine.— 2005.— Vol. 23.— P. 2409—2423.
- Tanaka Y., Mizokami M. // J. Infect. Dis.— 2007.— Vol. 195.— P. 1—4.
- Mahtab M., Rahman S., Khan M., et al. // Hepatobil. Pancr. Dis. Ins.— 2008.— Vol. 7, № 5.— P. 457—464.
- Tallo T., Norder H., Tef V., et al. // J. Med. Virol.— 2004.— Vol. 74.— P. 221—227.
- Flodgren E., Bengtsson S., Knutsson M., et al. // J. Clin. Microbiol.— 2000.— Vol. 38, № 9.— P. 3311—3316.
- Dzierzanowska-Fangrat K., Woynarovsky M., Szczygielska I., et al. // Gastroenterol. Hepatol.— 2006.— Vol. 18.— P. 655—658.
- Kluculova L., Rehak V., da Silva Filho H. P., et al. // Gastroenterol. Hepatol.— 2003.— Vol. 15.— P. 1183—1188.
- Olinger C. M., Lazouvskaia N. V., Eremin V. F., et al. // Clin. Microbiol. Infect.— 2008.— Vol. 14.— P. 575—581.

MOLECULAR AND GENETIC CHARACTERISTICS OF HEPATITIS VIRUS B SEPARATED IN BELARUS

E. L. Gasich, V. F. Eryomin, M. G. Pinchuk, S. V. Sosinovich

Objective. To determine which genotype of hepatitis virus B causes the disease in patients living in Belarus various regions.

Material and methods. Twenty eight samples of blood serum/plasma of patients from Belarus various regions chronic viral hepatitis A had been diagnosed in were studied in IFA and PCR.

Results. The studies performed for hepatitis virus B genotyping showed that in the Republic of Belarus 94.6% of hepatitis B cases had been caused by D genotype and only 3.4% of cases by A genotype. For last years the structure of the D genotype subtypes distribution had changed — incidence of viral hepatitis B caused by D1 and D3 subtypes had increased as compared with D2 genotype.

Key words: hepatitis B, hepatitis virus B, genotyping, D1, D2, D3 subtypes.

78 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

С. В. ОРЛОВА, С. В. ЧАПЕНКО, М. МУРОВСКА,
В. В. ЩЕРБА, Т. А. РОГАЧЕВА, А. А. ШТЫРОВ,
М. Е. ХМАРА, С. А. ДРАКИНА, О. В. ОРЛОВА

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ β-ГЕРПЕСВИРУСОВ В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ И ИХ ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В РАЗВИТИИ СИНДРОМА ХРОНИЧЕСКОЙ УСТАЛОСТИ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь,
Институт микробиологии и вирусологии им. А. Кирхенштейна,
Рижского университета им. П. Я. Страдыня,
Городская инфекционная клиническая больница Минска

Цель исследования. Определить частоту встречаемости ВГЧ-6, ВГЧ-7, их активации, корреляции с разными формами инфекционного процесса и установить их возможную роль в развитии синдрома хронической усталости.

Материал и методы. Обследовано 105 пациентов, в том числе с рассеянным склерозом 30 человек, с острым энцефалитом — 5, с лихорадкой неясной этиологии — 9, с хроническими гепатитами — 7, с вирусным гепатитом А — 24, с хроническими герпесвирусными инфекциями — 21, длительно и часто болеющими лиц — 7, больных СПИДом — 2. При поступлении в стационар у больных исследовали кровь и ликвор, повторно при выписке исследовали кровь и ликвор у пациентов с герпесвирусными хроническими инфекциями.

Результаты. У всех вышеупомянутых пациентов были обнаружены ДНК ВГЧ-6 и ВГЧ-7 в лейкоцитах периферической крови, плазме и ликворе. Активация вирусной инфекции установлена у 30% больных рассеянным склерозом, у одного больного острым энцефалитом и у одного ВИЧ-инфицированного. У двух больных с первичным диагнозом лихорадки неясной этиологии регистрировалась длительно время и некоторые из основных клинических признаков синдрома хронической усталости.

Ключевые слова: герпесвирус, рассеянный склероз, острый энцефалит, лихорадка неясной этиологии, хронический гепатит, вирусный гепатит А, хронические герпесвирусные инфекции, часто и длительно болеющие лица, больные СПИДом, синдром хронической усталости.

Вирусы герпеса человека 6 и 7 (ВГЧ-6, ВГЧ-7), относящиеся к β-герпесвирусам и сравнительно недавно открытые, привлекают к себе пристальное внимание [1, 2]. Повышенный интерес к этим вирусам как в теоретической, так и в практической медицине обусловлен следующими факторами: эти вирусы широко распространены и после первичной инфекции сохраняются в форме латентно-персистентной инфекции пожизненно, а при определенных условиях вызывают хронические воспалительные процессы, которые могут привести к аутоиммунным патологиям и неопластическим изменениям.

Впервые ВГЧ-6 был выделен в 1986 г. из β-лимфоцитов крови больных лимфопролиферативными заболеваниями, у больных СПИДом и детей с внезапной экзантемой. ВГЧ-7 был изолирован в 1996 г. из мононуклеаров периферической крови пациентов с синдромом хронической усталости (СХУ) [3—5]. С этим вирусом ассоциируют лимфопролиферативные заболевания, СХУ и развитие иммунодефицита.

Под влиянием различных факторов (соматические и инфекционные заболевания, иммуносупрессия и др.) они могут активироваться и изменять течение основного заболевания, иммунный статус пациента. Кроме того, возможно присутствие двух и более вирусов, которые могут активироваться одновременно, или только одного вируса, что обеспечивает корреляцию с фазой активности этих заболеваний. Выявление зависимости между характером течения инфекции и детекцией маркеров имеет большое клинико-патогенетическое значение и определяет тактику терапии таких больных.

В последнее время инфекцию этих вирусов ассоциируют с этиопатогенезом синдрома хронической усталости (СХУ). Ряд авторов полагают, что вирусные инфекции являются ведущим фактором развития данного заболевания, большой удельный вес в спектре таких вирусов принадлежит ВГЧ-6 и ВГЧ-7 [3—6].

В 2009 г. появилось сообщение V. Lombardi и соавт. (Whittermore Reterson Institute, Reno, USA) о том, что в образцах ДНК, выделенных из крови, взятой у людей с СХУ, обнаружен ретровирус — *xenotropic murine leukemia virus-related virus* (XMRV), который и является этиологическим агентом развития СХУ [7]. Однако исследователи из двух других центров: Имperialского колледжа Лондона (Imperial College of London, UK) и Национального института медицинских исследований Великобритании (MRC National Institute for Medical Research) — не подтвердили эти результаты, признав их ошибочными, XMRV ни в одном случае у больных СХУ обнаружен не был [8, 9]. В настоящее время причастность вирусных инфекций и в первую очередь ВГЧ-6, ВГЧ-7 к факторам риска развития СХУ сомнений не вызывает [1—6].

Цель настоящей работы — определение частоты встречаемости ВГЧ-6, ВГЧ-7, их активации, корреляции с разными формами инфекционного процесса и установление их возможной роли в развитии синдрома хронической усталости.

М а т е р и а л и м е т о д ы

Всего обследовано 105 пациентов, в том числе 30 человек с рассеянным склерозом (РС), 5 — с острым энцефалитом (ОЭ), 9 — с лихорадкой неясной этиологии (ЛНЭ), 7 — с хроническими гепатитами (ХГ), 7 длительно и часто болеющих (ДЧБ) лиц, 24 — с вирусным гепатитом А (ВГА), 21 — с хроническими герпесвирусными инфекциями (ХГИ), 2 больных СПИДом.

Кровь и ликвор забирали у больных при поступлении в стационар. У пациентов с ХГИ забирали повторно при выписке. Образцы ЭДТА крови, сыворотки и ликвора разливали на аликовты и хранили при -20°C.

Для определения нуклеотидной последовательности в ДНК использовали гнездовую ПЦР. Выделяли ДНК из лимфоцитов крови (маркер латентно-персистентной инфекции) и из сыворотки крови (маркер активной инфекции). ДНК выделяли с помощью тест-систем «Амплисенс» (Россия) и «QIAGEN» (Германия).

Для контроля выделения клеточной ДНК проводили ПЦР-глобин с электрофоретической детекцией. Амплифи-

цировали фрагменты ДНК в соответствии с рекомендациями P. Secchiero и соавт. [9]. Позитивные и негативные контроли были включены при каждой постановке ПЦР.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования по обнаружению ДНК ВГЧ-6 и ВГЧ-7 в лейкоцитах периферической крови, плазме и ликворе больных с разными диагнозами по основному заболеванию показали, что во всех группах у больных выявились β-герпесвирусы (табл. 1). Присутствие последовательностей ВГЧ-6 в клетках крови выявлено у 12 из 25 больных РС, у 1 из 5 с ОЭ, у 6 из 9 с ЛНЭ, у 3 из 7 с ХГ, у 3 из 7 ДЧБ пациентов и у 12 из 21 пациента с ГХИ. У 2 больных СПИДом ДНК ВГЧ-6 выявлена в лейкоцитах и у 1 из них — в ликворе. В исследуемых пробах ликвора от других больных также выявлена ДНК ВГЧ-6 у 4 из 7 больных РС и у 1 из 3 с ОЭ. Присутствие вируса в клетках крови и ликворе свидетельствует о латентно-перsistентной форме инфекции.

Активация вирусной инфекции обнаружена у 30% больных с РС, у 1 больного ОЭ и у 1 ВИЧ-инфицированного. Активацию инфекции наблюдали на фоне основного заболевания в основном у больных с неврологическими симптомами в fazu обострения.

Наличие последовательностей ВГЧ-7 в клеточной ДНК выявлено у 5 из 25 больных РС, у 3 из них также обнаружена ДНК в ликворе. У больных с ЛНЭ вирусо-специфическая ДНК выявлена в 33% случаях, у больных с ХГ — в 20%, у ДЧБ респираторными заболеваниями — в 14%, при ГХИ — в 24%. У одного ВИЧ-инфицированного образцы вирусной ДНК выделены как из лейкоцитов, так и из ликвора. Исследования виреемии ВГЧ-7 показали, что она регистрировалась в основном на фоне ГХИ, РС и ЛНЭ — в 14%, 10% и 22% случаев соответственно.

Для определения микст-инфекций у пациентов с активной формой инфекции ВГЧ-6 и ВГЧ-7 определяли также маркеры инфекций герпесвирусов 4, 5 при поступлении в стационар, при выписке и через 1—2 мес после выписки из стационара (табл. 2).

Всего был обследован 21 пациент в острую fazu инфекции и 17 пациентов после прохождения курса терапии. В период нахождения в стационаре больные получали антивирусную, иммуномоделирующую и симптоматическую терапию. Результаты проведенных исследований показали, что при ВГЧ-6 активная форма инфекции зарегистрирована у 10 больных при поступлении, у 4 больных при выписке. Латентная форма ин-

Таблица 1
Частота обнаружения β-герпесвирусов в группах больных с различными диагнозами основного заболевания

Основной диагноз заболевания	Количество больных	ДНК ВГЧ-6			ДНК ВГЧ-7		
		лейкоциты	плазма	ликвор	лейкоциты	плазма	ликвор
Рассеянный склероз	30	12/25 (48%)	9/30 (30%)	4/7 (57%)	5/25 (25%)	3/30 (10%)	3/7 (43%)
Острый энцефалит	5	1/3 (33%)	1/5 (20%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)	0/5 (0%)	0/3 (0%)
Лихорадка неясной этиологии	9	6/9 (66%)	5/9 (55%)	Н.и.	3/9 (33%)	2/9 (22%)	Н.и.
СПИД	2	2/2 (100%)	S (50%)	1/1 (100%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)
Хронические гепатиты	7	3/5 (60%)	1/7 (14%)	Н.и.	1/5 (20%)	0/7 (0%)	Н.и.
Длительно и часто болеющие респираторными заболеваниями	7	3/7 (23%)	1/7 (14%)	Н.и.	1/7 (14%)	0/7 (0%)	Н.и.
Вирус гепатита А	24	Н.и.	4/24 (17%)	Н.и.	Н.и.	1/24 (4,%)	Н.и.
Герпесвирусные хронические инфекции	21	12/21 (51%)	10/21 (47%)	Н.и.	5/21 (24%)	3/21 (14%)	Н.и.
Положительные / итого	105	37/72 (51%)	24/93 (26%)	6/11 (54%)	16/72 (22%)	9/82 (10%)	4/12 (33%)

Примечание. Здесь и в табл. 2 Н.и. — не исследовали.

Динамика герпесвирусной инфекции

Срок исследования	Количество пациентов	ВГЧ-6		ВГЧ-7		Виреемия ВГЧ-5 (ЦМВ)		Виреемия ВГЧ-4 (ВЭБ)	
		виреемия	латентная	виреемия	латентная	+ВГЧ-6	+ВГЧ-7	+ВГЧ-6	+ВГЧ-7
При поступлении в стационар	21	10	12	5	7	9	5	10	5
При выписке из стационара	17	4	10	3	7	1	0	2	1
Период реконвалесценции	5	1	5	1	5	Н.и.	Н.и.	Н.и.	Н.и.

Таблица 2

80 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

фекции выявлялась у 12 больных при поступлении в стационар и у 10 при выписке. Виреmia ВГЧ-7 была обнаружена у 5 больных, а латентно-персистентная форма инфекции — у 7 лиц при поступлении в больницу. После прохождения курса лечения активная форма инфекции сохранялась у 2 больных, а латентно-персистентная — у 7 пациентов. Что касается микст-инфекций, то практически у всех пациентов (у 9 из 10) одновременно с ВГЧ-6 выявлялся ЦМВ и у всех 10 — ВЭБ, которые при выписке обнаружены только у 1 и 2 больных соответственно. Регистрировалась микст-инфекция с ВГЧ-7 у всех пациентов с ЦМВ и с ВЭБ, последняя не исчезла после терапии у 1 больного. В период реабилитации под наблюдением находилось 5 пациентов и у 2 из них выявлена латентно-персистентная форма инфекции, еще у 1 больного продолжали регистрировать вирецию.

У 2 больных (№ 1 и № 2), находившихся в стационаре ГКИБ Минска с первичным диагнозом ЛНЭ, регистрировалась длительная виреmia и некоторые из основных клинических признаков СХУ (табл. 3).

Таблица 3

Регистрации маркеров инфекции ВГЧ-6 и ВГЧ-7 и клинических симптомов СХУ

Маркеры вирусов и клинические симптомы	При поступлении в стационар		При выписке из стационара	
	№ 1	№ 2	№ 1	№ 2
ДНК ВГЧ-6 из лим-фоцитов крови/из сыворотки	-/+	+/-	+/-	+/-
ДНК ВГЧ-7 из лим-фоцитов крови/из сыворотки	+/-	-/-	+/-	-/-
Повышенная утомляемость	+	+	+	+
Усталость и общая слабость в течение 6 мес и более	+	+	+	-
Субфебрильная температура в течение 6 мес и более	+	+	+	-
Нарушение сна	+	+	+	+
Эмоциональная лабильность	+	+	+	+
Головная боль	+	-	+	+

При госпитализации у 2 пациентов регистрировалась активная форма инфекции ГВЧ-6 и у 1 из них — латентная форма инфекции ГВЧ-7. Хотя еще много неясного в этиопатогенезе СХУ, характеризующегося полиморфностью и недостаточной специфичностью клинических признаков. Основными критериями, выработанными в

CDC (Атланта, США) и позволяющими предполагать наличие данного заболевания, являются следующие: усталость; субфебрильная температура в течение 6 мес и более; общая слабость, эмоциональная лабильность; повышенная утомляемость, беспокойство, тревога с периодической депрессией; головная боль; лимфаденопатия; нарушение сна, состояние разбитости во всем теле после ночного сна и др. Исходя из этих критериев этим двум пациентам можно поставить диагноз СХУ.

Работа проводилась при финансовой поддержке проекта № Б09МС-021, выполненной по Договору с ФФИ НАН Беларусь.

ЛИТЕРАТУРА

- Львов Д. К., Мельниченко А. В. // Вопр. вирусологии.— 2001.— № 3.— С. 105—111.
- Tomsone V., Logina I., Millers A., et al. // J. Neurovirol.— 2001.— Vol. 7, № 6.— P. 564—569.
- Исааков В. А., Борисова В. В., Исааков Д. В. Герпес, патогенез и лабораторная диагностика.— М., 1999.
- Human Herpesvirus 6, Human Herpesvirus 7 / Ed. B. Fields, D. Knipe, H. M. Howley. // Philadelphia.— 1996.— P. 2587—2622.
- Chapenko S., Krumina A., Kozireva S. et al. // Clin. Virol.— 2006.— Suppl.— S47—S51.
- Нестерова И. В., Балмасова И. П., Козлов В. А. и др. // Цитокины и воспаление.— 2006.— № 2.— С. 7—11.
- Lombardi V. C., Ruscetti F. W., Das Gupta J., et al. // Science.— 2009.— Vol. 326, № 5952.— P. 585—589.
- Erlwein O., Kaye S., McClure M. O., et al. // PLoS ONE.— 2010.— Vol. 5, № 1.— P. e8519.
- Groom H. C., Boucherit V. C., Makinson K., et al. // Retrovirology.— 2010.— Vol. 7.— P. 10.

SPREAD OF β -HERPESVIRUSES IN PATIENTS WITH VARIOUS PATHOLOGIES AND THEIR POTENTIAL ROLE IN DEVELOPMENT OF CHRONIC FATIGUE SYNDROME

S. V. Orlova, S. V. Tchapenko, M. Murowska, V. V. Shcherba, T. A. Rogacheva, A. A. Shtyrov, M. E. Khmara, S. A. Drakina, O. V. Orlova

Objective. To determine the HHV-6 and HHV frequencies, activation, correlation with various forms of infectious process and their potential role in development of chronic fatigue syndrome.

Material and methods. One hundred and five patients suffering from multiple sclerosis ($n=30$), acute encephalitis ($n=5$), fever of an unknown etiology ($n=9$), chronic hepatitis ($n=7$), virus A caused hepatitis ($n=24$), chronic herpesvirus caused infections ($n=21$), HIV persons ($n=2$) and persons used to fall ill frequently and being sick for a long time ($n=7$) were examined. On admission blood and liquor samples were studied, for patients suffering from chronic herpesvirus caused infections blood and liquor samples were studied again.

Results. HHV-6 and HHV-7 DNA were detected in every abovementioned person's peripheral leukocytes, plasma and liquor. The viral infection activation was determined in 30% of patients suffering from multiple sclerosis, in one patient with acute encephalitis and in one HIV-infected person. Long-term viremia and some of the main clinical signs of chronic fatigue syndrome were registered in two patients having primary diagnosis of fever of an unknown etiology.

Key words: herpesvirus, multiple sclerosis, acute encephalitis, fever of an unknown etiology, chronic hepatitis, virus A caused hepatitis, chronic herpesvirus caused infections, AIDS, persons used to fall ill frequently and being sick for a long time, chronic fatigue syndrome.